



HAL
open science

Impacts de l'acidification des océans sur les organismes benthiques calcifiants des milieux côtiers tempérés

Fanny Noisette

► **To cite this version:**

Fanny Noisette. Impacts de l'acidification des océans sur les organismes benthiques calcifiants des milieux côtiers tempérés. *Ecologie, Environnement*. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2013. Français. NNT: . tel-00925830

HAL Id: tel-00925830

<https://theses.hal.science/tel-00925830v1>

Submitted on 8 Jan 2014

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

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

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité
Océanographie Biologique

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT D'ILE DE FRANCE

Présentée par

Fanny NOISETTE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

**Impacts de l'acidification des océans sur les organismes
benthiques calcifiants des milieux côtiers tempérés**

Soutenu le 11 décembre 2013

Devant le jury composé de :

Dr. Sam DUPONT, Université de Gothenburg, Kristineberg, Suède	Rapporteur
Pr. Rui SANTOS, Université d'Algarve, Faro, Portugal	Rapporteur
Pr. Jacques CLAVIER, Institut Universitaire Européen de la Mer, Plouzané, France	Examinateur
Dr. Jean-Pierre GATTUSO, CNRS, Villefranche sur Mer, France	Examinateur
Pr. Dominique DAVOULT, Université Pierre et Marie Curie, Roscoff, France	Directeur de thèse
Dr. Sophie MARTIN, CNRS, Roscoff, France	Directrice de thèse

Sommaire

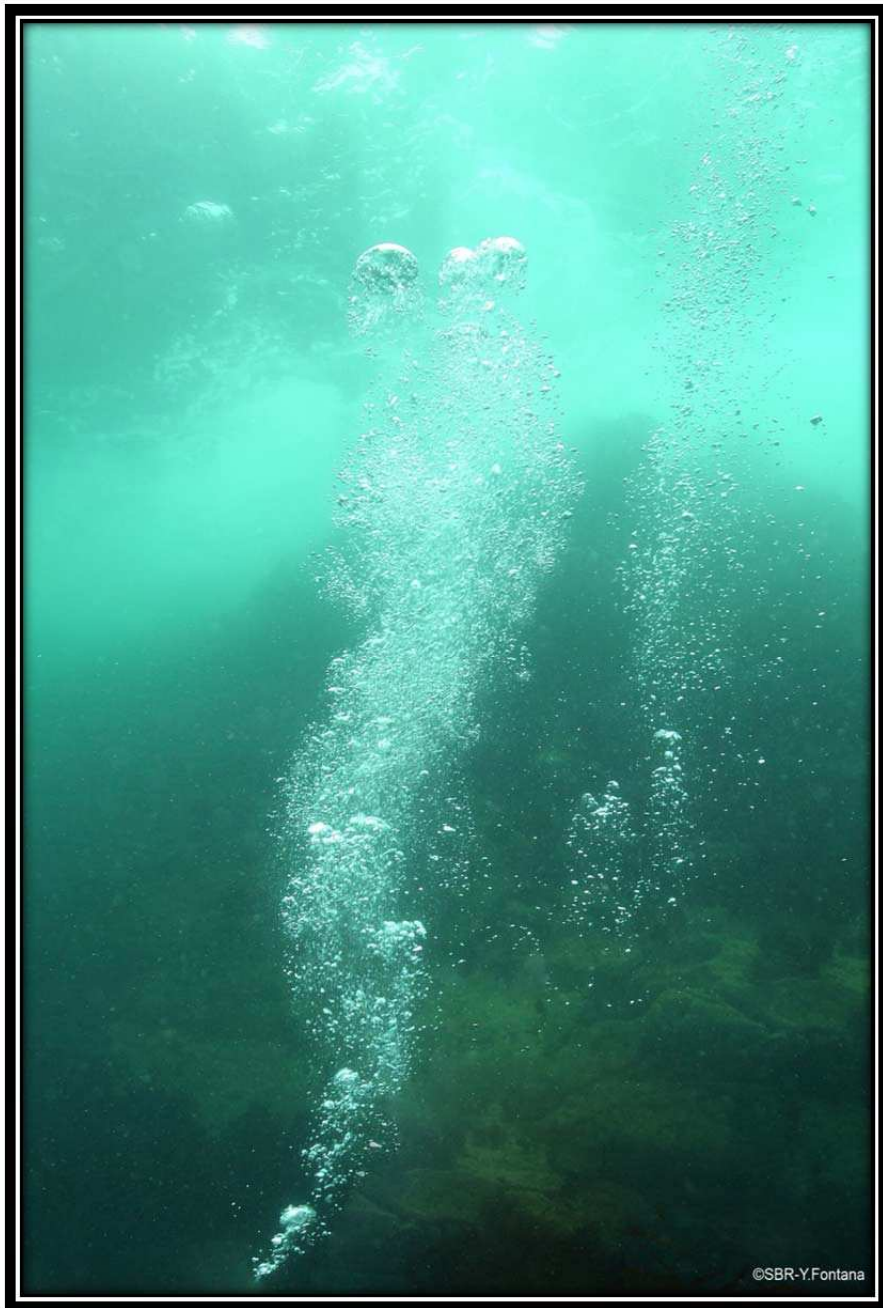
Introduction	1
1. Rôle des océans dans le cycle du carbone	1
2. Système des carbonates	3
3. Qu'est-ce que l'acidification des océans ?	5
4. Evènements passés d'acidification des océans	6
5. Prédications pour le futur	9
6. Impacts de l'acidification des océans sur les organismes marins	10
7. Milieux côtiers tempérés	13
8. Thématique et objectifs de la thèse	15
Partie 1: Impact de l'acidification des océans sur les algues Corallinacées des milieux côtiers tempérés	19
Chapitre 1 : Généralités et physiologie des Corallinacées	21
1. Caractéristiques écologiques	21
2. Photosynthèse et acquisition du carbone	23
2.1 Utilisation du carbone dans la photosynthèse	23
2.2 Diffusion passive du CO ₂	23
2.3 Mécanismes de concentration de carbone (CCMs)	24
2.4 Contrôle abiotique de l'acquisition de carbone	27
3. Processus de calcification	27
4. Couplage entre photosynthèse, respiration et calcification	29
Chapitre 2 : Réponses des algues Corallinacées des milieux côtiers tempérés à l'acidification des océans	33
1. Etat de l'art sur les réponses des Corallinacées à l'AO	33
2. Effets de l'augmentation de la pCO ₂ sur trois algues Corallinacées vivants dans des milieux aux conditions physico-chimiques contrastées	35
2.1 Contexte général	35
2.2 Résumé de l'article n°1	35
<i>Article n°1</i>	39
3. Effets de l'augmentation de la pCO ₂ sur une espèce d'intérêt le maërl (<i>Lithothamnion corallioides</i>) dans différentes conditions de température	61
3.1 Contexte général	61
3.2 Résumé de l'article n°2	64
<i>Article n°2</i>	67

Chapitre 3 : Synthèse générale sur l'impact de l'acidification des océans sur les Corallinacées en zone côtière	91
1. Réponses physiologiques individuelles des Corallinacées à l'AO	91
2. Effets et interactions de stress multiples	94
3. Impacts sur les communautés algales	96
Partie 2 : Impact de l'acidification des océans sur le gastéropode invasif <i>Crepidula fornicata</i>	99
Chapitre 1 : Généralités sur la crépidule et la physiologie des mollusques marins	101
1. Caractéristiques biologiques de la crépidule	101
2. Introduction et invasion de la crépidule en Europe	103
3. Impacts écologiques et économiques de la crépidule	104
4. Processus physiologiques chez les mollusques	105
4.1 Métabolisme	105
4.2 Régulation acide-base	106
5. Formation de la coquille calcaire	106
Chapitre 2 : Impact de l'acidification des océans sur la phase adulte de la crépidule	109
1. Etat de l'art sur les impacts de l'AO sur les mollusques marins	109
2. Réponses métaboliques de la crépidule durant un stress thermique dans différentes conditions de $p\text{CO}_2$	111
2.1 Contexte général	111
2.2 Résumé de l'article n°3	112
<i>Article n°3</i>	113
3. Réponses physiologiques de crépidules adultes dans différentes conditions croisées d'augmentation de la $p\text{CO}_2$ et de la température	131
3.1 Contexte général	131
3.2 Résumé de l'article n°4	131
<i>Article n°4</i>	135
4. Mesures de pH extracellulaire	166
Chapitre 3 : Impact de l'acidification des océans sur les jeunes stades de vie de la crépidule	169
1. Etat de l'art sur l'impact de l'AO sur les jeunes stades de vie des mollusques	169
2. Impact de l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ sur la coquille durant le développement embryonnaire de la crépidule	171
2.1 Contexte général	171

2.2 Résumé de l'article n°5	172
<i>Article n°5</i>	175
2.3 Processus hypothétiques contrôlant l'équilibre acido-basique dans les capsules de crépidule	195
3. Impact de l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ sur la survie, la croissance et le métabolisme de larves véligères de <i>Crepidula fornicata</i>	196
3.1 Contexte général	196
3.2 Introduction	196
3.3 Matériel et méthodes	198
3.4 Résultats	202
3.5 Discussion	205
Chapitre 4 : Synthèse générale sur l'impact de l'acidification des océans sur l'espèce invasive <i>Crepidula fornicata</i>	209
1. Impact de l'AO sur les jeunes phases du cycle de vie	209
1.1 Importance de l'encapsulation dans la résistance à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$	209
1.2 Importance de la durée de vie larvaire planctonique	210
1.3 Importance des effets mémoires à travers plusieurs phases du cycle de vie	211
2. Tolérance des adultes à l'AO	212
2.1 Réponses physiologiques et régulation du pH interne	212
2.2 Réponses de calcification	213
3. Interaction de l'AO avec d'autres facteurs abiotiques	215
4. Impacts de l'AO sur les communautés	217
Discussion générale et perspectives	219
1. Importance du compartiment benthique dans les écosystèmes côtiers	219
2. Impacts de l'AO sur les flux des communautés calcifiantes des milieux tempérés côtiers	220
3. Impacts des communautés sur les paramètres de la chimie des carbonates dans un contexte d'AO	223
4. Une zone côtière aux multiples stress	224
3. Perspectives	225
Références bibliographiques	227

Annexes

INTRODUCTION



Introduction

1. Rôle des océans dans le cycle du carbone

L'océan, réservoir majeur de carbone sur Terre, joue un rôle essentiel dans la régulation du cycle global du carbone avec une absorption journalière estimée à 22 millions de tonnes de dioxyde de carbone (CO_2) (Feely *et al.* 2008). Ainsi, la surface des océans absorbe chaque année environ un quart du CO_2 émis dans l'atmosphère par les activités d'origine anthropique (Sabine *et al.* 2004). A l'interface air-mer, la diffusion du CO_2 atmosphérique dans l'océan est facilitée par la différence de la pression partielle en CO_2 ($p\text{CO}_2$) entre l'océan et l'atmosphère. La solubilité et la distribution du CO_2 dans les océans dépend de nombreux facteurs physico-chimiques comme la température, la salinité ou le régime de turbulence mais aussi de facteurs biologiques (activité photosynthétique, processus biogénique de calcification). Une fois le CO_2 dissous dans les eaux de surface, il est ensuite transporté horizontalement et verticalement à travers les couches de l'océan par des processus biologiques et chimiques comme (i) la pompe de solubilité, (ii) la pompe de carbone organique et (iii) la contre-pompe des carbonates, ces deux dernières étant souvent associées sous le nom de pompe biologique (Denman *et al.* 2007) (Figure 0-1).

(i) La pompe de solubilité est un mécanisme contrôlant l'absorption ou le dégagement de CO_2 gazeux en fonction de la température. La solubilité est d'autant plus grande que l'eau est froide. Ainsi, les zones d'eau de surface froide de l'océan (ex : Atlantique Nord-Est) sont des zones importantes d'absorption du CO_2 atmosphérique gazeux par l'océan. Ces eaux de hautes latitudes, denses et froides, chargées en CO_2 , coulent ensuite vers l'océan profond où elles transportent une forte concentration de carbone inorganique dissous (CID) et sont à l'origine de la circulation thermohaline à grande échelle (Denman *et al.* 2007).

(ii) La pompe biologique est gouvernée par les processus de photosynthèse du phytoplancton marin qui convertit le CID en matière organique. Ce processus est limité par la disponibilité de la lumière et des nutriments et n'a donc lieu que dans la couche photique des océans. Le CO_2 atmosphérique dissous dans les océans et capté par la photosynthèse alimente le flux de carbone organique particulaire (COP) vers l'océan profond à la mort du phytoplancton ou par intégration dans le réseau trophique. Ce cycle maintient le gradient

vertical de concentration en CID avec des valeurs plus élevées en profondeur et moins élevées à la surface (Hofmann & Schellnhuber 2009). Alors que la majorité du carbone organique produit dans la couche de surface est recyclée sous forme de CO_2 après broutage par le zooplancton, 30 % s'enfonce dans les eaux plus profondes avant d'être reconverti en CO_2 par les bactéries marines. Sur la totalité de la matière organique formée en zone photique, seulement 0,1 % de carbone organique environ atteint le fond des océans où il est stocké dans les sédiments (Feely *et al.* 2001).

(iii) La contre-pompe des carbonates est, contrairement aux deux autres pompes, source de CO_2 . Le processus de calcification biogénique généré par les espèces calcifiantes du plancton – principalement coccolithophores et ptéropodes – émet du CO_2 lors de la formation de la coquille calcaire dans l'océan de surface (voir "2 Système des carbonates" pour la formule). A l'inverse de la pompe biologique qui séquestre du CO_2 dans les océans, la contre-pompe des carbonates consomme du CID mais libère du CO_2 . A la mort des organismes, les tests calcaires coulent dans la colonne d'eau et s'agrègent sur les fonds marins. La redissolution du CaCO_3 est alors un puits de CO_2 , qui peut être ramené vers la surface par les processus de remontées d'eaux profondes appelés upwelling (Denman *et al.* 2007).

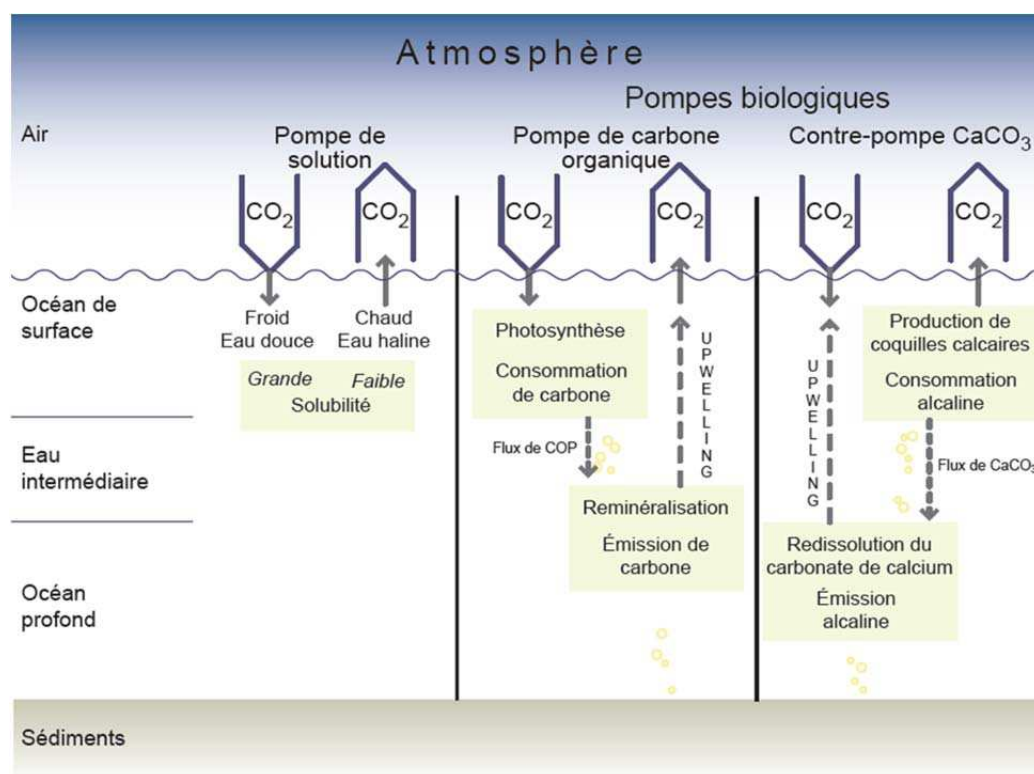


Figure 0-1: Régulation des fluctuations naturelles de CO_2 atmosphérique par les pompes de solubilité et biologiques. D'après Denman *et al.* 2007

2. Système des carbonates

Dans l'eau de mer, le carbone inorganique dissous (CID) se retrouve sous différentes formes : la forme indissociée ($\text{CO}_2 \text{ aq}$), l'acide carbonique (H_2CO_3), les ions bicarbonates (HCO_3^-) et les ions carbonates (CO_3^{2-}). La proportion de chacune des espèces de carbone dans l'eau de mer dépend des constantes de dissociations qui varient en fonction du pH (Figure 0-2). Dans les conditions actuelles de pH (8,1 en moyenne sur l'océan global), les ions HCO_3^- sont la forme majoritaire du CID total (91 %) tandis que les ions CO_3^{2-} ne représentent que 8 % du CID et le $\text{CO}_2 \text{ aq}$ (et l' H_2CO_3), 1 % (TheRoyalSociety 2005).

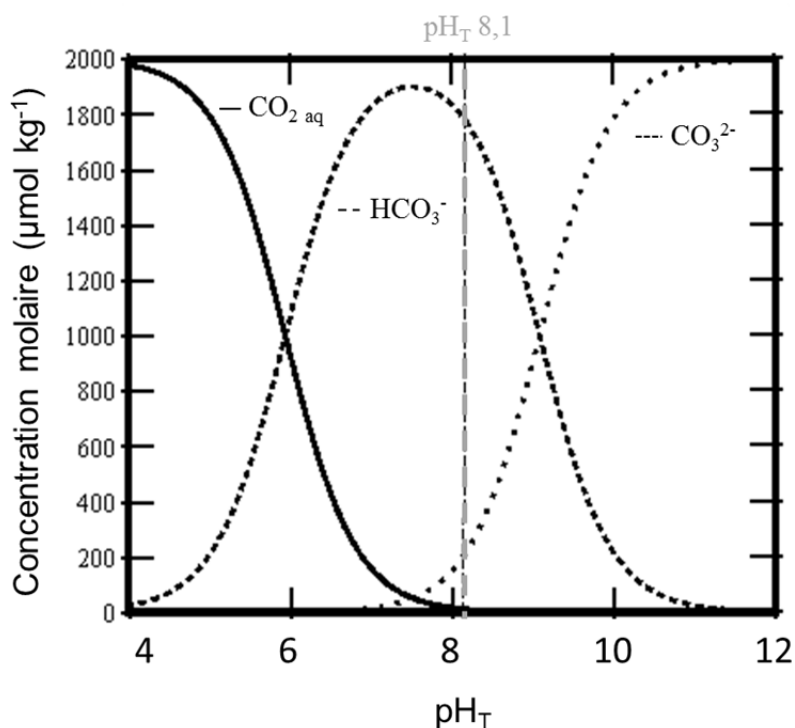
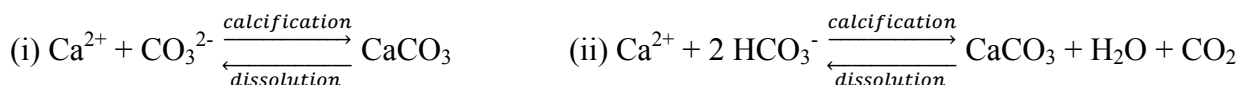


Figure 0-2: Répartition des différentes espèces de CID en fonction du pH marin. pH_T : pH mesuré sur l'échelle totale. Issu de Solomon *et al.* 2007

Les échanges de CO_2 entre l'atmosphère et l'océan sont définis via le coefficient de solubilité du CO_2 dans l'eau de mer (Zeebe 2011) permettant un transfert thermodynamique du CO_2 depuis l'atmosphère vers l'océan à travers la surface de la mer (Sabine *et al.* 2004). Une fois dissous dans l'eau de mer de surface, le CO_2 réagit avec l'eau pour former le H_2CO_3 . Cet acide faible se dissocie immédiatement en HCO_3^- et ions hydrogènes (H^+). Les ions HCO_3^- peuvent à leur tour se dissocier en ions CO_3^{2-} et en ions H^+ (Figure 0-4 A).

Le cycle du carbone en milieu marin est lié au cycle des carbonates. La formation et la dissolution du carbonate de calcium (CaCO_3) utilisent des ions CO_3^{2-} ou HCO_3^- selon les formules suivantes :



Ces processus de calcification et de dissolution peuvent être d'origine chimique ou biologique. Ils régissent la contre-pompe des carbonates et impactent à la fois les quantités de CID mais aussi l'alcalinité totale (A_T) de l'eau de mer définie comme la capacité de l'eau de mer à neutraliser les acides (Dickson *et al.* 2003). Pour chaque mole de CaCO_3 précipitée, A_T augmente de 2 équivalents (Smith & Key 1975). La quantité de CID est quant à elle principalement influencée par les processus de photosynthèse et de respiration (Figure 0-3).

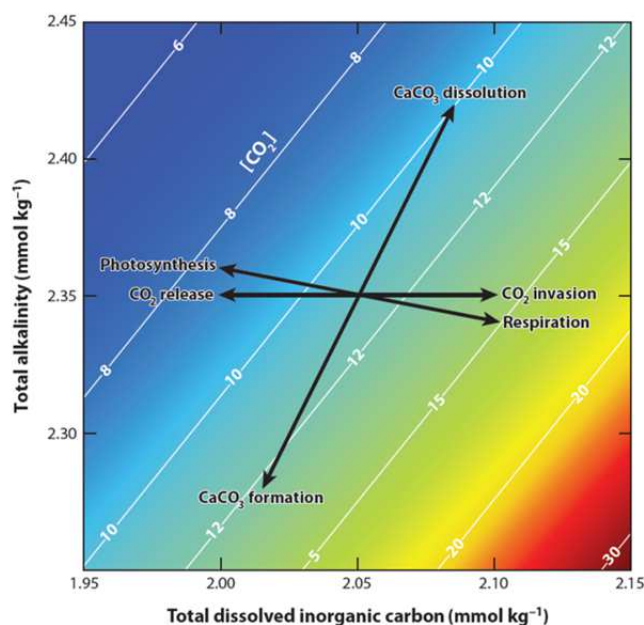


Figure 0-3: Effets de différents processus sur les paramètres CID (total dissolved inorganic carbon), A_T (total alkalinity), et $[\text{CO}_2]$ de la chimie des carbonates. Sous conditions fixes, température: 15°C ; salinité : 35 et pression : 1 atm. Issu de Zeebe 2011.

L'état de saturation de l'eau de mer en CaCO_3 (Ω) qui contrôle thermodynamiquement les processus de précipitation et dissolution du CaCO_3 est défini par la formule suivante :

$$\Omega = [\text{Ca}^{2+}] \times [\text{CO}_3^{2-}] / K_{sp}$$

où $[Ca^{2+}]$ est la concentration en ions calcium, $[CO_3^{2-}]$ est la concentration en ions carbonate et K_{sp} est une constante stœchiométrique relative à la forme de $CaCO_3$ variant avec la température, la salinité et la pression.

Une sursaturation de l'eau de mer en $CaCO_3$ ($\Omega > 1$) favorise sa précipitation alors qu'une sous saturation de l'eau de mer ($\Omega < 1$) la rend "corrosive" et favorise le processus de dissolution. La solubilité du $CaCO_3$ étant en partie régie par la température et la pression, une frontière naturelle nommée "horizon de saturation" à laquelle Ω est inférieur à 1 se crée en profondeur dans les océans, entre 200 et 3 500 mètres suivant les zones de l'océan (Feely *et al.* 2004).

3. Qu'est-ce que l'acidification des océans ?

Depuis le milieu du 18^{ème} siècle et l'avènement de l'ère industrielle, la concentration en CO_2 atmosphérique n'a cessé d'augmenter passant de 280 μatm dans les années 1850 à 397 μatm fin 2013 (<http://co2now.org/>). Cette augmentation est principalement causée par le développement important des activités humaines comme la combustion d'énergies fossiles, l'industrialisation et la déforestation (Sabine *et al.* 2004). L'augmentation de la concentration en CO_2 est l'une des causes d'un phénomène bien connu, le réchauffement climatique qui entraîne une augmentation globale de la température terrestre et des océans par augmentation de l'effet de serre. Un deuxième phénomène moins connu est causé par cette augmentation du CO_2 atmosphérique : l'acidification des océans (AO). Il résulte d'un changement dans l'équilibre chimique des océans engendré par l'augmentation de la pCO_2 atmosphérique.

D'après la loi de Henry¹, une augmentation de la concentration en CO_2 atmosphérique entraîne une augmentation correspondante de pCO_2 à la surface des océans. Cette absorption accrue de CO_2 augmente à la fois la concentration des ions HCO_3^- et H^+ (Figure 0-4 B). La concentration en ions H^+ régit directement le pH marin et une augmentation de leur concentration entraîne une diminution du pH via la relation $pH = -\log [H^+]$. Cette diminution de pH engendrée par l'augmentation de la pCO_2 atmosphérique est le phénomène appelé "acidification des océans". L'acidification pourrait être plus drastique sans le pouvoir tampon des carbonates. Une partie des ions H^+ libérés se combine en effet aux ions CO_3^{2-} présents

¹ Loi de Henry : "A température constante, la quantité de gaz dissous dans un liquide est directement proportionnelle à la pression partielle qu'exerce ce gaz sur le liquide"

dans l'eau de mer pour se transformer en ions HCO_3^- , tamponnant ainsi la diminution du pH (Figure 0-4 B). Ce pouvoir tampon induit directement une diminution de la disponibilité des ions CO_3^{2-} . La diminution de la concentration en ions carbonates entraîne une diminution du paramètre Ω influant sur les processus de calcification et fait remonter l'horizon de saturation des carbonates en direction de la surface.

Le pH actuel de l'océan de surface, d'environ 8,1 (pH_T^2), a déjà diminué de 0,1 unité depuis la fin de la période préindustrielle (Solomon *et al.* 2007; Gattuso & Lavigne 2009) et l'acidité de l'océan de surface a augmenté de 30 % (Dupont & Pörtner 2013). Sur cette même période, l'état de saturation des carbonates a diminué de 20 % et l'horizon de saturation est remonté d'environ 80 à 200 mètres dans les océans (Feely *et al.* 2004).

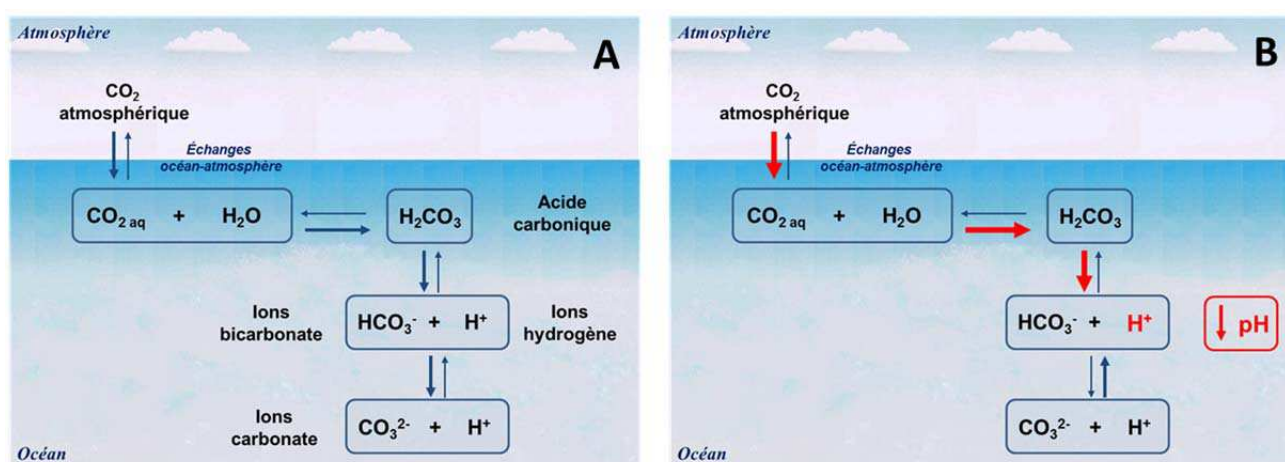


Figure 0-4: Système du carbone et des carbonates. A : avant l'augmentation massive de la $p\text{CO}_2$. B : dans un contexte d'acidification des océans. Les flèches rouges montrent le déplacement de l'équilibre et la diminution de pH induite par l'augmentation des ions H^+ .

4. Evènements passés d'acidification des océans

Actuellement, la concentration en CO_2 atmosphérique est la plus élevée que la planète ait connu depuis 800 000 ans, fluctuant jusqu'en 1850 entre 180 et 300 μatm (Lüthi *et al.* 2008). Cependant, des phénomènes d'AO se sont déjà produits au cours des temps géologiques, à des périodes critiques de l'histoire de la Terre.

² pH_T : pH mesuré sur l'échelle totale

Sur les 300 derniers millions d'années, 7 périodes majeures durant lesquelles des phénomènes d'AO sont suspectés, ont été recensées (Hönisch *et al.* 2012) avec à chaque fois des impacts sur les espèces marines (Tableau 0-1). L'exemple géologique se rapprochant le plus des concentrations actuelles en CO₂ atmosphérique est le Maximum Thermique Paléocène Eocène (PETM dans le tableau) il y a 55 millions d'années. Cet évènement est caractérisé par des rejets important de CO₂ dans l'atmosphère, une diminution conjointe du pH et de Ω , une remontée de 2 km de l'horizon de l'état de saturation des carbonates (Zachos *et al.* 2005) et une augmentation rapide de la température de la surface des océans de 5 à 9°C sur une période de 1000 à 2000 ans (Speijer *et al.* 2012). Les archives sédimentaires et des changements majeurs dans les fossiles indiquent que les modifications des conditions physico-chimiques des océans à cette période ont engendré d'importants changements dans les communautés planctoniques marines et ont particulièrement touché les foraminifères benthiques (Speijer *et al.* 2012)

Bien que des similarités existent entre ces différentes périodes d'AO, aucun évènement passé ne correspond aux futures projections en termes de déséquilibres de la chimie des carbonates. En effet, la diminution critique de Ω prédite pour les années à venir résulte de la rapidité de l'augmentation des émissions de CO₂ sur les dernières années et dans le futur. Dans les évènements passés, des quantités importantes de CO₂ ont été libérées dans l'atmosphère mais sur un pas de temps beaucoup plus long, à une vitesse beaucoup plus lente. De ce fait, le déséquilibre de la balance des carbonates engendré par l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ a été régulé par une augmentation des ions CO₃²⁻ provenant de la dissolution du CaCO₃ stocké dans les fonds océaniques et de l'érosion des sols continentaux, influant sur l'alcalinisation des eaux océaniques. Dans ces conditions de lente augmentation de la $p\text{CO}_2$, la diminution du pH et la saturation en CaCO₃ des eaux océaniques sont des processus découplés (Hönisch *et al.* 2012), ce qui n'est pas le cas dans le contexte actuel d'AO engendré par une augmentation très rapide de la $p\text{CO}_2$, 30 à 100 fois plus rapide que dans les précédents évènements géologiques (Bijma *et al.* 2013).

Tableau 0-1: Evènements d'acidification des océans au cours des ères géologiques

Ere	Période	Epoque	Ma	Période géologique	Augmentation des émissions de CO ₂	Variations de pH	Impacts sur les organismes marins
CÉNOZOÏQUE	QUATERNAIRE	HOLOCÈNE	0,01				
		PLÉISTOCÈNE	0,01	Fin du Pleistocène	↑ 30 % (189 à 265 μatm)	↓ de 0,15 ± 0,05 unités pH	Masse des coccolithophores: ↓ 25 % Masse des foraminifères: ↓ 40 à 50 %
	NÉOGÈNE	PLIOCÈNE	1,8				
		MIOCÈNE	5	Oligocène - Pliocène	330 - 400 μatm réchauffement	↓ de 0,06 à 0,11 unités pH Pas de changement de Ω	Migrations des espèces tropicales de foraminifères vers les pôles Pas de réponse de calcification
	PALÉOGÈNE	OLIGOCÈNE	23				
		EOCÈNE (PETM)	34	Paléocène - Eocène (PETM)		↓ de 0,25 à 0,45 unités pH ↓ Ω < 1,5	Extinction massive des foraminifères Diminution des algues calcaires et coraux Changement des communautés planctoniques
ÉOCÈNE		56					
	PALÉOGÈNE	66	Crétacé - Paléogène	↑ lente pCO ₂	↓ lente pH	Extinction majeures des espèces planctoniques calcifiantes Pas d'extinction chez les coraux	
MÉSOZOÏQUE	CRÉTACÉ	66					
	JURASSIQUE	146	Triassique - Jurassique	↑ 700 à 2000 μatm	↓ Ω	Crise des espèces très calcifiantes Extinctions chez les coraux sclératinaires	
	TRIASSIQUE	200					
	PERMIEN	251	Permien - Triassique	émissions annuelles de CO ₂ : 0,1 à 1 Pg C		Observations de dissolutions de carbonates Survie des espèces résistantes à l'hypercapnie et réduction de l'état de saturation des carbonates	

5. Prédiction pour le futur

Suivant les scénarios d'augmentation des émissions de CO_2 dans l'atmosphère prédite dans le *Special Report on Emission Scenario* (SRES) (Nakicenovic *et al.* 2000) et rapportés par l'Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) dans son 4^{ème} rapport, la $p\text{CO}_2$ atmosphérique pourrait atteindre 730 à 1020 μatm d'ici 2100. Selon les prévisions, le pH océanique en 2050 sera plus bas qu'il ne l'a été depuis environ 20 millions d'années. En effet, l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ aurait pour conséquence une diminution de pH de 0,11 à 0,35 unités pH pour 2100 (Solomon *et al.* 2007) qui pourrait atteindre 0,77 unité d'ici 2300 (Caldeira & Wickett 2003). En parallèle, une diminution de la concentration en ions CO_3^{2-} de 30 %, et par conséquent une diminution de Ω (Orr *et al.* 2005), ferait remonter l'horizon de saturation de l'aragonite (une des formes de CaCO_3) à une vitesse de 4 mètres par an (Bijma *et al.* 2013), l'amenant jusqu'à la surface sous les hautes latitudes Sud de l'océan Austral d'ici à 2100 (Figure 0-5).

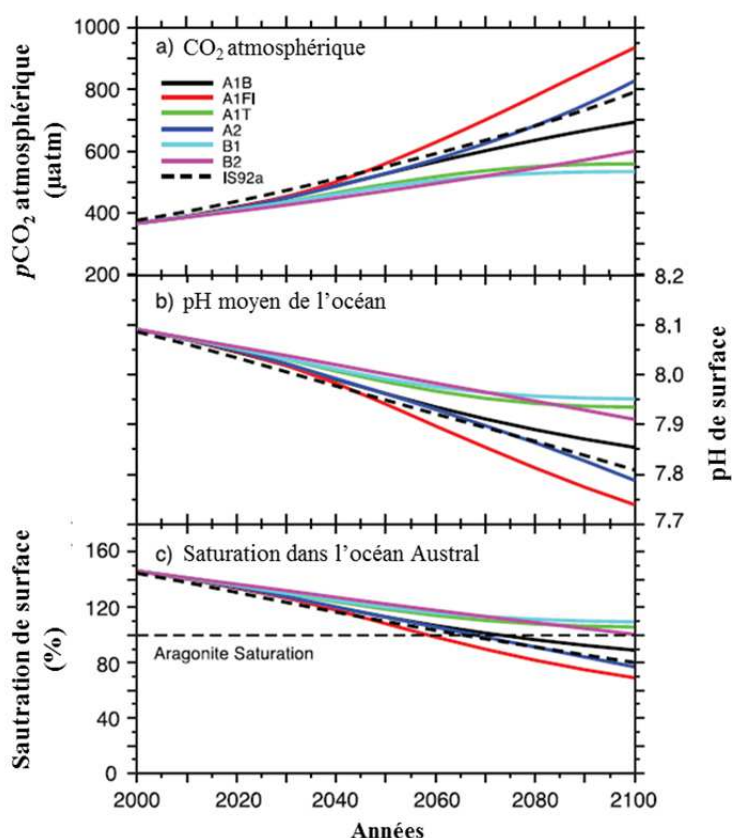


Figure 0-5: Changements de la $p\text{CO}_2$ atmosphérique, du pH moyen à la surface des océans et de l'état de saturation de l'aragonite de l'océan Austral, en fonction des 6 scénarios définis par le SRES (de A1B à B2). Séries temporelles pour a) la $p\text{CO}_2$ atmosphérique ; b) le pH moyen de l'océan de surface ; c) l'état de saturation en aragonite moyen dans l'océan Austral (Plattner *et al.* 2001). IS92a : scénario antérieur au SRES. D'après Solomon *et al.* 2007.

Alors que la synthèse du 5^{ème} rapport de l'IPCC donnant les dernières tendances du changement global doit être soumise à l'ONU fin 2014, les émissions de CO₂ ont tendance à s'accroître (Füssel 2009). Les concentrations en CO₂ atmosphérique enregistrées pour la période 2000-2004 étaient plus élevées que dans le pire scénario prédit par l'IPCC (Raupach *et al.* 2007). En couplant l'AO au réchauffement climatique, Plattner *et al.* (2001) prévoient une augmentation de 4 % de la concentration atmosphérique en CO₂ par rapport aux scénarios donnés par l'IPCC pour 2100 en raison de la diminution de la capacité de stockage de carbone de l'océan sous température plus élevée.

Le 28 septembre dernier, le groupe de travail 1 (WP1) de l'IPCC évaluant les aspects scientifiques physiques du changement climatique a rendu son rapport final contribuant au 5^{ème} rapport de l'IPCC. Leurs dernières prédictions basées sur des scénarios RCP (Representative Concentration Pathways), relatifs à l'évolution de la concentration en gaz à effet de serre au cours du 21^{ème} siècle, prédisent une diminution du pH marin moyen de 0,06 à 0,032 unités pH pour la fin du siècle couplée à une augmentation de température des eaux de surface de 1,0 à 3,7 °C (IPCC 2013).

6. Impacts de l'acidification des océans sur les organismes marins

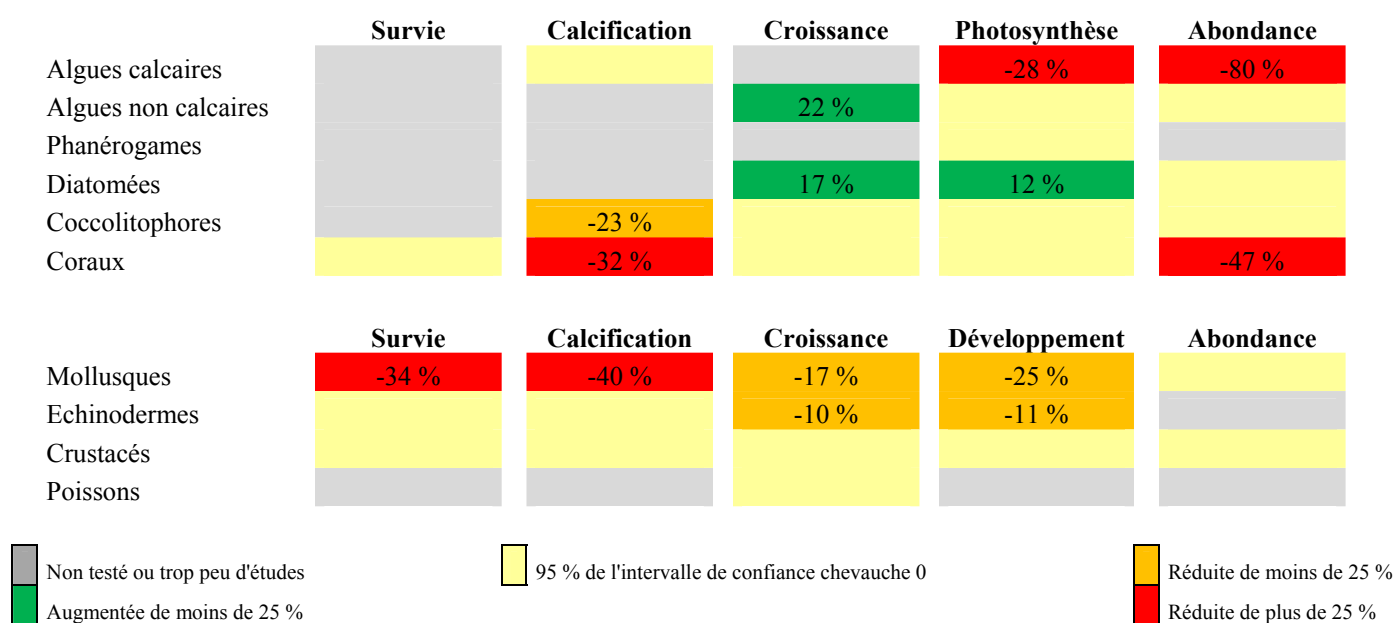
L'acidification future des océans et le changement d'équilibre de la chimie des carbonates vont sans aucun doute induire des changements majeurs dans les écosystèmes marins. Cependant, la connaissance des mécanismes sous-jacents à ces changements, des différentes sensibilités spécifiques et des conséquences évolutives en sont encore à leur début (Dupont & Pörtner 2013). De très nombreuses espèces marines semblent être menacées par l'AO (Andersson *et al.* 2011; Kroeker *et al.* 2013c) car l'augmentation de la concentration de CO₂, la diminution du pH et les changements d'état de saturation en carbonates sont susceptibles d'impacter de nombreuses fonctions biochimiques, physiologiques et métaboliques chez tous les organismes marins.

Les processus physiologiques peuvent être sensibles à différents paramètres de la chimie des carbone-carbonates. Chez les autotrophes (microalgues, macroalgues, phanérogames marines), la photosynthèse qui utilise différentes sources de carbone (CO₂, HCO₃⁻) est susceptible d'être particulièrement affectée par l'augmentation de la concentration en CO₂ (Raven & Beardall 2003). Ce changement de concentration pourrait moduler les

réponses photosynthétiques de certaines espèces algales voire même bénéficier à certaines macrophytes (Raven 2011; Koch *et al.* 2013) et potentiellement impacter la consommation de CID par les communautés phytoplanctoniques (Riebesell *et al.* 2007). Chez les hétérotrophes en revanche, la diminution de pH induite par l'AO serait source d'une régulation coûteuse en énergie afin de maintenir le pH interne à des valeurs plus élevées que le pH externe de l'eau de mer pour un déroulement optimal des processus biochimiques internes. Cette régulation du milieu interne dépend de l'efficacité des mécanismes de régulation ainsi que des capacités de tolérances spécifiques à chaque espèce (Melzner *et al.* 2009) et pourrait se faire au détriment d'autres fonctions physiologique induisant une dépression générale du métabolisme (Pörtner *et al.* 2005).

De nombreux organismes marins, des algues microscopiques aux coraux bâtisseurs de récifs, précipitent du CaCO_3 pour former leur thalle, squelette, coquille protectrices où pièces calcifiées. Il existe différentes structures cristallines de CaCO_3 possédant différentes solubilités : calcite, calcite faiblement magnésienne (calcite où certains ions Ca^{2+} sont remplacés par des ions Mg^{2+}), aragonite et calcite hautement magnésienne (plus de 12 % de Mg^{2+}), de la moins à la plus soluble. A cause des changements s'opérant dans la chimie des carbonates, et particulièrement de la diminution de Ω , les organismes calcifiants sont les plus susceptibles d'être impactés par l'AO. Il est cependant difficile de prédire l'impact général de l'AO quant à la sensibilité des organismes calcifiants car le processus de calcification est fortement régulé par des processus biologiques et peut varier en fonction de la capacité des organismes à réguler le pH au niveau du site de calcification, de la présence d'une couche organique protectrice et de la forme de CaCO_3 précipitée (Ries *et al.* 2009). De plus différents processus physiologiques, comme la photosynthèse et la calcification, peuvent s'influencer les uns les autres, donnant lieu à des réponses complexes dont les mécanismes ne sont pas encore bien compris (Koch *et al.* 2013).

De nombreuses revues ont fait état des réponses des organismes à l'AO existant au sein de différents taxons: microorganismes (Liu *et al.* 2010), macroalgues et phanérogames (Koch *et al.* 2013), mollusques (Gazeau *et al.* 2013; Parker *et al.* 2013), échinodermes (Dupont *et al.* 2010b), crustacés (Whiteley 2011). Des méta-analyses compilant des études individuelles ont permis de mettre en évidence différentes sensibilités des espèces face à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ (Dupont *et al.* 2010a; Hendriks *et al.* 2010; Kroeker *et al.* 2010). La dernière en date, menée sur 228 études par Kroeker *et al.* (2013c), a fait ressortir de grandes tendances en réponse à l'AO sur des taxons majeurs, résumées dans le tableau 0-2.

Tableau 0-2: Résumé des principaux effets de l'AO sur différents taxons clé. D'après Kroeker *et al.* 2013c

D'après cette analyse, la survie, la calcification, la croissance, le développement et l'abondance d'une grande diversité d'espèces marines seraient réduites en réponse à l'AO et la diminution de pH avec un impact majeur sur les algues calcaires et les mollusques. Grâce à cette analyse globale regroupant plusieurs espèces au sein de différents taxons, les auteurs ont aussi pu mettre en évidence des réponses globales liées à des traits physiologiques ou traits de vie. Ainsi, les espèces fortement calcifiées comme les algues calcaires, coraux, mollusques et larves d'échinodermes seraient plus sensibles à l'AO que les crustacés, poissons, algues non calcaires qui sont moins affectées voire bénéficient des conditions physico-chimiques engendrée par l'augmentation de la $p\text{CO}_2$. Les espèces mobiles ayant un comportement actif, comme les crustacés et les poissons, seraient moins sensibles à la diminution de pH que les espèces sessiles, certainement grâce à leurs taux métaboliques élevés et leurs mécanismes actifs de régulation du pH (Melzner *et al.* 2009). De même, certaines espèces d'algues non calcaires et de diatomées pourraient bénéficier de l'augmentation du CO_2 , substrat de photosynthèse privilégié (Koch *et al.* 2013).

Bien que les méta-analyses globales permettent d'avoir une vue différente de l'impact de l'AO sur les organismes marins (Hendriks *et al.* 2010), elles peuvent masquer des différences plus fines à l'échelle de l'individu, de la population ou de l'espèce (Dupont *et al.* 2010a). A l'échelle individuelle, les différentes phases du cycle de vie d'une espèce sont

susceptibles d'avoir différentes sensibilités au stress (Dupont *et al.* 2010a) et les phases les plus précoces du cycle de vie des organismes marins seraient les plus sensibles au phénomène d'AO (Byrne 2011; Ross *et al.* 2011). Les jeunes stades de vie constituent chez la majorité des espèces marines la phase dispersive du cycle de vie (sous forme de larves ou de propagules) et permettent aux populations de se renouveler et de s'étendre à de nouvelles aires géographiques (Pechenik 1999). L'impact important de l'AO sur la survie et la croissance de ces phases pourrait constituer un goulet d'étranglement des populations marines influant sur leur démographie et à terme sur la pérennité des espèces (Dupont *et al.* 2010a). Alors qu'à l'échelle d'une population, la sélection des génotypes les plus résistants provoque une variabilité de réponse à l'AO entre les générations, les différences de réponses à la diminution de pH entre populations d'une même espèce peuvent résulter de conditions environnementales ou d'histoires sélectives différentes (Range *et al.* 2011). L'adaptation de populations vivant dans des milieux de vie aux conditions physico-chimiques très variables (ex : cuvette rocheuses de l'estran) pourraient donner lieu à des génotypes et phénotypes plus résistants au phénomène d'AO que la même espèce vivant en milieu plus stable (Range *et al.* 2013). Toutes ces différences de sensibilité rendent les réponses des organismes marins face à l'AO difficiles à généraliser.

7. Milieux côtiers tempérés

L'océan côtier représente seulement 7 % de la totalité de la surface océanique avec une zone côtière qui s'étend du littoral au début de la pente du plateau continental dont la profondeur est d'environ 200 mètres. Dans cette interface entre l'océan, l'atmosphère et la lithosphère, les cycles biogéochimiques sont d'importance majeure et assurent 20 % de la production globale de matière organique, 30 % de la production et 50 % de l'enfouissement de carbone inorganique particulaire (Gattuso *et al.* 1998). Dans les eaux côtières, le compartiment benthique est en contact étroit avec le compartiment pélagique et interagit avec ce dernier. Les communautés benthiques peuvent ainsi jouer un rôle déterminant dans les flux de matière et d'énergie des écosystèmes côtiers (Chauvaud *et al.* 2000; Bartoli *et al.* 2001; Chauvaud *et al.* 2003; Gutiérrez *et al.* 2003; Bensoussan & Gattuso 2007; Martin *et al.* 2007b; Martin *et al.* 2007c).

Comme l'océan ouvert, les eaux côtières sont soumises à l'AO. Cependant, dans les zones côtières, les interactions entre les processus hydrologiques, biologiques et géochimiques donnent lieu à des variations de la chimie des carbonates complexes, sur de multiples échelles de temps (Waldbusser & Salisbury 2013). Des apports d'eau douce contenant des nutriments, des produits d'érosion des sols influant sur l'alcalinité, des particules terrigènes ainsi que du carbone organique dissous influent sur les masses d'eau de la zone côtière et font varier dans l'espace et le temps la chimie des carbonates (Waldbusser & Salisbury 2013). Différents processus peuvent indépendamment impacter l' A_T des eaux côtières et la variation de pH (production primaire, échanges de CO_2), amenant à un découplage de la chimie des carbonates dans cette zone. Par exemple, une diminution de l'état de saturation des carbonates à cause d'une dilution par les eaux fluviales est possible sans qu'il y ait de changement dans l'équilibre acide-base. Les apports de nutriments sont également susceptibles d'augmenter la production primaire en zone côtière, influant sur le cycle du carbone et de l'azote de façon journalière ou saisonnière (Aufdenkampe *et al.* 2011). Sur certaines côtes enfin, les remontées d'eaux profondes souvent saisonnières ("upwellings") entraînent une diminution du pH et de Ω le long des côtes (Barton *et al.* 2012), induisant des événements d'acidification ponctuels dans ces habitats. En fonction de l'équilibre entre les quantités de CO_2 d'origine anthropique absorbées par les eaux côtières, l'export d'eau d'alcalinité différente, les variations en matière organique et les changements entre production primaire, respiration et calcification en lien avec les concentrations en nutriment, les écosystèmes côtiers supportent des périodes d'acidification ou d'alcalinisation à de multiples échelles de temps, indépendantes du phénomène global d'AO.

Les interactions entre le phénomène général de l'AO et les dynamiques régionales issues de différents processus intervenant dans les écosystèmes côtiers donnent lieu à des variations complexes du pH en zone côtière. Différentes études temporelles ont cependant mis en évidence que les diminutions de pH engendrées par le processus d'AO en zone côtière (0,045 et 0,02 unités pH an^{-1} ; (Wootton *et al.* 2008; Provoost *et al.* 2010) se produisent plus rapidement que dans les scénarios de l'IPCC pour l'océan global (0,0014 à 0,0019 unités pH an^{-1}).

8. Thématique et objectifs de la thèse

Les écosystèmes marins côtiers sont parmi les systèmes les plus importants de la planète aussi bien d'un point de vue écologique que socio-économique, produisant plus de 13 000 milliards de dollars de biens et services par an (Costanza *et al.* 1997). Ces écosystèmes abritent une grande diversité spécifique aux nombreuses fonctions écologiques (Harley *et al.* 2006). De nombreuses espèces d'intérêt commercial (ex : huitres, moules) s'y développent, engendrant des modifications écologiques des systèmes (Dumbauld *et al.* 2009).

Avec des variations de pH journalières excédant parfois l'unité pH dans certains habitats, les zones côtières présentent des patrons de pH beaucoup moins stables que l'océan ouvert et le concept d'acidification des océans est difficilement transposable directement à ces habitats (Duarte *et al.* 2013). En zone intertidale par exemple, le pH dans les cuvettes de l'estran peut varier de 7,8 de nuit à 9,1 de jour en fonction de la production des macroalgues (Middelboe & Hansen 2007). L'impact de l'AO sur les organismes côtiers est beaucoup plus difficile à prédire que pour les espèces hauturières car, dans les habitats côtiers, la chimie des carbonates peut être très variable, les conditions auxquelles sont exposés les organismes sont plus difficiles à mesurer et la sensibilité des organismes peut varier sous l'interaction de différents facteurs de stress abiotiques.

Dans un contexte scientifique où la quantité de publications concernant l'acidification des océans suit une croissance exponentielle (Gattuso & Hansson 2011), cette thèse s'attache à étudier plus spécifiquement les réponses de deux taxons calcifiants clé des écosystèmes benthiques tempérés : les algues calcaires de la famille des Corallinacées et les mollusques. Les Corallinacées se développent en forte concentration sur de grandes surfaces constituant l'une des communautés de macrophytes les plus importantes en termes de couverture spatiale (Foster 2001). Ces algues calcaires ont un rôle majeur dans la production primaire et l'accumulation de carbonates en milieu côtier (Bosence & Wilson 2003; Martin *et al.* 2005; Bensoussan & Gattuso 2007; Martin *et al.* 2007b; Amado-Filho *et al.* 2012; Basso 2012). D'autre part, les mollusques représentent le groupe d'invertébrés majoritaire en termes d'abondance en milieu côtier tempéré et ils y sont les principaux producteurs de CaCO_3 (Gutiérrez *et al.* 2003). Or, il a été mis en évidence que ces deux groupes taxonomiques semblaient les plus sensibles au phénomène d'AO parmi les organismes marins (Kroeker *et al.* 2013c). Il a donc paru intéressant d'étudier l'impact de l'AO sur ces deux taxons majeurs

des zones côtières où les variations de $p\text{CO}_2$ et pH sont beaucoup plus variables que dans l'océan ouvert.

Bien que les recherches se dirigent aujourd'hui de plus en plus vers l'étude des impacts de l'AO à un niveau communautaire (Hale *et al.* 2011; Olabarria *et al.* 2013; Vaz-Pinto *et al.* 2013) et si possible *in situ* (Fabricius *et al.* 2011; Kroeker *et al.* 2011; Porzio *et al.* 2011; Kroeker *et al.* 2012; Kroeker *et al.* 2013a; Porzio *et al.* 2013), les expériences mono-spécifiques en laboratoire permettent de mesurer les réponses physiologiques et métaboliques des organismes afin de comprendre les mécanismes contrôlant ces réponses (Clark *et al.* 2013). Ce type d'études permet aussi de comprendre les différences de résistances au pH en fonction de l'adaptation et de l'acclimatation aux variations abiotiques du milieu de vie (Hofmann & Todgham 2010). Elles permettent enfin de déterminer les différences de sensibilités entre les phases du cycle de vie, ainsi que d'observer les répercussions de la diminution de pH/augmentation de $p\text{CO}_2$ d'une phase du cycle de vie à la suivante ou d'une génération à l'autre (Dupont *et al.* 2010a; Parker *et al.* 2012).

Ce travail de thèse est centré sur deux modèles principaux d'organismes calcifiants compte tenu de leur abondance et de leurs importances écologique et économique dans le secteur Manche-Atlantique : les algues calcaires Corallinacées, avec un focus sur le maërl (*Lithothamnion corallioides*), et la crépidule (*Crepidula fornicata*), mollusque gastéropode invasif.

➤ Les études sur les réponses physiologiques des Corallinacées tempérés à l'AO étant encore peu nombreuses, le premier objectif de ce travail de thèse a été d'étudier les variations des taux physiologiques individuels de différentes algues Corallinacées des côtes bretonnes sous différents scénarios de $p\text{CO}_2$ prévues pour la fin du siècle. Les Corallinacées sont largement réparties depuis le haut de l'estran jusqu'en zone subtidale, expérimentant ainsi naturellement d'amples variations de pH. Dans un premier temps ce travail a donc cherché à mettre en évidence différentes sensibilités à la diminution de pH au sein d'un même taxon mais sur des espèces vivant dans des milieux de vie contrastés. Dans un second temps, il s'est focalisé sur une espèce d'intérêt économique, écologique et patrimonial en Bretagne, le maërl qui forme une importante biocénose en zone côtière tempérée. Les réponses physiologiques de cette espèce ont été étudiées sous différentes conditions croisées d'augmentation de $p\text{CO}_2$ et de température.

➤ La crépidule est une espèce invasive en Europe dont l'introduction a eu des conséquences écologiques importantes sur les communautés indigènes. Elle forme sur les côtes bretonnes des populations très denses générant des flux de carbone, de carbonates et d'azote susceptibles d'influencer les écosystèmes des baies et estuaires où elle s'est établie. Le deuxième objectif de cette thèse vise à comprendre les réponses physiologiques de la crépidule à l'AO afin de déterminer sa résistance et son potentiel maintien dans des conditions de $p\text{CO}_2$ élevée. Cette espèce à cycle de vie benthopélagique particulier est aussi un modèle idéal pour étudier la sensibilité de différentes phases du cycle de vie à une diminution de pH et comprendre les potentiels changements démographiques engendrés par l'AO. Dans ce cadre, différents processus physiologique ont été étudiés chez des larves et des adultes soumis à différents traitements de $p\text{CO}_2$ et de température.

PARTIE 1

Impact de l'acidification des océans sur les algues Corallinacées des milieux côtiers tempérés



PARTIE 1

Impact de l'acidification des océans sur les algues Corallinacées des milieux côtiers tempérés

Dans cette première partie, l'impact de l'acidification des océans sur les algues rouges calcaires de la famille des Corallinacées a été mesuré par son effet sur les réponses de différents processus physiologiques : la photosynthèse, la respiration et la calcification. Dans un premier temps, les effets de l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ ont été testés sur des algues corallinacées de morphologies variées, provenant d'habitats où les variations physico-chimiques diffèrent. Dans un deuxième temps, l'étude s'est focalisée sur une espèce clé des écosystèmes côtiers bretons, le maërl. Au cours de cette étude monospécifique, les effets couplés de l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ et de la température prévue dans un contexte de changement global ont été pris en compte afin d'extrapoler les résultats quant au devenir des bancs de maërl en Bretagne. Cette partie est divisée en différents chapitres :

Chapitre 1 : Généralités et physiologie des Corallinacées

Chapitre 2 : Réponses des algues Corallinacées des milieux côtiers tempérés à l'acidification des océans.

- *Article n°1: Noisette F, Egilsdottir H, Davoult D, Martin S (2013) Physiological responses of three temperate coralline algae from contrasting habitats to near-future ocean acidification. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 448 : 179-187*
- *Article n°2: Noisette F, Duong G, Six C, Davoult D, Martin S (2013) Effects of elevated $p\text{CO}_2$ on the metabolism of a temperate rhodolith *Lithothamnion corallioides* grown under different temperatures. J. Phycol. 49: 746-757*

Chapitre 3 : Synthèse générale sur l'impact de l'acidification des océans sur les Corallinacées en zone côtière

Chapitre 1 : Généralités et physiologie des Corallinacées

1. Caractéristiques écologiques

Parmi les Rhodophycées, les Corallinacées sont un groupe d'algues rouges calcaires représentant la majorité des espèces algales calcifiantes actuelles (Figure I1-1). Apparues au début du Crétacé, elles se sont ensuite progressivement développées jusqu'à atteindre un pic de diversité au cours du Miocène. Elles sont considérées comme un élément clé des cycles du carbone et des carbonates depuis le Cénozoïque (Basso 2012).

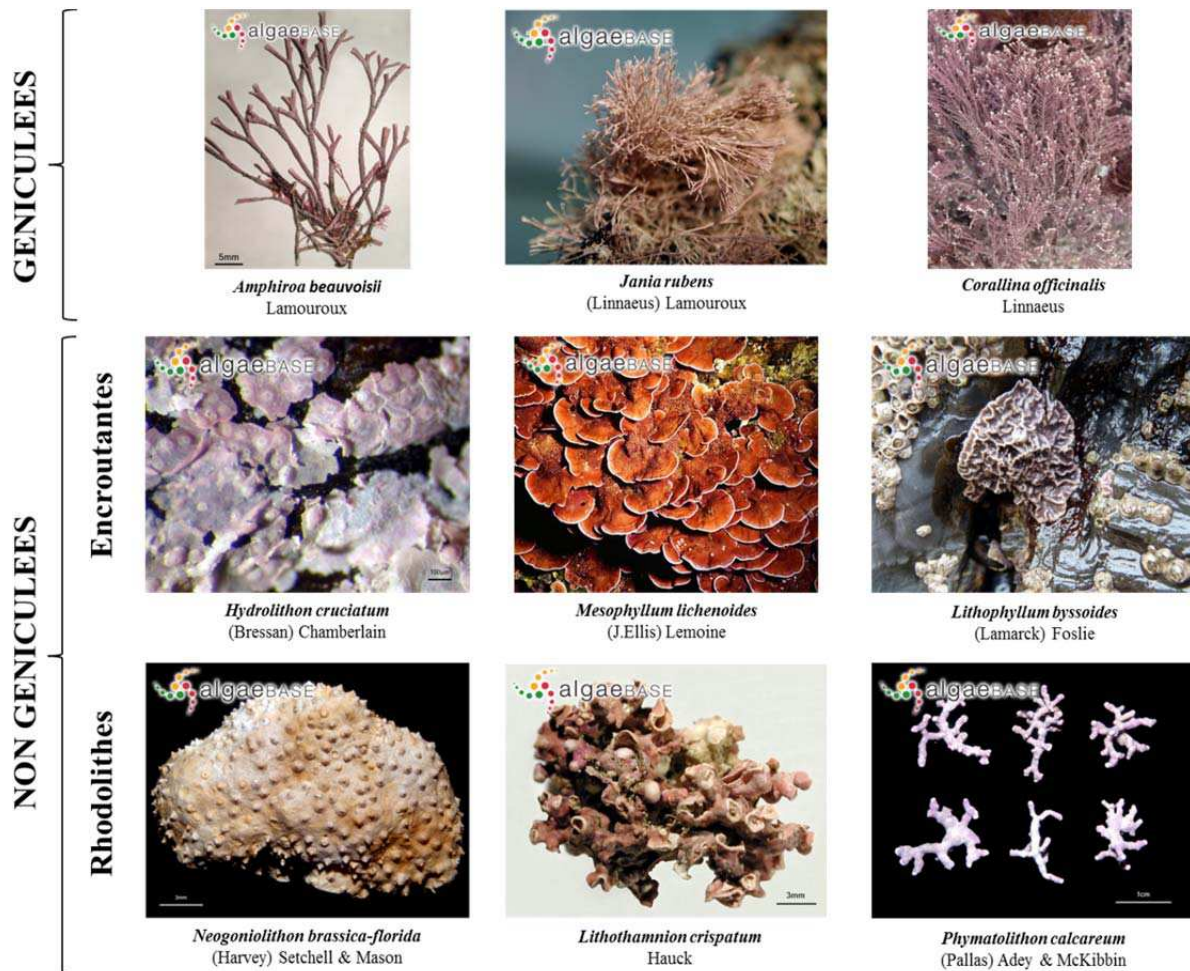


Figure I1-1: Différents morphotypes et espèces de Corallinacées tempérées actuelles. Source : algaeBASE

Les Corallinacées présentent une hétérogénéité morpho-fonctionnelle sans valeur taxonomique (Cabioch 1988) caractérisée par deux groupes: les Corallinacées géniculées et non-géniculées. Les algues géniculées sont des algues articulées, branchues, dont les thalles

sont composés de segments flexibles non calcifiés alternant avec des articles calcifiés complètement rigides (Figure I1-1). Les algues non géniculées sont des algues non articulées au thalle complètement rigide. Elles peuvent se développer sur des substrats durs comme algues calcaires encroûtantes (ACE) ou exister sous forme libre sans substrat d'attache, ce sont les rhodolithes (Figure I1-1). Alors que les géniculées se disloquent en particules fines après leur mort et sont quasiment indétectables dans les archives géologiques, les corallines non géniculées s'intègrent presque dans leur intégralité sous forme de fossiles dans les couches géologiques. La très large répartition des Corallinacées ainsi que leur fonctionnement très homogène suggèrent un mode de vie très stable à travers les ères géologiques (Giraud & Cabioch 1979) c'est-à-dire de faibles variations dans le type de milieu colonisé et le fonctionnement physiologique.

Les Corallinacées sont très abondantes et diversifiées dans tous les océans. Aucun autre groupe de macroalgues n'occupe une gamme d'habitats aussi variée (Steneck 1986). Présentes des pôles jusqu'aux zones tropicales, elles se développent à toutes les profondeurs de la couche photique. Ce sont d'ailleurs souvent les dernières algues pluricellulaires rencontrées en profondeur (Giraud & Cabioch 1979; Steneck 1986). Elles atteignent jusqu'à une centaine de mètres de profondeur dans les eaux très claires des milieux tropicaux avec un maximum relevé à 268 mètres (Littler *et al.* 1985). Les Corallinacées ont des rôles biologiques et écologiques majeurs dans les milieux qu'elles colonisent (Nelson 2009). Elles sont considérées comme espèces ingénieures de certains écosystèmes (coralligène, bancs de maërl) et comme des producteurs majeurs de CaCO_3 , en particulier dans les zones polaires et tempérées (Nelson 2009; Basso 2012). Elles offrent de nombreux services écologiques comme la consolidation des récifs coralliens (Adey 1998), des zones de recrutement et de nurseries pour les invertébrés et poissons (Kamenos *et al.* 2004b; Kamenos *et al.* 2004a; Neo *et al.* 2009) et fournissent des microhabitats pour la faune et la flore benthiques (Foster 2001; Grall *et al.* 2006).

Les Corallinacées précipitent du carbonate de calcium (CaCO_3) pour former leur thalle calcaire ce qui leur confère différents avantages comme un squelette solide, une protection contre les brouteurs et une résistance à l'hydrodynamisme (Nelson 2009). Ces organismes autotrophes utilisent donc le carbone inorganique dissous (CID : $\text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-} + \text{CO}_2$) à la fois comme substrat pour la photosynthèse mais aussi pour la calcification. Ces processus semblent donc être intimement liés par une source commune tout en ayant sous certaines conditions des voies découplées.

2. Photosynthèse et acquisition du carbone

2.1 Utilisation du carbone dans la photosynthèse

Le processus photosynthétique permet de former des sucres ($C_6H_{12}O_6$) et de l'oxygène (O_2) à partir de gaz carbonique (CO_2) et d'eau (H_2O) selon la formule suivante :



Les réactions chimiques du cycle de Calvin permettent la transformation du CO_2 en sucre. Parmi les différents types de voies métaboliques existantes (C_3 , C_4 , métabolisme acide crassuléen appelé CAM), la très grande majorité des algues (> 85 %) utilisent la voie en C_3 (Koch *et al.* 2013) dont la première étape est la fixation du CO_2 par carboxylation sur un ribulose 1,5 bisphosphate, catalysé par une enzyme, la ribulose-1,5-biphosphate-carboxylase-oxygénase (RubisCO). La RubisCO est également capable de catalyser la réaction de photorespiration utilisant l'oxygène pour lequel elle a une plus grande affinité pour produire du CO_2 en dégradant la matière organique. Le ratio CO_2/O_2 au niveau du site actif de la RubisCO conditionne son activité carboxylase ou oxygénase. Aux concentrations actuelles de CO_2 , la faible affinité de la RubisCO pour le CO_2 (Israel & Hophy 2002) ne permet pas de la saturer pour moitié chez la majorité des algues (Giordano *et al.* 2005). Cependant, diverses formes de RubisCO existent parmi les différentes familles algales. Les Rhodophycées présentent la RubisCO de forme 1D qui a la meilleure sélectivité pour le CO_2 parmi toutes les formes existantes de cette enzyme (Raven & Beardall 2003).

L'acquisition du carbone nécessaire à la photosynthèse chez les algues et en particulier chez les Rhodophycées marines peut se faire par différentes voies ou processus, de la diffusion passive du CO_2 à travers les parois et membranes au transport actif du carbone par le biais de mécanismes de concentration de carbone (CCM) (Raven & Beardall 2003).

2.2 Diffusion passive du CO_2

L'acquisition de carbone par diffusion passive du CO_2 est conditionnée par la perméabilité des membranes cellulaires à la diffusion des gaz. Peu d'espèces algales utilisent exclusivement ce processus pour acquérir du carbone. En effet, la diffusion passive du CO_2 ne

permet pas d'avoir un ratio CO_2/O_2 optimal afin de maximiser la fonction carboxylase de la RubisCO (Raven *et al.* 2005).

En milieu marin, les espèces utilisant uniquement la diffusion passive du CO_2 se rencontrent principalement dans les habitats où des facteurs abiotiques limitent la photosynthèse. Ce sont notamment les milieux profonds où peu de lumière pénètre et où la température reste faible avec une moyenne annuelle inférieure ou égale à 18°C (Raven & Beardall 2003; Hepburn *et al.* 2011). Par exemple, sous faible irradiance constituant un facteur limitant, l'entrée du carbone par diffusion passive est suffisante au fonctionnement réduit de la RubisCO et ne nécessite pas la mise en place de CCMs coûteux en énergie pour optimiser la photosynthèse (Raven & Beardall 2003; Raven *et al.* 2005).

2.3 Mécanismes de concentration de carbone (CCMs)

La grande majorité des algues possède des CCMs. Ces mécanismes permettent d'augmenter la concentration en CO_2 autour de la RubisCO à des concentrations bien plus élevées que celle du milieu externe. Cette forte augmentation de CO_2 permet d'augmenter le ratio CO_2/O_2 au niveau du site de la RubisCO, maximisant la fonction carboxylase de cette enzyme et augmentant ainsi l'affinité photosynthétique pour le CO_2 de tout l'organisme.

Différentes voies de fonctionnement des CCMs ont été décrites dans la littérature (Raven & Beardall 2003) :

- par transport actif de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ à travers les membranes,
- par création d'un compartiment acide où le HCO_3^- se transforme en CO_2 qui diffuse ensuite vers un compartiment plus alcalin où il est utilisé par la RubisCO.
- par pompage actif du CO_2 par des processus biochimiques analogues aux voies C_4 ou CAM des plantes supérieures. Ces mécanismes ne seront pas développés ici car ils sont pour l'instant uniquement suggérés chez certaines espèces des genres *Udotea* et *Thalassiosira* (Raven & Beardall 2003; Raven *et al.* 2012).

a- Transport actif de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ à travers les membranes

La plupart des CCMs présents dans les algues sont basés sur un transport actif du HCO_3^- et/ou du CO_2 à travers une ou plusieurs membranes séparant le milieu externe du site de la RubisCO (Giordano *et al.* 2005) (Figure I1-2). Contrairement à la diffusion passive du CO_2 , ce mécanisme implique que les membranes traversées aient une faible perméabilité aux

différentes formes de carbone composant le CID (Raven & Beardall 2003). Le transport actif du CID peut être effectué à travers la membrane plasmique et/ou la membrane interne des plastides. L'équilibre entre le CO_2 et le HCO_3^- dans les différents compartiments de la cellule (cytoplasme, stroma, lumière du thylakoïde) peut impliquer ou non différentes anhydrases carboniques internes (Giordano *et al.* 2005).

Une anhydrase carbonique externe (sécritée dans la paroi cellulaire) peut catalyser la conversion du HCO_3^- en CO_2 à l'extérieur de la cellule et ainsi créer un gradient favorable à la diffusion du CO_2 vers le milieu intracellulaire (Figure I1-2). Cette anhydrase carbonique est pH-dépendante et est généralement plus efficace quand le pH de la couche limite de diffusion est bas (Koch *et al.* 2013). Même si la plupart des macroalgues semblent posséder cette anhydrase carbonique externe, elle apparaît plus rare parmi les Rhodophycées (Koch *et al.* 2013).

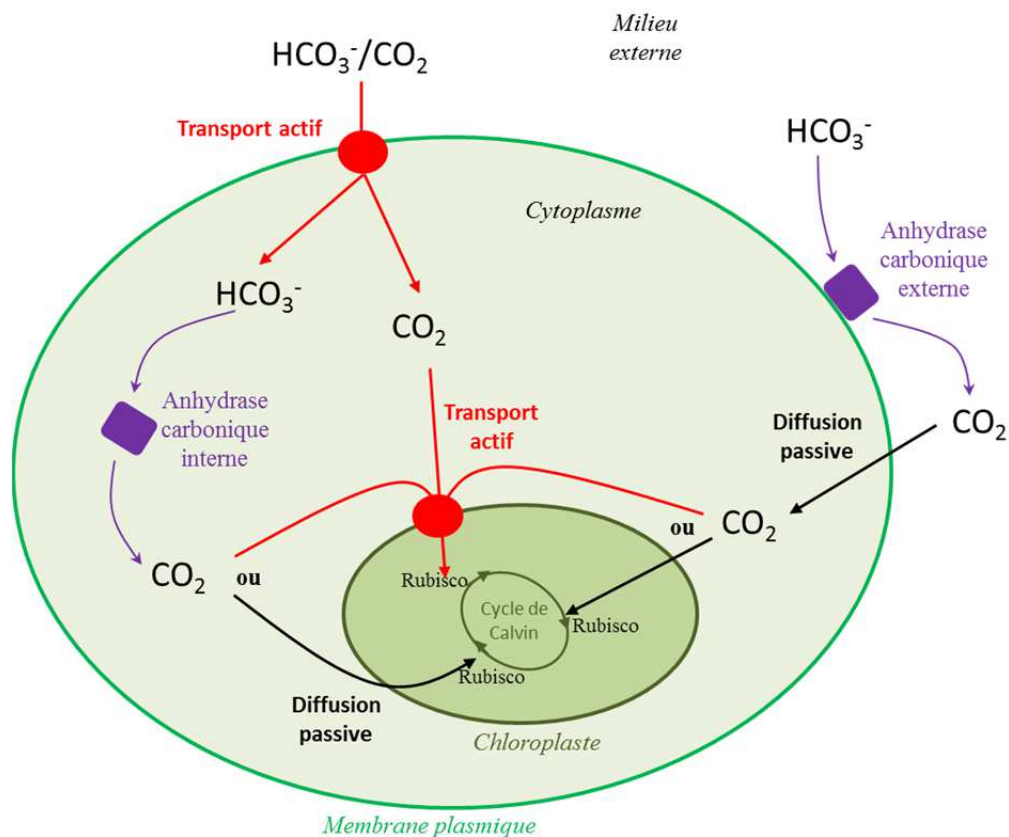


Figure I1- 2: Schéma récapitulatif de l'acquisition du carbone par diffusion passive et par des mécanismes de concentration de carbone utilisant le transport actif de HCO_3^- et CO_2 à travers les membranes. Les procédés passifs sont représentés par les flèches noires alors que ceux qui nécessitent un transport actif utilisant de l'énergie sont en rouge. Les flèches violettes représentent une conversion des formes de carbone par la voie d'une enzyme, l'anhydrase carbonique.

b- Succession de compartiments acide et alcalin

Un deuxième type de CCM utilise différents compartiments (acide et alcalin) pour transformer le HCO_3^- en CO_2 à des concentrations plus élevées que dans le milieu externe (Figure I1-3). Comme pour la diffusion passive du CO_2 et à l'inverse du premier type de CCM présenté, les différentes membranes traversées doivent être perméables aux différentes espèces de CID pour que le fonctionnement soit optimal. Le HCO_3^- d'un milieu ou compartiment alcalin est transporté vers un compartiment où le pH est maintenu plus acide grâce à une pompe à protons (Raven & Beardall 2003). Dans ce compartiment plus acide, l'équilibre $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ est plus élevé que dans le milieu précédent. Le HCO_3^- est alors transformé en CO_2 par une anhydrase carbonique stable à bas pH ou par une catalyse protonique dans des compartiments plus grands (Giordano *et al.* 2005). Le CO_2 produit à des concentrations élevées dans le compartiment plus acide diffuse ensuite vers le compartiment adjacent plus alcalin où se trouve la RubisCO. Ce mécanisme est d'autant plus efficace quand le compartiment contenant la RubisCO ne contient pas d'anhydrase carbonique.

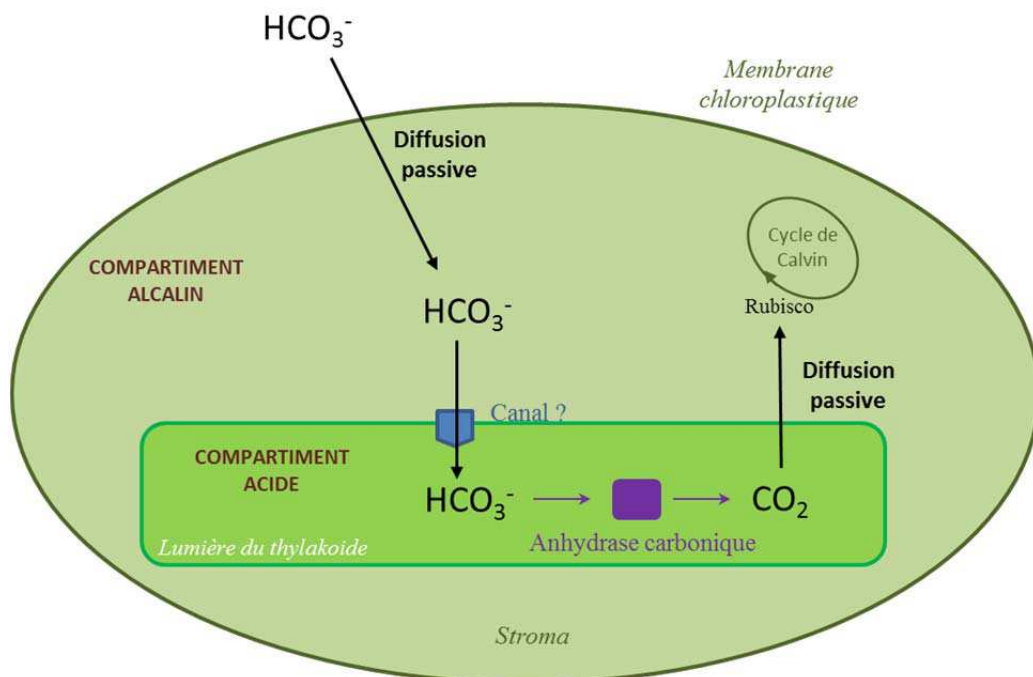


Figure I1-3: Schéma récapitulatif de l'acquisition du carbone par des mécanismes de concentrations de carbone utilisant une succession de compartiments alcalins et acides. Les procédés passifs sont représentés par les flèches noires. Les flèches violettes représentent une conversion des formes de carbone par la voie d'une enzyme, l'anhydrase carbonique. L'existence d'un canal permettant le passage des ions HCO_3^- d'un compartiment à l'autre n'a pas encore été scientifiquement établi.

2.4 Contrôle abiotique de l'acquisition de carbone

Suivant les conditions abiotiques du milieu (lumière, concentration en CO₂ ...), l'acquisition de carbone par le biais des CCMs peut être complétée ou complètement remplacée par la diffusion passive du CO₂ à travers les membranes cellulaires (Hepburn *et al.* 2011 ; Koch *et al.* 2013). Par exemple, à forte lumière et sans limitation de nutriments, les CCMs coûteux en énergie peuvent être exploités au maximum afin d'assurer une croissance optimale (Hepburn *et al.* 2011). Sous une lumière moins importante, ces CCMs peuvent être sous régulés et relayés par une diffusion passive plus importante afin d'économiser de l'énergie (Hurd *et al.* 2009; Cornwall *et al.* 2012). Les limitations en carbone et azote peuvent aussi directement impacter l'activité des CCMs. Tout facteur environnemental (pH, température, salinité, etc) affectant les concentrations de CID ou leur spéciation dans le milieu externe de l'algue est susceptible de modifier l'expression phénotypique des CCMs.

3. Processus de calcification

Les Corallinacées précipitent de la calcite magnésienne (Mg-calcite) avec une très forte variabilité de la minéralogie suivant les espèces. Les teneurs en magnésium varient entre 9 et 25 % avec une majorité des espèces présentant plus de 12 % de magnésium dans leur calcite (Smith *et al.* 2012). La précipitation du CaCO₃ a lieu dans les parois des cellules des Corallinacées qui sont donc complètement calcifiées par ces dépôts carbonatés, hormis les cellules reproductives et les cellules externes de l'épithélium (Figure I1-4A). Cette calcification cellulaire se fait en plusieurs temps : une "couche primaire", composée de cristaux allongés de Mg-calcite est d'abord déposée parallèlement à la surface de la paroi cellulaire. Puis une couche secondaire de ces mêmes cristaux est placée perpendiculairement à la surface de la cellule (Cabioch 1988). Chez ces algues à thalle souvent épais, la région externe du thalle recevant les rayons lumineux est constituée de cellules pigmentées et photosynthétiques alors que les réserves amyloïdes s'accumulent dans la région interne non photosynthétique du thalle (Giraud & Cabioch 1979) (Figure I1-4B).

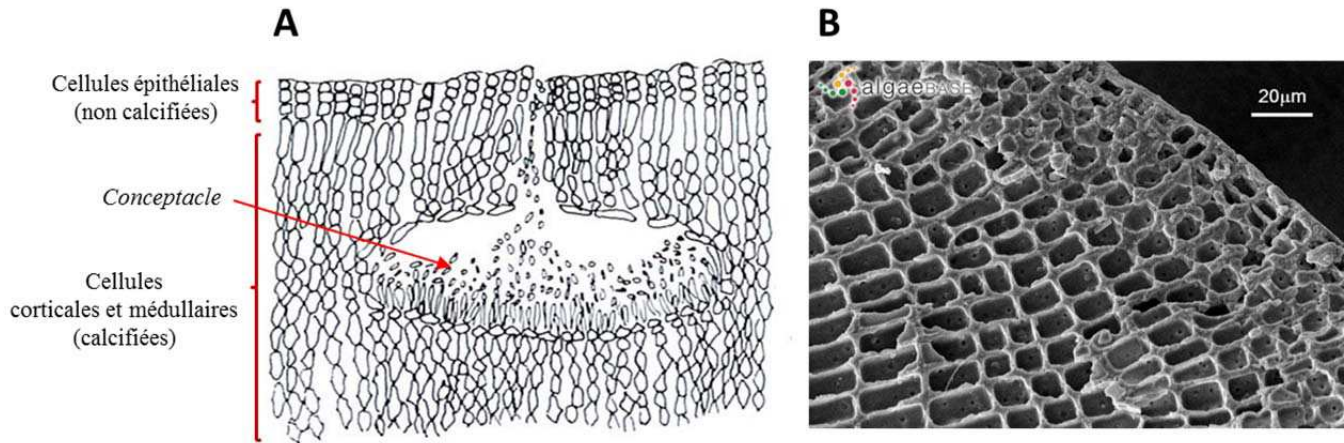
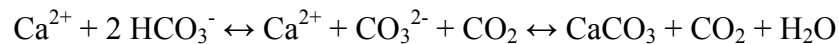


Figure II-4: Thalle calcifié chez les Corallinacées. A : Coupe longitudinale dans un thalle de *Lithophyllum incrustans* montrant les différents types de cellules du thalle calcaire (d'après (Irvine & Chamberlain 1994)). B : Cellules à paroi calcifiée de *Lithophyllum incrustans* - source : algaeBASE

Le processus de précipitation du CaCO_3 , qui s'effectue selon la formule suivante est chimiquement contrôlé par l'état de saturation en carbonate de calcium de l'eau de mer Ω . Lorsque Ω est supérieur à 1, la calcification prévaut alors que lorsque Ω est inférieur à 1, c'est la dissolution qui est favorisée.



Les mécanismes spécifiques contrôlant la calcification et la dissolution biogéniques chez les macroalgues calcaires n'ont été que peu étudiés à l'exception de quelques genres comme *Halimeda*, *Chara* et quelques Corallinacées (Koch *et al.* 2013).

Chez les Corallinacées (Figure II-5), la présence de substrats organiques (polysaccharides et fibrilles) conditionne la précipitation des carbonates dans la paroi cellulaire suivant un modèle de calcification dit "induit par une matrice organique" (Koch *et al.* 2013). Ces substrats organiques se lient avec des ions calcium (Ca^{2+}) pour former des sites de nucléation favorisant la calcification (Koch *et al.* 2013). Leur contrôle serait aussi à l'origine du polymorphisme de la calcite précipitée dans les parois. Ce contrôle biochimique de la calcification pourrait expliquer les phases de décalcification, appelées desquamation, qui se produisent pour favoriser la perte des cellules épidermiques de surface et la croissance apicale des Corallinacées (Cabioch 1971). L'utilisation du CO_2 par la photosynthèse (induite par la diffusion du CO_2 ou la déshydratation du HCO_3^- en CO_2 par une anhydrase carbonique)

et l'excrétion des H^+ par des pompes à protons déplacent l'équilibre des carbonates vers le CO_3^{2-} et favorise donc la précipitation du $CaCO_3$.

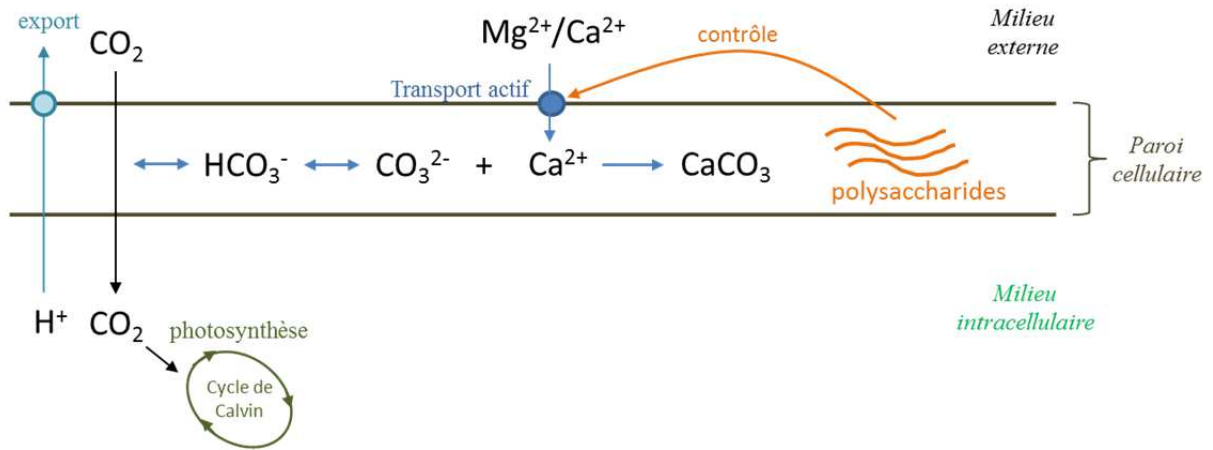


Figure II-5: Schéma récapitulatif des processus de calcification dans la paroi cellulaire des Corallinacées. La calcification se déroule dans la paroi cellulaire et est induite par des polysaccharides.

4. Couplage entre photosynthèse, respiration et calcification

Photosynthèse, respiration et calcification sont des processus physiologiques liés qui s'influencent les uns les autres (Borowitzka 1981; Martin *et al.* 2013b). La calcification est plus importante de jour que de nuit (Borowitzka 1981; Gao *et al.* 1993; Martin *et al.* 2013a; Martin *et al.* 2013b) : alors que les taux de calcification de nuit sont proportionnels à la concentration en CO_3^{2-} de jour, la photosynthèse fournit un "effet vital" qui augmente les taux de calcification (Borowitzka 1981).

Par son utilisation du CO_2 , la photosynthèse crée un environnement pH favorable à la calcification au niveau intracellulaire mais aussi dans la couche limite de diffusion (Hurd *et al.* 2011; Cornwall *et al.* 2013a). Comeau *et al.* (2013) ont décrit les réactions liant les processus de photosynthèse et de calcification sur un modèle d'algue calcaire pouvant utiliser le HCO_3^- et dotée d'anhydrase carbonique (Figure II-6). A la lumière, le processus de photosynthèse utilise différentes sources de CO_2 : (i) du CO_2 provenant du milieu extérieur, (ii) du CO_2 issu de la respiration et (iii) du CO_2 converti par une anhydrase carbonique depuis

le HCO_3^- transporté à travers la paroi cellulaire par des symports $\text{HCO}_3^-/\text{H}^+$ (voir définition dans la légende de la figure II-6). La photosynthèse produit des ions OH^- qui diffusent dans la paroi cellulaire où ils vont induire une augmentation du pH et de l'état de saturation des carbonates, favorisant ainsi l'augmentation de la concentration des ions CO_3^{2-} et de ce fait la précipitation du CaCO_3 . Dans ce modèle, l'augmentation de la concentration des ions CO_3^{2-} stimule directement le processus de calcification. L'augmentation de la concentration en HCO_3^- augmente quant à elle la photosynthèse, qui à son tour, stimule indirectement la calcification.

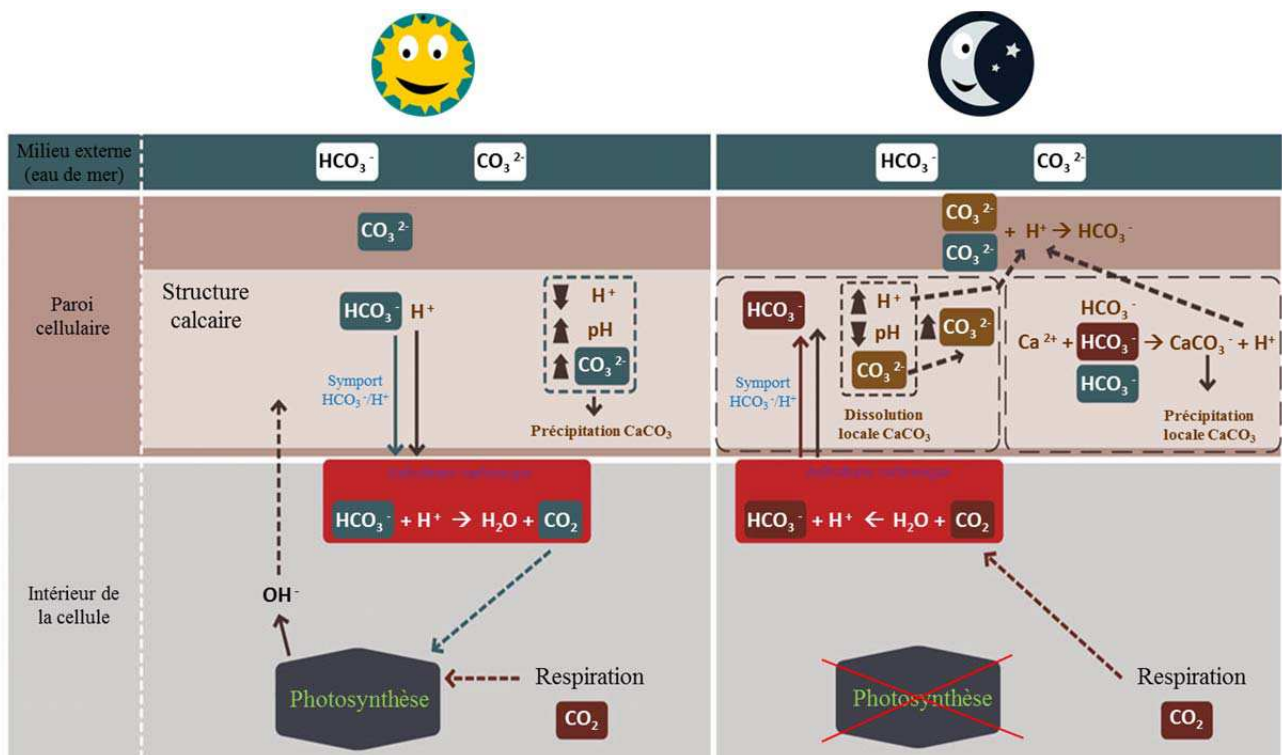


Figure II-6: Schéma conceptuel de la calcification chez les Corallinacées (Comeau *et al.* 2013) décrivant les interactions calcification/respiration/photosynthèse chez les algues calcaires tropicales. Symport : protéine transmembranaire servant de co-transporteur ; anhydrase carbonique : enzyme catabolisant la transformation des formes de carbone.

A l'obscurité (Figure II-6), seul le processus de respiration a lieu, générant du CO_2 à l'intérieur de la cellule. Ceci entraîne une diminution de pH à l'intérieur de la cellule (De Beer & Larkum 2001) mais aussi dans la couche limite de diffusion (Hurd *et al.* 2011; Cornwall *et al.* 2013a). Les ions H^+ issus de l'hydratation du CO_2 (issu de la respiration) par l'anhydrase carbonique passent dans la paroi cellulaire par un symport où ils vont s'associer aux ions CO_3^{2-} pour former des HCO_3^- , entraînant des dissolutions locales de CaCO_3 . Ces dissolutions

sont contrebalancées par des précipitations locales de CaCO_3 issues de la liaison entre les ions Ca^{2+} et HCO_3^- . Les ions HCO_3^- et CO_3^{2-} retrouvés dans la paroi cellulaire proviennent (i) de la transformation du CO_2 issu de la respiration par l'anhydrase carbonique, (ii) de l'eau de mer environnante et (iii) de la dissolution localisée du thalle calcaire. Comme à la lumière, les concentrations en ions HCO_3^- et CO_3^{2-} influent sur la calcification à l'obscurité mais la concentration en CO_3^{2-} joue un rôle majeur dans la limitation de la dissolution du CaCO_3 en tamponnant les ions H^+ relâchés.

Pour résumer, la famille des Rhodophycées est la famille algale comptant le plus d'espèces acquérant leur CID pour la photosynthèse uniquement par diffusion passive du CO_2 à travers leurs membranes avec une forte affinité pour le CO_2 . De plus, beaucoup d'entre elles ne possèdent pas d'anhydrase carbonique externe permettant la conversion de HCO_3^- en CO_2 à l'extérieur de la paroi. Les Corallinacées précipitent une calcite hautement magnésienne qui fait partie des formes les plus solubles de CaCO_3 et donc potentiellement très sensible à la diminution de Ω . Ces différents éléments suggèrent que les Corallinacées pourraient avoir des réponses bien spécifiques et différentes des autres macroalgues face à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ prévue dans un contexte d'acidification des océans.

Chapitre 2 : Réponses des algues Corallinacées des milieux côtiers tempérés à l'acidification des océans

1. Etat de l'art sur les réponses des Corallinacées à l'AO

Les Corallinacées ont un rôle majeur dans la formation, la consolidation et le maintien des structures physiques des récifs coralliens qui constituent un habitat complexe abritant une forte biodiversité (Adey 1998). C'est donc dans ces milieux à haute valeur écosystémique, déjà étudiés dans un contexte de réchauffement climatique, que les premières expériences testant l'impact de l'AO sur les Corallinacées ont été menées (Gattuso & Hansson 2011). Les études sur les effets de l'AO sur les communautés récifales datant d'avant 2009 ont mis en évidence une forte diminution de la photosynthèse et de la calcification des algues Corallinacées dans des conditions de $p\text{CO}_2$ élevées (Leclercq *et al.* 2000; Langdon *et al.* 2003; Anthony *et al.* 2008; Jokiel *et al.* 2008). Un phénomène de blanchissement des thalles, accentué par l'augmentation de la température a également été observé sur l'espèce encroûtante *Porolithon onkodes* (Anthony *et al.* 2008). Les impacts physiologiques de l'AO ont constitué l'objet d'étude de la majorité des expérimentations sur les Corallinacées tropicales. Cependant, le recrutement, l'abondance et le recouvrement des algues calcaires et non calcaires ont également été mesurés dans des conditions de faible pH dans une perspective de changements de communauté sous AO (Kuffner *et al.* 2008). La majorité des études actuelles et menées depuis 2009 sur les Corallinacées portent toujours sur des espèces tropicales (Semesi *et al.* 2009b; Semesi *et al.* 2009a; Anthony *et al.* 2011; Diaz-Pulido *et al.* 2012; Doropoulos *et al.* 2012; Johnson & Carpenter 2012; Comeau *et al.* 2013) faisant des récifs coralliens un des milieux les mieux étudiés et dont les impacts de l'AO sont les mieux connus (Anthony *et al.* 2011; Jokiel 2011; Anthony *et al.* 2013).

Les études de l'impact de l'AO sur les Corallinacées des milieux polaires sont en revanche beaucoup plus rares. Seules les réponses physiologiques et structurelles de l'espèce de rhodolithe *Lithothamnion glaciale* ont été étudiées à ce jour dans des conditions d'augmentation de la $p\text{CO}_2$ (Büdenbender *et al.* 2011; Ragazzola *et al.* 2012; Ragazzola *et al.* 2013).

Dans les écosystèmes tempérés, les algues de la famille des Corallinacées sont moins étudiées que dans les milieux tropicaux alors qu'elles sont des organismes calcifiants majeurs des communautés benthiques tempérées côtières. Sur les quatre grands ensembles de macrophytes décrits par Foster (2001) – forêts de kelps, herbiers à phanérogames, bancs de rhodolithes et récifs d'algues calcaires encroûtantes – deux d'entre eux sont formés par des algues de la famille des Corallinacées, soulignant leur rôle d'espèces ingénieur de l'écosystème. Elles ont des rôles écologiques majeurs en terme de formation d'habitat, de protection de la sous canopée en zone intertidale (pour les géniculées) (Nelson 2009), de recrutement des juvéniles d'invertébrés et de nurseries de juvéniles de poissons (Kamenos *et al.* 2004b; Kamenos *et al.* 2004a). Ces algues calcaires tempérées sont également d'importants contributeurs aux flux de nutriments (Martin *et al.* 2007a) ainsi qu'au cycle du carbone et des carbonates des zones côtières par leur production et dissolution de CaCO_3 (Martin *et al.* 2007b; Amado-Filho *et al.* 2012; Basso 2012). Un tiers de la production totale actuelle de carbonates dans les océans proviendrait des milieux côtiers non tropicaux et seraient essentiellement composée de Corallinacées (Nelson 2009). De plus, il a récemment été montré que les communautés de Corallinacées de l'Atlantique Nord Est étaient parmi les habitats marins produisant le plus de dimethylsulfoniopropionate (DMSP), composé soufré produit par les macroalgues et précurseur des gaz dimethylsulfide (DMS) jouant un rôle dans le changement climatique (Kamenos *et al.* 2008).

L'augmentation de la $p\text{CO}_2$ est susceptible d'impacter la diversité et le fonctionnement des communautés de Corallinacées, induisant des changements dans leur contribution aux flux globaux en zone côtière. De plus en plus d'études se focalisent sur des espèces de Corallinacées tempérées, à travers une approche physiologique prenant en compte le rythme saisonnier des espèces (Martin & Gattuso 2009; Burdett *et al.* 2012; Kamenos *et al.* 2013; Martin *et al.* 2013b). Des approches à l'échelle de la communauté sont aussi de plus en plus développées en mésocosme ou sur des sites au pH naturellement bas, afin de prendre en compte les phénomènes de prédation (Asnaghi *et al.* 2013) et de compétition (Porzio *et al.* 2011; Kroeker *et al.* 2013a; Kroeker *et al.* 2013b; Porzio *et al.* 2013). Identifier les réponses en termes de sensibilité et résistance à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ de différentes espèces de Corallinacées représente un enjeu crucial pour comprendre le devenir des communautés macroalgales dans un contexte d'AO et évaluer l'impact de ces changements sur les flux biogéochimiques.

2. Effets de l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ sur trois algues Corallinacées vivants dans des milieux aux conditions physico-chimiques contrastées

2.1 Contexte général

Dans les écosystèmes marins tempérés, les Corallinacées sont le groupe d'organismes calcifiants prédominant dont les processus métaboliques ont un rôle majeur dans le bilan de carbone et carbonates des écosystèmes côtiers (Nelson 2009). Les espèces de cette famille, présentant des morphotypes variés, s'étagent depuis les cuvettes du haut de l'estran jusqu'à plusieurs mètres de profondeur. On retrouve fréquemment des espèces géciculées gazonnantes dans la zone intertidale, alors que les non géciculées, de forme encroûtante (épiphyte et épilithe) ou libre sont généralement distribuées depuis le bas de l'estran jusqu'en zone subtidale (Nelson 2009). Ces espèces colonisent des milieux où les variations physico-chimiques fluctuent en fonction des rythmes de marées et sont de ce fait exposées à différents régimes de pH (Huggett & Griffiths 1986).

Pour survivre et se développer dans des environnements variables, les organismes doivent s'acclimater ou s'adapter donnant lieu à des différences de résistance aux stress abiotiques entre différentes espèces d'une même famille. Dans un contexte d'AO, il est prédit que les espèces acclimatées naturellement à de fortes variations de pH dans leur habitat seraient plus résistantes à l'augmentation future de la $p\text{CO}_2$ que d'autres espèces vivant dans des milieux beaucoup plus stables (Raven 2011; Harley *et al.* 2012).

Afin d'observer si les réponses physiologiques des Corallinacées à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ suivent une tendance générale ou présentent des particularités spécifiques, trois espèces de Corallinacées de différents morphotypes et vivant dans des milieux aux conditions abiotiques contrastées ont été étudiées dans le premier article de ce chapitre (article 1).

2.2 Résumé de l'article n°1 :

Les effets de l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ ont été étudiés sur différentes espèces de Corallinacées provenant d'habitats aux conditions physico-chimiques variées : (i) *Corallina elongata*, une algue géciculée prélevée dans une cuvette de l'estran ; (ii) *Lithothyllum incrustans*, une algue encroûtante récoltée en bas de la zone intertidale, sous une dense

canopée à macroalgues et (iii) *Lithothamnion corallioides*, un rhodolithe (forme libre) se développant en milieu subtidal (Figure I2-1). Ces différentes espèces ont été maintenues un mois à différentes $p\text{CO}_2$: 380 μatm , condition actuelle de $p\text{CO}_2$ servant de témoin et 550, 750 et 1000 μatm , trois $p\text{CO}_2$ plus élevées correspondant à différents scénarios prédits par l'IPCC pour la fin du siècle.

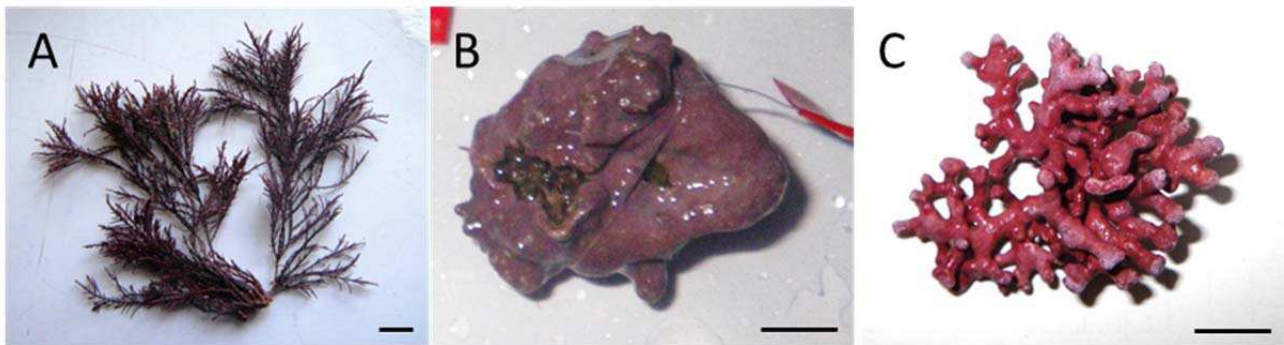


Figure I2-1: Trois espèces de Corallinacées tempérées utilisées au cours de la première expérience.

A : *Corallina elongata*, coralline géniculée formant des tapis dans les cuvettes rocheuses ou dans le bas de la zone intertidale. B : *Lithophyllum incrustans*, coralline encroûtante recouvrant le fond des cuvettes rocheuses ou se développant sur les pierres et cailloux en sous canopée dans les chenaux. C : *Lithothamnion corallioides*, rhodolithe aussi appelé maërl et formant de grand bancs en zone subtidale peu profonde. Echelle = 1 cm.

Les taux de production brute et de respiration ont été estimés chez les 3 espèces à partir de la variation de concentration en oxygène durant des incubations en chambres hermétiques (Figure I2-2A). A la fermeture des chambres, la quantité d'oxygène dissous dans l'eau était mesurée avec une fibre optique (Figure I2-2B). Durant l'incubation, les algues libéraient et consommaient (photosynthèse et respiration, respectivement) de l' O_2 de manière linéaire au cours du temps. A la fin de l'incubation, une seconde mesure à la fibre optique permettait de mesurer la concentration finale en O_2 de manière non intrusive, sans avoir besoin d'ouvrir la chambre (Figure I2-2B). Les taux de calcification à la lumière et à l'obscurité ont été estimés durant ces mêmes incubations selon la méthode d'anomalie de l'alcalinité basée sur la diminution de 2 équivalents de l'alcalinité totale (A_T) pour chaque mole de CaCO_3 précipité (Smith & Key 1975).

Alors que la production photosynthétique brute de *C. elongata* et *L. incrustans* n'a pas été affectée par la $p\text{CO}_2$, celle de *L. corallioides* a légèrement augmenté à 1000 μatm $p\text{CO}_2$. Seule la respiration de *L. incrustans* a fortement diminué en conditions de fortes concentrations de CO_2 . Les réponses de calcification sont apparues légèrement plus

contrastées. Les taux de calcification de *C. elongata* n'ont été affectés ni à la lumière ni à l'obscurité par augmentation de la $p\text{CO}_2$. A l'inverse, le stress $p\text{CO}_2$ a fortement diminué les taux de calcification chez *L. incrustans*. Enfin, la réponse de *L. corallioides* était intermédiaire, avec une calcification plus faible sous $p\text{CO}_2$ élevée à la lumière mais pas à l'obscurité. Ces réponses sont cohérentes avec les taux de magnésium mesurés dans la calcite magnésienne précipitée par ces algues. *C. elongata*, plus résistante à la diminution conjointe du pH et de l'état de saturation des carbonates, présente un ratio Mg/Ca plus faible (0,17 mol %) que les deux autres espèces (0,20 mol %) ce qui lui conférerait une solubilité inférieure. De plus, l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ a engendré un blanchissement progressif des thalles de *L. incrustans* (Figure I2-3), significatifs d'une sensibilité accrue à d'autres stress ou pathogènes.

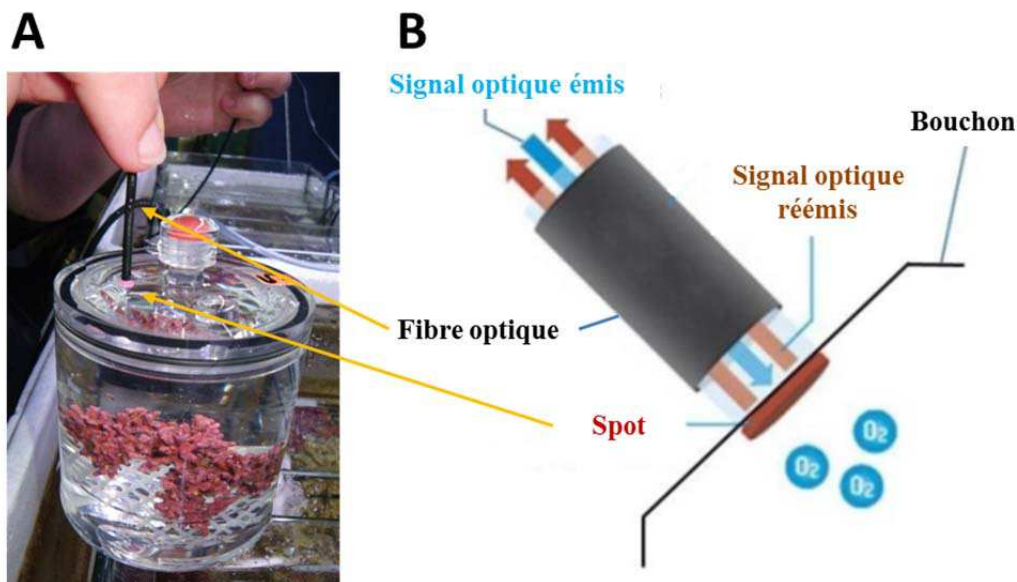


Figure I2-2: Mesures de production nette et de respiration. A : chambre respirométrique en plexiglas (Engineering & Design Plastics Ltd) dans lesquelles les algues étaient incubées plusieurs heures afin de déterminer leur métabolisme. B : fibre optique permettant de mesurer la concentration en O_2 dans l'eau sans ouvrir la chambre. La fibre optique émet un signal lumineux qui vient se réfléchir sur le spot collé à l'intérieur de la chambre. Suivant la quantité d' O_2 dissous, le signal réémis n'émet pas dans les mêmes longueurs d'onde. La différence de signal ("phase") entre l'onde émise et réfléchi est ensuite analysée par une interface numérique qui transforme le signal en concentration d'oxygène dissous.

Ces mesures métaboliques soulignent que la réponse des Corallinacées aux conditions futures d'AO est une réponse spécifique des espèces. Alors que l'hypothèse attendue était que les espèces vivant dans des milieux hypervariables soient les plus résistantes, il a été montré

que les espèces se développant en milieu dont les conditions physico-chimiques sont plus stables pouvaient aussi bien résister à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$. Ceci amène à reconsidérer la grande sensibilité des Corallinacées face à l'AO démontrée jusqu'à présent par d'autres études scientifiques.



Figure I2-3: Blanchissement des thalles de *L. incrustans* en fin d'expérience. Echelle : 1 cm

Article n° 1

Physiological responses of three temperate coralline algae from contrasting habitats to near-future ocean acidification

Fanny Noisette^{1,2}, Hronn Egilsdottir³, Dominique Davoult^{1,2}, Sophie Martin^{1,2}

¹CNRS, UMR 7144

Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29688 Roscoff Cedex, France

²UPMC Univ. Paris 6, UMR 7144

Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29688 Roscoff Cedex, France

³ Marine Research Institute, Skulagata 4, 121 Reykjavik, Iceland

University of Iceland, Faculty of Earth Science, Askja, Sturlugata 7, 101 Reykjavik, Iceland

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology

2013

448: 179-187

DOI : 10.1016/j.jembe.2013.07

Abstract

Coralline algae are major calcifiers of significant ecological importance in marine habitats but are among the most sensitive calcifying organisms to ocean acidification. The elevated $p\text{CO}_2$ effects were examined in three coralline algal species living in contrasting habitats from intertidal to subtidal zones on the north-western coast of Brittany, France: (i) *Corallina elongata*, a branched alga found in tidal rock pools, (Jorgensen *et al.*) *Lithophyllum incrustans*, a crustose coralline alga from the low intertidal zone, and (iii) *Lithothamnion corallioides* (BIOMAERL), a free-living form inhabiting the subtidal zone. Metabolic rates were assessed on specimens grown for one month at varying $p\text{CO}_2$: 380 (current $p\text{CO}_2$), 550, 750 and 1000 μatm (elevated $p\text{CO}_2$). There was no $p\text{CO}_2$ effect on gross production in *C. elongata* and *L. incrustans* but *L. incrustans* respiration strongly increased with elevated $p\text{CO}_2$. *L.*

corallioides gross production slightly increased at 1000 μatm , while respiration remained unaffected. Calcification rates decreased with $p\text{CO}_2$ in *L. incrustans* (both in the light and dark) and *L. corallioides* (only in the light), while *C. elongata* calcification was unaffected. This was consistent with the lower skeletal $m\text{Mg}/\text{Ca}$ ratio of *C. elongata* (0.17) relative to the two other species (0.20). *L. incrustans* had a higher occurrence of bleaching that increased with increasing $p\text{CO}_2$. $p\text{CO}_2$ could indirectly impact this coralline species physiology making them more sensitive to other stresses such as diseases or pathogens. These results underlined that the physiological response of coralline algae to near-future ocean acidification is species-specific and that species experiencing naturally strong pH variations were not necessarily more resistant to elevated $p\text{CO}_2$ than species from more stable environment.

Keywords: corallinaceae, $p\text{CO}_2$, photosynthesis, calcification, rhodolith, Mg-calcite

Acknowledgments

The authors thank the Marine Operations and Services Department (Hader *et al.*) from the Station Biologique de Roscoff for all the diving sampling and the help for system building. In addition we are grateful to the SOMLIT (Service d'Observation en Milieu Littoral, INSU-CNRS) program for the temperature and nutrient datasets provided to calculate seawater carbon parameters. We also thank the editor and two anonymous reviewers for their helpful and constructive comments on the manuscript. This work was supported by the CALCAO project, which received funding from the Region Bretagne and contributes to the "European Project on Ocean Acidification" (EPOCA) which received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n_ 211384

Introduction

Coralline algae (Corallinaceae, Rhodophyceae) are the most dominant group of calcareous algae. They are abundant and widespread around the world from tropical to polar oceans and throughout the photic zone (Nelson 2009). In benthic coastal areas, they are major framework builders and carbonate producers (Cabiocch *et al.* 1992; Nelson 2009). Corallinaceae developed different morphologies: geniculate (articulated) algae have erected, branched thalli with uncalcified joints between calcified segments; non-geniculate (non-articulated) algae are crusts attached to the substratum or occur as free-living forms called rhodoliths (Cabiocch *et al.* 1992). In shallow waters where they develop, they have important biological and ecological roles (Foster 2001) and are considered ecosystem engineers (Nelson 2009). They participate in reef accretion acting as cement (Adey 1998; Jokiel *et al.* 2008) or can build large habitats as coralligenous or rhodolith beds. They favor larval recruitment and settlement of marine invertebrates (Adey 1998), acting as nurseries for some commercial molluscs and fishes (Kamenos *et al.* 2004b; Kamenos *et al.* 2004a). They increase benthic biodiversity, providing hard substratum to settle and microhabitats for shelter (Foster 2001; Grall *et al.* 2006; Pena & Barbara 2010).

In temperate waters, coralline algae can be found at various depths, from the intertidal to the subtidal zone. In the intertidal zone, they frequently inhabit rock pools, forming dense mats at the edges or covering the bottom of the pools (Cabiocch *et al.* 1992). Because rock pools are disconnected from the open sea at low tide, large pH variations are common in this habitat (Morris & Taylor 1983). Diurnal variation often exceeds one pH units, as a result of photosynthesis and respiration (Truchot & Duhameljouve 1980; Morris & Taylor 1983; Björk *et al.* 2004). In the low intertidal zone where channels are formed in shallow waters, understory coralline algae develop on rocks and pebbles under the dense macroalgal canopy. Under the canopy, pH fluctuates according to depth, photosynthetic production, wave exposure, flow or irradiance and is likely to present strong diurnal variations of more than one unit (Middelboe & Hansen 2007). In the subtidal zone, rhodoliths form large beds. These rhodolith beds grow in stable environments with reduced flow (Foster 2001) and relatively low pH variation (Teichert *et al.* 2012). In all these habitats, coralline algae are important contributors to the global carbon budget and carbonate production through their high community primary production and respiration and their high calcium carbonate production

(Martin *et al.* 2005; Bensoussan & Gattuso 2007; Martin *et al.* 2007b; Amado-Filho *et al.* 2012).

Photosynthesis, respiration and calcification are linked metabolic processes that can influence each other (Borowitzka 1981; Gao *et al.* 1993; De Beer & Larkum 2001; Martin *et al.* 2013b). Via CO₂ uptakes and outputs, photosynthesis and respiration processes cause increase and decrease of pH respectively, in the intracellular medium and in the diffusive boundary layer (Raven & Hurd 2012). These variations will increase the rate of calcification in the light and decrease it in the dark. Very few studies have investigated these processes all together, especially in coralline algae. Coralline species precipitate calcium carbonate (CaCO₃) containing magnesium (i.e. high magnesian calcite, Mg-calcite) to form their thallus. This biogenic CaCO₃ is more soluble than aragonite at mole percentage (mol %) MgCO₃ higher than 12% (Andersson *et al.* 2008). In the Corallinales order, the mean mol % MgCO₃ in calcite is 13% but varies depending on the taxa considered from 14% in *Corallina* genus or 25% in the *Lithothamnion* genus (Smith *et al.* 2012). Due to the solubility of their skeleton, coralline algae might be among the most sensitive organisms to CO₂-driven ocean acidification (Kroeker *et al.* 2010; Basso 2012).

The ocean acidification phenomenon is generated by the constant increase in atmospheric CO₂ partial pressure ($p\text{CO}_2$) since the 1800's (Sabine *et al.* 2004). Surface ocean pH is predicted to decrease by 0.3 - 0.4 units by 2100 and by 0.7 units by the year 2300 (Caldeira & Wickett 2003). Simultaneously, the concentration of bicarbonate ions (HCO₃⁻) is predicted to increase and carbonate ions (CO₃²⁻) concentration to drop by 30% by the end of the century (Orr *et al.* 2005). The CaCO₃ saturation state (Ω), which is dependent on the CO₃²⁻ concentration and influences CaCO₃ precipitation, is consequently expected to decrease (Feely *et al.* 2004). Such changes in seawater chemistry may have direct impacts on metabolic processes, particularly ones using dissolved inorganic carbon (DIC) as a substrate, and thus affect both calcifying and photosynthetic marine organisms such as coralline algae.

Responses to high $p\text{CO}_2$ of coralline algae belonging to different morphological or taxonomical groups are variable and species-specific (see Martin *et al.*, 2013 for a review). Most of them are negatively affected with detrimental effects on recruitment (Kuffner *et al.* 2008), growth (Ragazzola *et al.* 2012), abundance (Martin *et al.* 2008), photosynthetic production (Anthony *et al.* 2008) and calcification (Gao & Zheng 2010). Bleaching associated to mortality (Anthony *et al.* 2008; Diaz-Pulido *et al.* 2012) has also been found to increase in response to high $p\text{CO}_2$. Conversely, some authors reported a positive effect on photosynthetic

(Borowitzka 1981) and calcification processes (Martin *et al.* 2013b) or parabolic responses of calcification to increased $p\text{CO}_2$ (Ries *et al.* 2009; Johnson & Carpenter 2012). The variability of the algal responses also depends on the abiotic parameters applied during the experiments. For example, calcification of *Hydrolithon onkodes* measured under $336 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ presented a parabolic response with the highest calcification rate under the intermediate levels of $530 \mu\text{atm}$ (Johnson & Carpenter 2012) whereas a constant calcification decrease was measured under $1200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ on the same species (Diaz-Pulido *et al.* 2012). Hofmann *et al.* demonstrated with the same technique (PAM fluorometry) that photosynthesis in *Corallina officinalis* can decrease (Hofmann *et al.* 2012b) or remain stable (Hofmann *et al.* 2012a) with an increase in $p\text{CO}_2$. As responses of living organisms are so varying, applying the same abiotic parameters is required to compare species-specific responses.

In the present study, the metabolic processes of photosynthesis, respiration and calcification were investigated simultaneously in different algal species from contrasting habitats in response to elevated $p\text{CO}_2$. Assuming that organisms inhabiting highly variable environments are likely to be more robust to ocean acidification (Raven 2011; Harley *et al.* 2012) and able to tolerate high $\text{pH}/p\text{CO}_2$ fluctuations, we hypothesized that coralline algae living in fluctuating habitats (intertidal rock pools and channels) will be less affected by elevated $p\text{CO}_2$ than algae from more stable subtidal environments. We investigated the physiological responses of three different algal species: *Corallina elongata*, an erected coralline alga from rock pools; *Lithophyllum incrustans*, a pink thick crustose coralline alga (CCA) which covers the pebbles in tidal channels and *Lithothamnion corallioides*, also called “maerl”, a key species forming rhodolith beds in the subtidal zone.

Methods

Biological material

Three coralline algal species living in contrasting environments from the intertidal to the subtidal zone on the north-western coast of Brittany were selected for this experiment.

(1) *Corallina elongata* Ellis and Solander, 1786, is a geniculate alga erected from a basal crust, composed of numerous articulated calcareous branches. It is a perennial species from the intertidal zone, abundant on exposed shores, which forms a continuous mat at rock pool edges along Atlantic and Mediterranean coasts (Cabioch *et al.* 1992). Specimens of C.

elongata were sampled on October 11th, 2010 in a shaded rock pool on the low intertidal shore of “Les Amiets”, Cléder (48°41.45'N, 4°7.26'W). Algal fronds free of epiphytic organisms were selected for the experiment and carefully separated from their substrate to obtain their encrusting base. In October 2012, under sunny conditions, temperature fluctuated by about 1°C, from 16.4°C just after disconnection from the sea (pool emersion) to 17.5°C just before immersion at rising tide. Changes in temperature between the night and day can reach 4°C in such low intertidal shaded rock pools (see Egilsdottir *et al.*, 2013). The pH on the total scale (pH_T) in such a rock pool can vary locally according to the depth of the pool and the presence of other macroalgae between 8.61 and 7.82, corresponding to 70 and 1000 µatm, respectively (see Egilsdottir *et al.*, 2013). The photosynthetic active radiations (PAR) measured using a flat quantum sensor (LiCor®, LI-192 SA) at midday under sunny conditions at the surface of the pool was around 30 µmol photons m⁻² s⁻¹. This low light was due to a large rock overhanging the pool and shading the pool area along the day.

(2) *Lithophyllum incrustans* Philippi, 1837, is a non-geniculate coralline alga forming thick pink/grey crusts covering the substrate. The thallus surface is variable in terms of colour, thickness and shape, the oldest ones forming thick, rippled and peeled off margins (Steneck 1986). This species is usually immersed (Littler 1972) and can be found in rock pools and in the sub-canopy in the low intertidal. Small pebbles entirely covered by *L. incrustans* were collected on October 13th, 2010 in the middle of the Green Island Channel, front of the *Station Biologique de Roscoff* (48°43.73'N, 3°59.22'W). Selected thalli were completely pink, (without white patches) characteristic of healthy crusts. In this channel, depth can vary between a few centimetres to meters between high and low tides and spring and neap tides. Abiotic parameters were measured in October 2012 at low water mean spring tide (similar environmental conditions as during the algal collection). Temperature varied from 17.5°C at midday on a sunny day to 16.2°C during the night. Under the dense *Sargassum muticum* canopy, pH_T at low tide fluctuated between 7.83 (*p*CO₂ ≈ 700 µatm) during the night and 8.74 (*p*CO₂ ≈ 50 µatm) during the day, under sunny conditions. Incident irradiance measured at the surface at midday during low tide using a flat quantum sensor (LiCor®, LI-192 SA) was around 800 µmol photons m⁻² s⁻¹. Using an under-canopy extinction coefficient calculated in laboratory (coefficient ≈ 16.2; Noël, unpublished data), incident irradiance was estimated less than 50 µmol photons m⁻² s⁻¹ in the understory.

(3) *Lithothamnion corallioides* Crouan & Crouan, 1867 is a non-geniculate free-living form of coralline algae. This species forms extensive beds, called rhodolith or “maerl” beds,

by accumulating live and dead thalli (Foster 2001). *L. corallioides* thalli were collected by SCUBA diving on October 13th, 2010, in a maerl bed of the Bay of Morlaix at the Guérhéon site (48° 42.66'N, 3°57.06'W), at 7 meters depth below Chart Datum. Individuals between 1.5 and 3 cm in diameter were selected for the experiment. Abiotic parameters at the Guérhéon site were characterized in October 2012. Temperature was stable around 16.3°C. pH_T varied between 8.12 and 8.18 units before and after high tide (290 - 340 μatm). Irradiance measured with a PAR spherical sensor (biospherical QSP200PD) at 9 meters depth reached 27 μmol photons m⁻² s⁻¹ in the midday under cloudy (but bright) conditions which corresponds to 15 μmol photons m⁻² s⁻¹ with a flat sensor (factor conversion: 0.57 see Ouisse *et al.* 2011).

Experimental conditions and set-up

After collection, all samples were transferred directly to a cool box maintaining *in situ* temperature and carried to the laboratory at the *Station Biologique de Roscoff*. Specimens were selected, gently cleaned to remove most epiphytes and biofilm forming organisms and were maintained in natural unfiltered seawater until the beginning of the experiment.

Sets of 4-6 *C. elongata* fronds, 5-6 *L. incrustans* pebbles and 4-5 *L. corallioides* thalli were labeled with small plastic numbers attached with nylon wire. Two sets of each algal species were randomly distributed to each of the twelve 10-L aquaria composing the experimental set up. In addition, unlabelled thalli were kept in each aquarium for chlorophyll analyses. The thalli were softly brushed to take off epiphytes and biofilm before proceeding to the different measurements. Dry weight (DW) of each alga was determined at the end of the experiment after oven drying fresh samples at 60°C for 48h. Then, thalli were burned for 4 hours at 450°C to obtain ash-free dry weight (AFDW).

At the beginning of the experiment, (October 19th to 26th, 2010), pH was progressively decreased by 0.05 pH units per day by gradually increasing the *p*CO₂ to avoid algae any drastic stress. Then, the organisms were acclimated for one month (October 26th to November 23th, 2010) to the different *p*CO₂/pH_T conditions reached, selected according to the recommendations of Riebesell *et al.* (2010): 380 μatm (pH_T = 8.07) was selected as the current *p*CO₂, and 550 μatm (pH_T = 7.94), 750 μatm (pH_T = 7.82) and 1000 μatm (pH_T = 7.77) as three elevated *p*CO₂ corresponding to different scenarios predicted by the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) for the end of the century (Solomon *et al.* 2007). The *p*CO₂ were adjusted by bubbling CO₂-free air to increase pH (current atmospheric *p*CO₂) or pure CO₂ to decrease pH (elevated *p*CO₂) in four 100 L header tanks. These tanks

were continuously supplied with unfiltered seawater pumped in from the 1800 m³ water reservoir of the *Station Biologique de Roscoff* that fills up at high tide. Seawater was delivered from each tank to a triplicate of aquaria at a rate of 100 ml min⁻¹ (i.e. a renewal rate of 60% h⁻¹). The 12 aquaria were placed in temperature controlled baths regulated by 100 and 150 W submersible heaters at 16°C ± 0.02 °C (October mean *in situ* temperature). *p*CO₂ and temperature were monitored and controlled by an off line feedback system (IKS Aquastar, Karlsbad, Germany) that regulated the addition of gas in the tanks and the on/off heater switch in the temperature controlled bath. The pH values of the pH-stat system were adjusted from daily measurements of pH on the total scale (pH_T) in the aquaria using a pH meter (HQ40D, Hach Lange, Ltd portable LDOTM, Loveland, Colorado, USA) calibrated using Tris/HCl and 2-aminopyridine/HCl buffer (Dickson et al., 2007). Light was provided by 39 W fluorescent tubes (JBL Solar Ultra Marin Day, JBL Aquaria, Nelson, New Zealand). Irradiance was fixed at a mean value of 30 μmol photons m⁻² s⁻¹, representative of mean daily *in situ* irradiance in the three habitats, by adjusting the distance of the fluorescent tubes above the aquaria and using a quantum sensor (LiCor®, LI-192 SA). The photoperiod was adjusted to 9:15 (light:dark, h) corresponding to the mean photoperiod in Autumn.

Seawater parameters

Seawater parameters were monitored throughout the experiment. pH_T and temperature were recorded daily in each of the twelve aquaria with a pH-meter (HQ40D, Hach Lange, Ltd portable LDOTM, Loveland, Colorado, USA). Total alkalinity (A_T) was measured in the four *p*CO₂ treatments by HCl 0.01N potentiometric titration on an automatic titrator (Titroline alpha, Schott SI Analytics, Mainz, Germany) at the beginning of the acclimation period (28th October 2010) and during the acquisition of metabolic rates (23th - 26th November 2010). Salinity was checked in each aquarium at the beginning, twice during the experiment and at the end of the experiment with a conductimeter (LF 330 / SET, WTW, Weilheim, Germany). The carbonate chemistry of the seawater, *i.e.* dissolved inorganic carbon (DIC), exact CO₂ partial pressure (*p*CO₂) and saturation state of aragonite (Ω_{Ar}, because solubility of high Mg-calcite is closer to aragonite than calcite) were calculated for each aquarium using CO₂SYS software (Lewis & Wallace 1998) with constants of Mehrbach *et al.* (1973) (refitted by Dickson & Millero 1987). Mean values of the parameters in each *p*CO₂ condition (3 aquaria per condition) are presented in Table 1.

mMg/Ca, chlorophyll a and bleaching analyses

The mol % Mg/Ca (*mMg/Ca*) ratio was analysed in three samples per algal species, only in the control condition (380 μ atm) at the end of the experiment. The algae did not grow enough in one month to produce sufficient quantity of carbonate to perform comparisons between $p\text{CO}_2$ treatments. Samples were cleaned with distilled water, dried by paper towel tapping, bagged and sent to the *Institute of Earth Sciences, University of Iceland*. Small samples (< 0.01g) of the skeletal material of each alga were placed in 20 ml polyethylene vials which had been cleaned by soaking for 3 days in 5% HNO_3 and then washed with distilled water and dried. To dissolve calcium carbonate, 1 ml of 65% HNO_3 suprapure acid (Merck, Germany) was added to the samples and left to dissolve for 14 hours, after which 4 ml of deionised purified water (Milli-Q purification system, Millipore, USA) was added to the sample. The mol % Mg/Ca (*mMg/Ca*) ratios were analysed at the *University of Iceland Institute of Earth Sciences*, with an Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer (ICP-AES Spectro CirosTM, Germany). The ICP-analysis was calibrated with mixtures of NIST-traceable single element solutions (Spex Industries Inc. NJ, USA).

Chlorophyll *a* (Chl *a*) content was measured in the three algal species exposed to each $p\text{CO}_2$ treatment at the end of the experiment. Samples from the additive algal pool of each aquarium were removed and immediately frozen at -20°C pending analyses. Branches of *C. elongata* fronds (≈ 50 mg) and pieces of *L. corallioides* thalli (≈ 1 g) were removed from the samples just taken out of the freezer. Pink surfaces of *L. incrustans*, around one cm^2 per thallus, were scratched with a scalpel to pick out the living cell layer. All the samples were weighed and then ground in 10 ml 90 % acetone with a cold mortar pestle, on an ice bath, under dark conditions. The extract was poured into 15 ml centrifuge tubes and placed in the dark at 4°C overnight. Samples were then centrifuged for 20 min at 4000 rpm. Total Chl *a* concentration in the supernatant was determined according to the method of Ritchie (2008), using a spectrophotometer (Helios Gamma, Thermo Electron Corporation, England). Two successive extractions were necessary for a complete Chl *a* extraction.

Bleaching was evaluated at the end of the experiment. White patches of thalli, characteristic of bleaching only occurred in *L. incrustans*. The surfaces of incubated alga sets were photographed at the end of the experiment. Images were analysed with ImageJ software (Rasband 2012, version 1.37) to calculate the percentage of the bleached thallus surfaces.

Metabolic rates measurements

Each set of labeled thalli was incubated between the 23th and the 26th November, once in the light and once in the dark, in 80 mL (*L. incrustans* and *L. corallioides*) or 190 mL (*C. elongata*) acrylic respirometry chambers (Engineering & Design Plastics Ltd, Cambridge, UK) filled with the aquarium seawater. Water homogeneity was insured by hand shaking and temperature was kept constant. Light incubations were carried out under culture irradiance ($30 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and dark incubations by covering the aquaria with black plastic bags with fluorescent tubes switched off. Incubations lasted around 3 hours in order to avoid oxygen saturation greater than 120 % during light incubation and maintain oxygen saturation above 80 % at the end of the dark incubation. In parallel, control incubations without algae were carried out to correct fluxes from any biological activity in seawater.

Net production (light incubation) and respiration rates (dark incubation) were calculated, by measuring oxygen molar concentration at the beginning and the end of the incubation period with a non-invasive optical fiber system (FIBOX 3, PreSens, Regensburg, Germany). The reactive oxygen spots in the chambers were calibrated just before the beginning of the measurements with 0 % and 100 % oxygen buffers. Net production (Davenport & Chen), respiration (R) and gross production (GP) rates (in $\mu\text{mol O}_2 \text{g}^{-1} \text{AFDW h}^{-1}$) were corrected from controls and calculated as:

$$\text{NP} = (\Delta\text{O}_2 \times V) / (\Delta t \times \text{AFDW})$$

$$\text{R} = (\Delta\text{O}_2 \times V) / (\Delta t \times \text{AFDW})$$

$$\text{GP} = \text{NP} - \text{R}$$

where ΔO_2 is the difference between initial and final O_2 concentrations in $\mu\text{mol O}_2 \text{L}^{-1}$; V is the volume of the chamber in liters; Δt is the incubation time in hour and AFDW is the ash-free dry weight of the algae in grams.

Calcification fluxes were estimated by using the alkalinity anomaly technique (Smith & Key 1975) based on a decrease of total alkalinity (A_T) by 2 equivalents for each mole of CaCO_3 precipitated (Wolf-Gladrow *et al.* 2007). Seawater was sampled directly in the aquaria at the beginning of the incubation and in the incubation chamber at the end. Samples were filtered through $0.7 \mu\text{m}$ Whatman GF/F filters into 100 mL glass bottles and immediately poisoned with mercuric chloride (0.02 % vol/vol; Dickson *et al.* 2007). A_T value (in $\mu\text{Eq L}^{-1}$)

were determined by HCl 0.01N potentiometric titration on an automatic titrator (Titroline alpha, Schott SI Analytics, Mainz, Germany) and by using the Gran method of non-linear least-squares fit applied to pH values from 3.5 to 3.0 (Dickson *et al.* 2007). Light and dark calcification rates (g light and g dark, in $\mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$) were corrected from controls and calculated as:

$$g = -(\Delta A_T \times V) / (2 \times \Delta t \times DW)$$

where ΔA_T is the difference between initial and final total alkalinity concentrations in $\mu\text{Eq L}^{-1}$; V is the volume of the chamber in liters; Δt is the incubation time in hour and DW is the dry weight of the algae in grams.

Statistics

All statistical analyses were performed using the free software R 2.15.0 version (©The R Foundation for Statistical Computing). Before applying each test, normality of the data and homoscedasticity were checked by Shapiro's test and Levene's test respectively. Differences in $m\text{Mg}/\text{Ca}$ ratio between the three algal species at 380 μatm and percentage of bleaching among the different $p\text{CO}_2$ treatments in *L. incrustans* were explored by one-way analysis of variance (ANOVA) following by post hoc Student-Newman-Keuls (SNK) test. Because of heterogeneous variances, chlorophyll contents among the algal species and among the $p\text{CO}_2$ conditions were compared by two different Kruskal-Wallis tests followed by post hoc Dunn's tests. The effect of $p\text{CO}_2$ on metabolic rates was investigated with the GAD package independently for each alga. All the metabolic rates were explored through nested two-ways ANOVA considering " $p\text{CO}_2$ " as a fixed factor with 4 levels (390, 550, 750 and 1000 μatm) and "aquarium" as a 3 level random factor nested in the " $p\text{CO}_2$ " one to deal with spatial pseudo-replication. In cases of significant differences between treatments, a post hoc Student-Newman-Keuls test was applied to explore them. All results are presented as mean \pm standard error.

Results

Seawater parameters

Salinity remained stable at 35.2 ± 0.1 during the experiment. Mean values of the seawater parameters i.e. temperature, pH_T , alkalinity, $p\text{CO}_2$ and calcium carbonate saturation state relative to aragonite, in each $p\text{CO}_2$ condition (3 aquaria per condition) are presented in Table 1.

Table 1: Mean temperature and parameters of the carbonate chemistry in each $p\text{CO}_2$ treatment. pH_T (on the total scale) and temperature were measured daily. Total alkalinity (A_T) was measured at the beginning of the acclimation time and during metabolic measurements. Other parameters were calculated using CO2sys software. $p\text{CO}_2$: CO_2 partial pressure; Ω_{Ar} : saturation state of seawater with respect to aragonite.

$p\text{CO}_2$ treatments	Temperature (°C)	pH_T	A_T ($\mu\text{Eq kg}^{-1}$ SW)	$p\text{CO}_2$ (μatm)	Ω_{Ar}
	n = 32	n = 32	n = 35	n = 32	n = 32
380 μatm	16.0 ± 0.1	8.01 ± 0.01	2401.92 ± 3.78	450 ± 7	2.41 ± 0.03
550 μatm	15.9 ± 0.1	7.88 ± 0.01	2402.07 ± 3.08	637 ± 23	1.88 ± 0.05
750 μatm	15.9 ± 0.1	7.80 ± 0.01	2414.49 ± 4.18	790 ± 22	1.58 ± 0.03
1000 μatm	15.9 ± 0.1	7.70 ± 0.01	2418.53 ± 5.16	1002 ± 24	1.29 ± 0.03

mMg/Ca ratios, chlorophyll a contents and bleaching

mMg/Ca ratios were 0.169 ± 0.002 , 0.202 ± 0.006 and 0.202 ± 0.009 mol for *C. elongata*, *L. incrustans* and *L. corallioides* respectively. The three algal species showed differences in their skeletal composition (Table 2). *L. incrustans* and *L. corallioides*, the two species which have the closest morphotypes, had similar percentages (Table 2) of about 20% MgCO_3 . *C. elongata* precipitated calcite with less magnesium than the other species (Table 2) with 17% MgCO_3 .

Table 2: Results of the one-way ANOVAs testing the differences of mMg/Ca ratios between the three algal species at 380 μatm and the effects of $p\text{CO}_2$ on bleaching in *L. incrustans*. Chlorophyll contents (algal and $p\text{CO}_2$ effects) were explored by two Kruskal-Wallis tests.

	mMg/Ca ratio		Bleaching		Chlorophyll contents		
	df	F	p	F	p	H	p
Factor : $p\text{CO}_2$	3			7.337	0.002	0.140	0.987
				<i>SNK test p < 0.05</i>			
				380 < 1000			
				380 < 750			
				550 < 1000			
Factor : alga	2	9.241	0.015			63.160	< 0.001
	<i>SNK test p < 0.05</i>		<i>Dunn's test p < 0.05</i>		<i>C. elongata > L. incrustans > L. corallioides</i>		
				<i>C. elongata < L. incrustans</i>			
				<i>C. elongata < L. corallioides</i>			
				<i>L. incrustans = L. corallioides</i>			

Chlorophyll *a* contents in the living part of the algae (Table 3) did not differ among $p\text{CO}_2$ treatments regardless of algal species (Table 2) while differences appeared between species (Table 2). Chlorophyll *a* content was the highest in *C. elongata*, intermediate in *L. incrustans* and the lowest in *L. corallioides*.

Table 3: Chlorophyll *a* content in the three coralline algal species in each $p\text{CO}_2$.

	Chlorophyll concentrations (mg chlorophyll g^{-1} AFDW)			
	380 μatm	550 μatm	750 μatm	1000 μatm
<i>C. elongata</i>	2.04 \pm 0.10	1.74 \pm 0.13	1.56 \pm 0.24	1.73 \pm 0.06
<i>L. incrustans</i>	1.46 \pm 0.03	1.69 \pm 0.18	1.89 \pm 0.10	1.94 \pm 0.24
<i>L. corallioides</i>	1.15 \pm 0.04	1.06 \pm 0.03	1.13 \pm 0.07	1.10 \pm 0.05

Bleaching occurred only in *L. incrustans* thalli and was observed in all $p\text{CO}_2$ treatments. The percentage of bleached surface at the end of the experiment was significantly affected by $p\text{CO}_2$ (Table 2) and increased with increasing $p\text{CO}_2$ from 1% of the whole surface of the thalli bleached at 380 μatm to more than 10% at 1000 μatm (Figure 1).

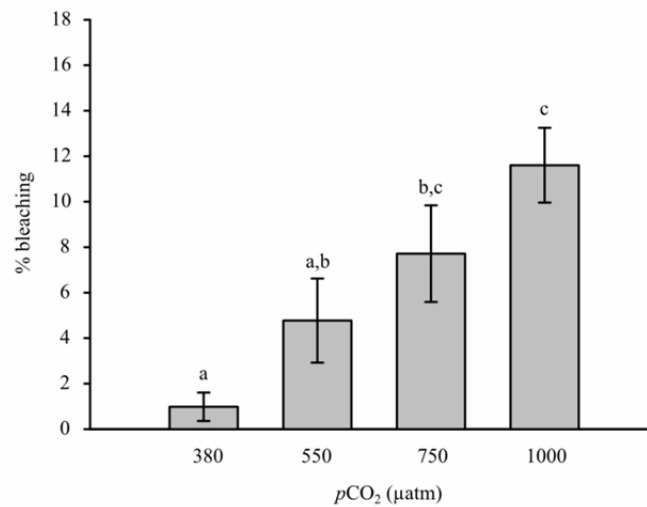


Figure 6: Percentage of bleaching in *L. incrustans* thalli in each $p\text{CO}_2$ treatment. Unshared letters above bars indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$, SNK post hoc test), $n = 6$.

Metabolic rates

In all the metabolic rates, no aquarium effect was detected ($p > 0.05$, Table 4).

In *Corallina elongata*, the mean rates of net production varied from 12.62 (550 μatm) to 17.02 $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ AFDW h}^{-1}$ (380 μatm) while respiration and gross production rates reached maxima of -11.87 and 28.89 $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ AFDW h}^{-1}$, respectively (Figure 2A). Gross production was slightly decreased at 550 μatm (-24 % relative to 380 μatm) whereas net production and respiration were not affected by elevated $p\text{CO}_2$ (Table 4). Calcification rates in the light and dark were positive except at 1000 μatm in the dark (Figure 2B). No $p\text{CO}_2$ effect was detected on calcification both in the light and dark. Mean net calcification ranged from $0.93 \pm 0.71 \mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$ at 550 μatm to $1.81 \pm 0.70 \mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$ at 1000 μatm in the light and from $0.78 \pm 0.33 \mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$ at 550 μatm to $-0.28 \pm 0.41 \mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$ at 1000 μatm in the dark. Dissolution (negative net calcification) only occurred at 1000 μatm in the dark.

Net production of *Lithophyllum incrustans* varied from -0.91 to 0.23 $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ AFDW h}^{-1}$. Gross production rates were not affected by elevated $p\text{CO}_2$ but conversely, respiration increased with increasing $p\text{CO}_2$ and net production was also affected (Table 4). Gross production ranged from 2.26 and 2.58 $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ AFDW h}^{-1}$ and respiration rate increased from -2.04 (380 μatm) to -3.49 $\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ AFDW h}^{-1}$ (1000 μatm). Calcification in the

light and in the dark (Figure 2B) decreased with increasing $p\text{CO}_2$, as we observed a drop of 185.7% between 380 and 1000 atm in the light (from 0.08 ± 0.03 to $-0.07 \pm 0.03 \mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$) and 250% in the dark (from -0.06 ± 0.01 to $-0.21 \pm 0.03 \mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$). Dissolution, as the net calcification rates were negatives, occurred in the light only under elevated $p\text{CO}_2$ (750 and 1000 μatm) and in all the conditions in the dark.

Lithothamnion corallioides net production rates ranged between 6.39 and 9.23 $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ AFDW h}^{-1}$, at 750 and 380 μatm respectively. Gross production rates increased from 8.73 to 13.23 $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ AFDW h}^{-1}$ and respiration rates ranged between -1.55 (750 μatm) and -4.00 $\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ AFDW h}^{-1}$ (1000 μatm). Elevated $p\text{CO}_2$ affected respiration, net and gross production (Table 4) by enhancing primary production at 1000 μatm and decreasing respiration at 750 μatm (Figure 2A). With a mean of $0.38 \pm 0.07 \mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$, calcification measured in the light was much higher than calcification in the dark (Figure 2). $p\text{CO}_2$ effects on light calcification were significant ($p = 0.043$, Table 4) even though post hoc comparison tests did not show any significant differences between $p\text{CO}_2$ conditions. Dark calcification was not significantly affected by $p\text{CO}_2$ (Table 5). However, a general trend showed a decrease in calcification rates from 0.14 ± 0.06 at 380 μatm to $-0.03 \pm 0.08 \mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$ at 1000 μatm in the dark (Figure 2B). Dissolution occurred in the two most elevated $p\text{CO}_2$ condition (750 and 1000 μatm) only in the dark.

Table 4: Results of the one-way nested ANOVA testing the effects of $p\text{CO}_2$ on the metabolic rates in the three coralline algal species.

	Net production			Respiration		Gross production		Light calcification		Dark calcification	
	$\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ AFDW h}^{-1}$			$\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ AFDW h}^{-1}$		$\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ AFDW h}^{-1}$		$\mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$		$\mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$	
	df	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
$p\text{CO}_2$ effect											
<i>C. elongata</i>	3	3.143	0.087	2.250	0.160	11.136	0.003**	0.659	0.600	1.431	0.304
<i>L. incrustans</i>	3	18.608	< 0.001***	5.328	0.026*	0.133	0.938	18.262	< 0.001***	11.908	0.003**
<i>L. corallioides</i>	3	6.612	0.015*	7.271	0.011*	9.573	0.005**	4.340	0.043*	1.211	0.366

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

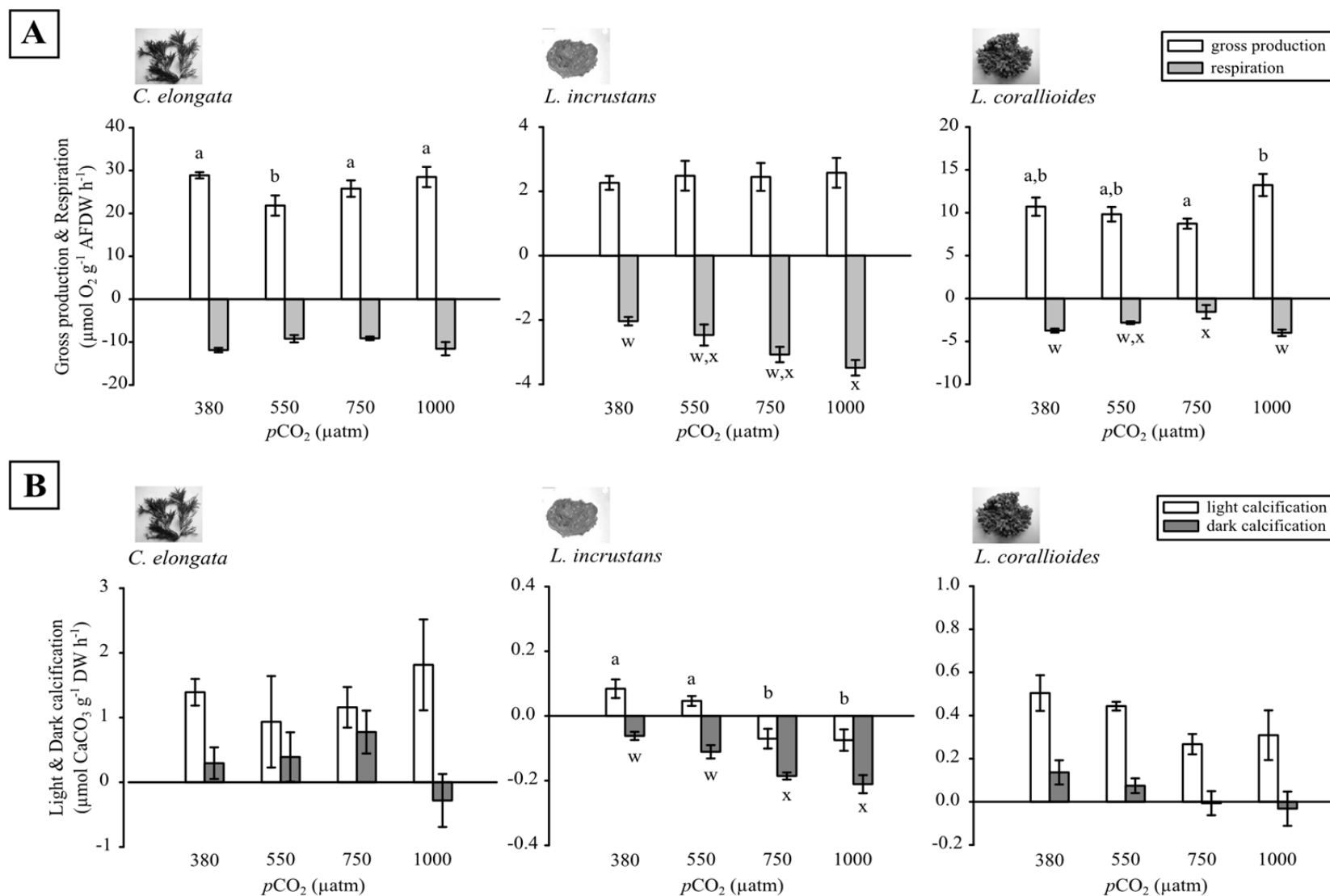


Figure 2 : Gross production and respiration rates (A) and net calcification rates in the light and dark (B) in each $p\text{CO}_2$ treatment. Unshared letters above bars indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$, SNK post hoc test), $n = 6$

Discussion

Calcifying marine algae show a large variety of responses to ocean acidification (Hurd *et al.* 2009) and species-specific responses may be developed by algae from the same family living in contrasting habitats to cope with abiotic changes (Harley *et al.* 2012).

Photosynthesis in the three investigated algal species was not strongly impacted by increasing $p\text{CO}_2$. Indeed, in *C. elongata*, gross primary production was not affected by increasing $p\text{CO}_2$ except for an inconsiderable decrease at 550 μatm . *L. incrustans* gross production remained constant at all the $p\text{CO}_2$ treatments while *L. corallioides* gross production increased at 1000 μatm . This general weak $p\text{CO}_2$ effect on coralline algal photosynthesis has already been demonstrated by several authors. For example, photosynthetic rates did not vary in response to increasing $p\text{CO}_2$ in the articulated coralline *C. officinalis* (Hofmann *et al.* 2012a) and in the crustose coralline alga *Hydrolithon sp.* (Semesi *et al.* 2009a). Such non-responsiveness has been attributed to carbon-concentrating mechanisms (CCMs) present in many coralline algae (Giordano *et al.* 2005).

The CCMs transport bicarbonate ions (HCO_3^-) through the cell walls by using ion channels or catalyze the transformation of HCO_3^- in CO_2 via a carbonic anhydrase enzyme (Raven *et al.* 2012). Photosynthetic rates of macroalgae that have CCMs are not carbon-limited under current environmental conditions (Giordano *et al.* 2005) and a lack of response of photosynthesis is thus expected under near-future $p\text{CO}_2$. The presence of CCMs in *C. elongata* and *L. incrustans* has never been reported but these two algae are likely to have CCMs due to their gross production rate not enhanced by elevated $p\text{CO}_2$ (Raven & Hurd 2012) and the presence of CCM in the taxonomically close species, *Corallina officinalis* (Hofmann *et al.* 2013). Non-CCM macroalgae are generally carbon-limited under current seawater concentration and may respond positively to elevated $p\text{CO}_2$ (Kubler *et al.* 1999). Red macroalgae without CCMs are most common in low light environments and subtidal habitats (Middelboe & Hansen 2007; Hurd *et al.* 2009; Hepburn *et al.* 2011). This is most likely the case for *L. corallioides* which may have benefitted from the higher concentration of photosynthetic substrate (CO_2) at 1000 μatm , as demonstrated by its slightly elevated primary production.

In contrast to photosynthesis, respiration was differentially affected by $p\text{CO}_2$ among the three algal species. *C. elongata* and *L. corallioides* respiration rates remained unchanged regardless of $p\text{CO}_2$. This lack of response is consistent with the lack of $p\text{CO}_2$ effect shown in

two other temperate coralline algal species, *Corallina officinalis* (Hofmann *et al.* 2012a) and *Lithophyllum cabiochae* (Martin *et al.* 2013b) under similar $p\text{CO}_2$ ranges. The non-responsiveness of macroalgal respiration under elevated $p\text{CO}_2$ was attributed to the absence of changes in photosynthesis and chlorophyll content by Zou *et al.* (2011). This hypothesis is not supported by our findings since as *L. corallioides* gross production varied significantly without affecting respiration. In contrast, *L. incrustans* respiration strongly increased under elevated $p\text{CO}_2$. This may be related to the severe bleaching occurrence. With bleaching, the proportion of undamaged tissue decreased and necrosis (i.e. dead areas) increased. Non-photosynthetic organisms such as bacteria, fungi, boring organisms may have developed on top and within the dead surfaces (Figueiredo *et al.* 1997; Tribollet & Payri 2001), contributing to the increase in respiration rate.

Although bleaching occurred in all the $p\text{CO}_2$ treatments, percentage of bleached surfaces increased with increasing $p\text{CO}_2$, covering more than 10 % of the total thallus area under 1000 μatm . Elevated $p\text{CO}_2$ is known to increase bleaching in crustose coralline algae (Anthony *et al.* 2008; Martin & Gattuso 2009; Diaz-Pulido *et al.* 2012). However, bleached surfaces were observed in *L. incrustans* thalli even in the control condition (380 μatm) suggesting poor health of this species under experimental conditions. Temperature (Martin & Gattuso 2009) and desiccation (Martone *et al.* 2010) are known to be factors inducing crustose coralline algae bleaching. In our experiment, temperature was kept constant at 16°C and crustose coralline algae were constantly immersed but other factors such as diseases or pathogens (widely known for tropical crustose coralline algae, (Littler & Littler 1998; Ballantine *et al.* 2005) may have caused *L. incrustans* bleaching. This understory species generally inhabits shaded environments, protected by the upper dense canopy from high light intensities (Irving *et al.* 2004). Although incident irradiance under the canopy may reach 50 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ at low tide, the constant light of 30 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ applied during the whole experiment may have been too high. In comparison, values reported by Figueiredo *et al.* (1997) did not exceed 8 - 24 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ under a *Fucus* canopy (Isle of Man, UK) at high and low tide respectively. This constant illumination 9 h per day may have caused damages to cell tissues and led to partial bleaching of the thalli. In elevated $p\text{CO}_2$, the potentially negative effects of light may have been amplified at high CO_2 concentrations making the algae potentially more perceptive to diseases, increasing the bleaching.

Interestingly, no bleaching was observed in *L. corallioides* although it developed under dim irradiance ($\approx 15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Comparisons between laboratory and *in situ* recorded metabolic rates suggest that *C. elongata* and *L. corallioides* were in good health and

not negatively affected by experimental conditions. At 380 μatm , *C. elongata* and *L. corallioides* net production rates were higher than those recorded *in situ* in similar temperature and light conditions ($7.7 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$; Egilsdottir, pers. com. and $2.4 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$; Martin *et al.* 2007b, respectively). Daily and hourly net calcification rates in *L. corallioides* ($3.1 \mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$; Martin *et al.* 2006a) and *C. elongata* ($3.5 \mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, Egilsdottir, pers. com.) respectively, measured *in situ* were similar to those measured in our study. The consistency between field and laboratory data confirmed that *C. elongata* and *L. corallioides* were not stressed under the experimental conditions.

Calcification in *L. incrustans* decreased along the $p\text{CO}_2$ gradient, both under light and dark conditions. Daily net calcification rate at 380 μatm was low ($0.03 \text{ mg CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW d}^{-1}$) because of the net dissolution measured under dark conditions, most probably related to the bad health of this alga. Net dissolution was also observed at 750 and 1000 μatm in the light and in all the $p\text{CO}_2$ conditions in the dark. In contrast with *L. incrustans*, increasing $p\text{CO}_2$ did not affect calcification in *C. elongata*. In *L. corallioides*, calcification rate was significantly affected by elevated $p\text{CO}_2$ only in light conditions. In the dark, a general negative trend has been underlined but masked by a high inter-individual-response variability. This calcification decrease has already been shown in other rhodolith species (Büdenbender *et al.* 2011; Ragazzola *et al.* 2012) and crustose coralline algae (Anthony *et al.* 2008; Jokiel *et al.* 2008; Semesi *et al.* 2009a). In some species of coralline algae, such as *Lithophyllum cabiochae*, dissolution was related to necroses and bleaching (Martin & Gattuso 2009). In *L. incrustans*, skeletal dissolution of dead surfaces may have been promoted under elevated $p\text{CO}_2$ and net calcification subsequently lowered. In the light, this phenomenon was partly buffered by the photosynthesis, which increased the pH in undamaged tissues and in the boundary layer (Borowitzka 1981; Hurd *et al.* 2009; Hurd *et al.* 2011; Cornwall *et al.* 2013a). By increasing the pH, Ω was increased and may have favored the calcification process. Conversely, respiration in the dark released CO_2 leading to decrease in pH and Ω . Precipitation of CaCO_3 in undamaged tissues may thus be hindered and dissolution exacerbated. pH variations induced by photosynthesis and respiration in the surrounding medium of the algae were not likely to affect calcification in *C. elongata* as this alga may be able to cope with elevated $p\text{CO}_2$ by saving energy from down-regulating CCMs (Hurd *et al.* 2009; Cornwall *et al.* 2012) or by modifying enzymes contents such as carbonic anhydrase (Hofmann *et al.* 2012a; Hofmann *et al.* 2013) to maintain calcification rates.

Differences between the three algal species could also be partly explained by the high Mg-calcite they precipitate to form their thallus. The carbonate mineralogy is linked to the

dissolution phenomenon and can influence calcification rate (Ries 2011a). Mg-calcite is the most soluble form of CaCO_3 and the mol % MgCO_3 in the algal skeleton may increase its solubility (Morse *et al.* 2006). *C. elongata* had a lower $m\text{Mg}/\text{Ca}$ ratio (0.17) than the other two species (0.20), which can potentially reduce dissolution (Büdenbender *et al.* 2011). Although information on $m\text{Mg}/\text{Ca}$ ratio is not sufficient to define the robustness of a calcareous structure (Ragazzola *et al.* 2012), a lower magnesium content in Mg-calcite can confer a greater resistance to elevated $p\text{CO}_2$. Besides, *C. elongata* has thin, branched thalli that are less calcified than thick crust thalli of *L. incrustans* and *L. corallioides*. Thallus morphology is known to influence the speed of corrosion (Ragazzola *et al.* 2012) and the thinnest thallus may be more resistant because of the higher surface to volume ratio that may allow more exchanges leading to a better chemistry regulation around the calcification site (Price *et al.* 2011).

This study has demonstrated that CO_2 -driven effects varied between algal species from the same family but collected in habitats with varying abiotic conditions. Our original hypothesis that organisms naturally exposed to stressful conditions in their environment will be less sensitive to future $\text{pH}/p\text{CO}_2$ variations was partially supported. Indeed, *C. elongata* was the most resistant to elevated $p\text{CO}_2$ and may have developed adaptations to strong daily variations in pH , commonly occurring in tidal pools (Truchot & Duhameljouve 1980). Surprisingly, *L. corallioides* from a more stable pH environment showed a better resistance than we expected with just a slight decrease in calcification observed under elevated $p\text{CO}_2$. This species may benefit from constant optimal temperature and light provided in the mesocosm and might maintain high metabolism even under elevated $p\text{CO}_2$. In contrast, *L. incrustans*, living in shallow-water dominated with macroalgae where pH fluctuations are high (Middelboe & Hansen 2007), was the most sensitive to $p\text{CO}_2$ increase. However, physiological responses in *L. incrustans* are likely to be due to bleaching occurrence. Indeed, the bleaching was correlated to an increasing dissolution which implied a tissue deterioration affecting all the metabolic functions (Diaz-Pulido *et al.* 2012). The increasing bleaching could also be linked to productivity losses as shown on tropical crustose coralline algae (Anthony *et al.* 2008). The lack of canopy in our experimental set-up may have modify light intensity and quality that *L. incrustans* is used to, leading to bleaching that not occurs *in situ* in the understory. If individuals remained healthy and unbleached during the experiment, *L. incrustans* could prove to be more resistant and a lack of response to elevated $p\text{CO}_2$ may be expected but further investigation is needed.

High $p\text{CO}_2$ sensitivity of coralline algae underlined by numerous authors, (Gao & Zheng 2010; Büdenbender *et al.* 2011; Basso 2012; Hofmann *et al.* 2012b) is counterbalanced by others studies that showed that calcification could be unaffected (Martin & Gattuso 2009; Egilisdottir *et al.* 2013) or even increased (Ries *et al.* 2009; Martin *et al.* 2013b) by moderate $p\text{CO}_2$. These contrasting results and the recent discovery of dolomite, a magnesium-rich stable carbonate less soluble than Mg-calcite, present in some crustose coralline algae led to a reappraisal of the sensitivity of coralline algae to near-future ocean acidification (Nash *et al.* 2013). However, many studies investigating coralline algae under elevated $p\text{CO}_2$ were carried out in mesocosms or laboratory experiments. In the field, $p\text{CO}_2$ is not the only stressor, and surely not the main one, impacting algal physiology. Under combined stresses (e.g. light, temperature, $p\text{CO}_2$), indirect $p\text{CO}_2$ effects could enhance the sensitivity of algae and facilitate disease development and bleaching occurrence even if algae are used to large and rapid $p\text{CO}_2$ variations in their habitat. As one stressor may limit organism ability to deal with another stressor, bleaching can induce a bias in the physiological responses to increasing $p\text{CO}_2$. As for *L. incrustans* in our study, bleaching induced dissolution that impacted the calcification balance even if calcification process in undamaged part of the thallus may not be affected by elevated $p\text{CO}_2$.

Resilience to elevated $p\text{CO}_2$ is probable but maybe at a cost (Martin *et al.* 2013b). *C. elongata* was able to maintain a heavily calcified skeleton under elevated $p\text{CO}_2$ during our experiment (one month). In the long term, this ability could impact the general resistance of the organism by decreasing its fitness and could reduce their ability to compete with fleshy algae. *In situ* experiments along a natural pH gradient showed that even if coralline algae were able to withstand the effects of ocean acidification, they may suffer reductions in abundance (Hall-Spencer *et al.* 2008; Martin *et al.* 2008; Porzio *et al.* 2011; Kroeker *et al.* 2013c). With the decrease of coralline algae in macroalgal-dominated communities, space could be released for fleshy algae (Kuffner *et al.* 2008) or turf which are generally favored by elevated $p\text{CO}_2$ (Connell & Russell 2010). As turf and fleshy algae have different ecological roles than coralline algae, these algal community shifts could have considerable ecological and functional consequences for macroalgal communities from the intertidal and subtidal zones.

3. Effets de l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ sur une espèce d'intérêt le maërl (*Lithothamnion corallioides*) dans différentes conditions de température

3.1 Contexte général

Le maërl est un terme breton francisé ("maerl" en breton) qui désigne un ensemble d'algues de la famille des Corallinacées, de forme libre, légèrement ramifiées, se développant sur les fonds meubles infralittoraux (Cabioch 1966). Le maërl (Figure I2-4) est une algue pérenne à croissance très lente (1 mm par an ; Potin *et al.* 1990; Blake & Maggs 2003) qui forme de grands bancs par accumulation de thalles vivants et morts. Ces bancs se développent dans des zones où l'hydrodynamisme est faible, mais suffisant pour éviter le recouvrement des thalles par sédimentation des particules fines (Foster 2001). Alors que les bancs de maërl se développent à partir du zéro hydrographique (niveau des plus basses mers) car ils ne supportent pas la dessiccation, la profondeur maximale est conditionnée par la limitation en lumière et est donc en relation avec la turbidité des eaux (Grall 2003). En Atlantique Nord-Est, les bancs de maërl se développent depuis le bas de l'intertidal jusqu'à une trentaine de mètres (Birket *et al.* 1998) alors qu'ils peuvent atteindre 90 à 180 mètres de profondeur en Méditerranée (Basso 1996).



Figure I2-4: Plongeur récoltant du maërl sur le banc de Guérhéon en Baie de Morlaix. © Wilfried Thomas SBR. En gros plan, thalle de maërl de l'espèce *Lithothamnion corallioides*.

Sur les côtes françaises de l'Atlantique Nord et de la Manche (Figure I2-5), les algues composant les fonds de maërl appartiennent aux espèces *Phymatholiton calcareum* (Pallas) Adey & McKibbin et *Lithothamnion corallioides* (P & H Crouan) P & H Crouan (Cabioch 1969). La distribution de *L. corallioides* s'étend de l'Irlande et du sud de l'Angleterre jusqu'en Méditerranée. Cette espèce compose les fonds de Guérhémon, au voisinage de Roscoff, ainsi que ceux de la rade de Brest (Cabioch 1966), les deux sites sur lesquels ont été prélevés les échantillons étudiés dans ce chapitre. Le nom de maërl sera donc assimilé à l'espèce *L. corallioides* par la suite.

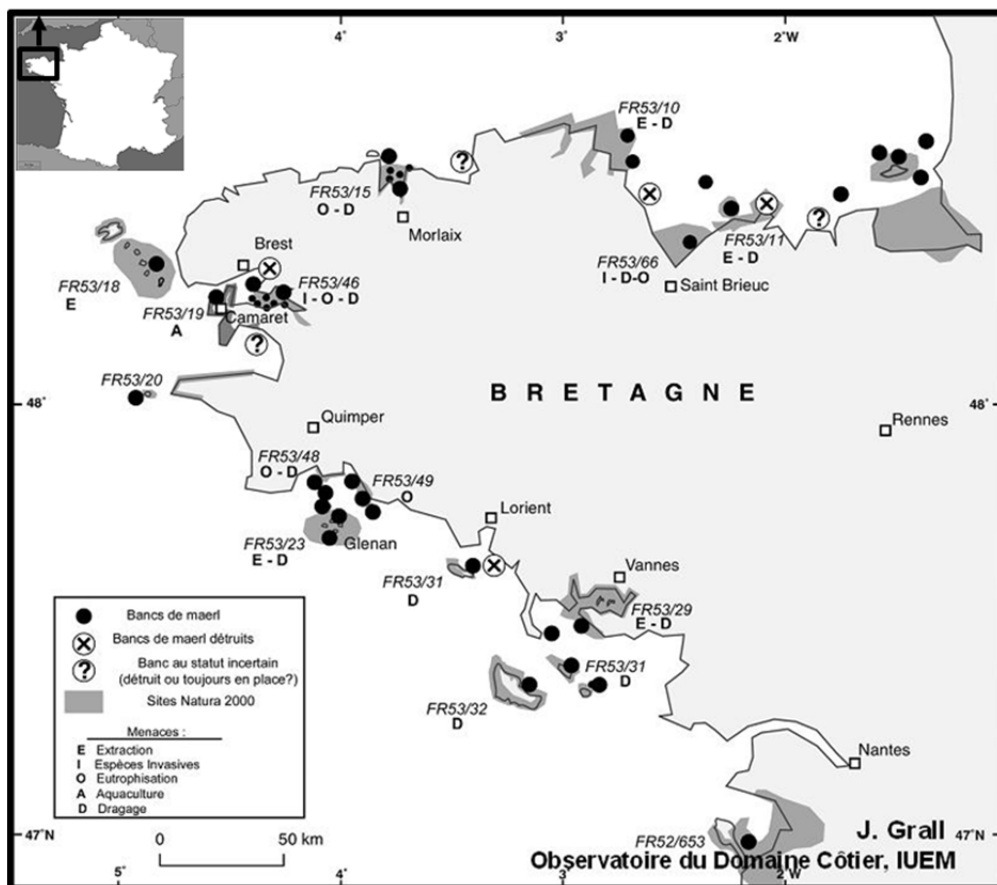


Figure I2-5 : Distribution des bancs de maërl (actuels, détruits et dont la pérennité est incertaine) sur les côtes bretonnes. Source : J. Grall, Observatoire du Domaine Côtier, IUEM

Les bancs de maërl sont des écosystèmes à forte biodiversité ayant d'importantes fonctions écologiques. La structure des thalles forme une matrice offrant une large gamme de microhabitats pour les invertébrés de l'épifaune et de l'endofaune (Grall *et al.* 2006). De plus, les bancs de maërl permettent le développement d'une flore épiphytique riche et diversifiée du fait de la faible profondeur à laquelle ils se développent (Cabioch 1969; Pena & Barbara

2010). Ils sont considérés comme des producteurs majeurs de CaCO_3 (Martin *et al.* 2007b) et constituent localement une importante source de particules sédimentaires carbonatées pour d'autres habitats marins, principalement pour les plages (Grall 2003). Leurs impacts sur les flux de carbone et de nutriments ont un rôle majeur en zone côtière (Martin *et al.* 2007b; Martin *et al.* 2007a).

Outre leurs fonctions écologiques, les bancs de maërl ont un intérêt économique et patrimonial, particulièrement en Bretagne. Espèce patrimoniale, le maërl fait encore partie intégrante de la culture bretonne. Depuis plusieurs années (6^{ème} édition en 2013), le Comité de Pont Callec organise sur la commune de Plougastel la "Fête du Maërl". C'est l'occasion pour une centaine de bénévoles de revêtir les costumes traditionnels et de retrouver les gestes d'antan pour rejouer une page de l'histoire locale, commémorant une pratique ancestrale qui permettait d'apporter de l'engrais aux fraisiers de Plougastel (Figure I2-6).



Figure I2-6: Démonstration de récolte traditionnelle du maërl lors de la " Fête du maerl " 2009. Source : <http://www.tvk.infini.fr/>

Tout d'abord utilisé traditionnellement comme amendement des sols depuis l'Antiquité, l'utilisation de ce sédiment calcaire s'étend aujourd'hui à des domaines très variés tels que la nourriture du bétail, le retraitement des eaux usées ou encore la pharmacologie et cosmétologie (Grall 2002). En Europe, seule la France exploitait cette ressource algale à l'échelle industrielle et l'extraction du maërl était une des principales activités de l'industrie de l'algue française dans les années 1980, à la fois en terme de tonnage (500 000 tonnes an⁻¹) et de chiffre d'affaires (Birket *et al.* 1998; Grall 2002). L'extraction industrielle de maërl dans l'archipel des Glénan, qui a commencé dans les années 1960, était de 600 000 de tonnes dans

les années 1970, 325 000 de tonnes en 2007 et seulement quelques dizaines de tonnes en 2008-2009 (Dutertre 2012). Comme pour l'ensemble des côtes bretonnes, l'arrêt de l'exploitation de ce gisement de maërl est prévu en 2013. En effet, la récolte encore récemment autorisée sur certains sites d'Atlantique et de Manche (ex : Erquy) devrait être interdite d'ici fin 2013 suite au classement de cette espèce sur la liste des espèces et habitats menacés et/ou en déclin (Convention OSPAR 2008-6³) (Mesnildrey *et al.* 2012).

3.2 Résumé de l'article n°2 :

Ce deuxième article présente une étude monospécifique sur les réponses physiologiques de *Lithothamnion corallioides*, le maërl à l'augmentation de $p\text{CO}_2$ dans différentes conditions de température. Des thalles de maërl récoltés en Rade de Brest puis marqués individuellement ont été maintenus à différentes $p\text{CO}_2$: 380, 550, 750, 1000 μatm (Figure I2-7). Ils ont été soumis à des températures successives mimant la moyenne hivernale (10°C), la moyenne estivale (16°C) et une température estivale augmentée de 3°C comme prédit sous contrainte de réchauffement climatique (19°C).

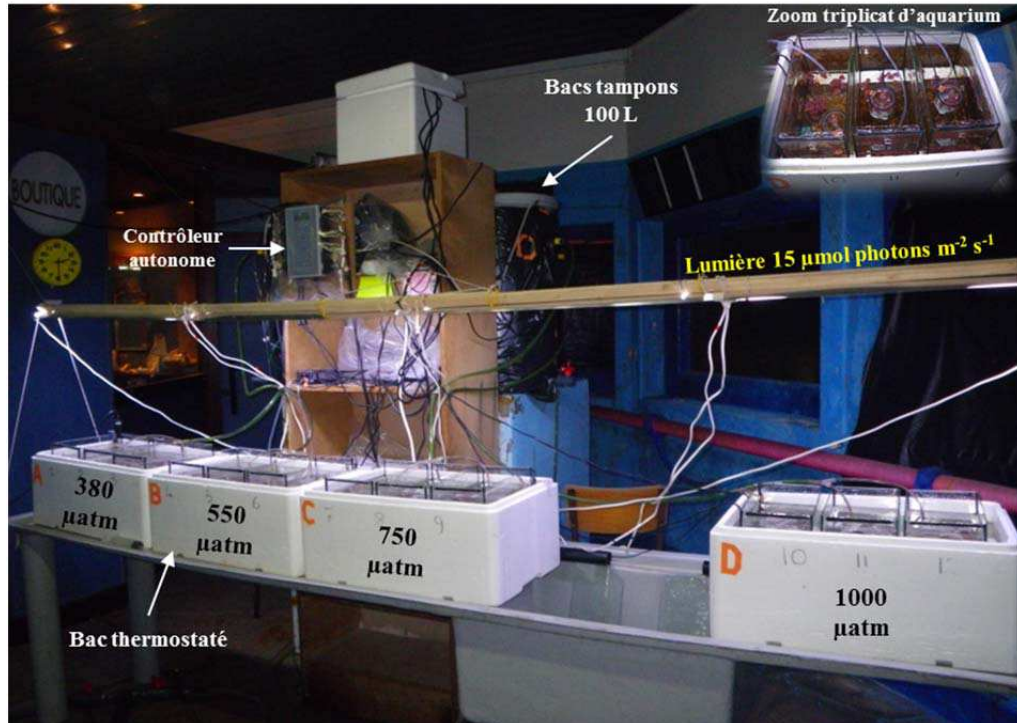


Figure I2-7: Montage expérimental de l'expérience sur le maërl. L'eau régulée au pH requis dans des bacs tampons de 100 L alimentait par gravité un triplé d'aquariums maintenus dans des bacs thermostatisés. La température et l'ajout de CO_2 étaient gérés par un contrôleur autonome IKS (Aquastar, Karlsbad, Allemagne).

L'augmentation de la $p\text{CO}_2$ n'a en rien affecté les trois pigments majeurs retrouvés dans le maërl, à savoir la chlorophylle *a*, le carotène et la zéaxanthine. En revanche, les contenus des deux derniers pigments étaient plus faibles à 10°C. Concernant le métabolisme, les taux de production photosynthétique brute et de respiration n'ont pas été affectés par l'augmentation de température mais une augmentation de la production brute a été mesurée dans la condition 550 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$. Les taux de calcification à la lumière, à l'obscurité et en terme de bilan journalier ont été fortement diminués sous $p\text{CO}_2$ élevée, quelle que soit la température. Bien que, finalement, la $p\text{CO}_2$ ait peu affecté la photosynthèse, le bilan de calcification à la journée a diminué de 80 % dans la condition de $p\text{CO}_2$ la plus drastique (1000 μatm) par rapport à la condition contrôle (380 μatm). Ces résultats suggèrent que les futurs niveaux de CO_2 pourraient avoir de profondes conséquences sur les bilans de carbone et de carbonates des bancs de maërl, allant jusqu'à menacer le maintien à long terme de ces habitats.

Article n°2

Effects of elevated $p\text{CO}_2$ on the metabolism of a temperate rhodolith *Lithothamnion corallioides* grown under different temperatures

Fanny Noisette, Gwendoline Duong, Christophe Six, Dominique Davoult, Sophie Martin

CNRS, UMR 7144

Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29688 Roscoff Cedex, France

UPMC Univ. Paris 6, UMR 7144

Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29688 Roscoff Cedex, France

Journal of Phycology

2013

49 (4): 746-757

DOI : 10.1111/jpy.12085

Abstract

Coralline algae are considered among the most sensitive species to near future ocean acidification. We tested the effects of elevated $p\text{CO}_2$ on the metabolism of the free-living coralline alga *Lithothamnion corallioides* (“maerl”) and the interactions with changes in temperature. Specimens were collected in North Brittany (France) and grown for 3 months at $p\text{CO}_2$ of 380 (ambient $p\text{CO}_2$), 550, 750 and 1000 μatm (elevated $p\text{CO}_2$) and at successive temperatures of 10°C (ambient temperature in winter), 16°C (ambient temperature in summer) and 19°C (ambient temperature in summer + 3°C). At each temperature, gross primary production, respiration (oxygen flux) and calcification (alkalinity flux) rates were assessed in the light and dark. Pigments were determined by HPLC. Chlorophyll *a*, carotene and zeaxanthin

were the three major pigments found in *L. corallioides* thalli. Elevated $p\text{CO}_2$ did not affect pigment content while temperature slightly decreased zeaxanthin and carotene content at 10°C. Gross production was not affected by temperature but was significantly affected by $p\text{CO}_2$ with an increase between 380 and 550 μatm . Light, dark and diel (24 h) calcification rates strongly decreased with increasing $p\text{CO}_2$ regardless of the temperature. Although elevated $p\text{CO}_2$ only slightly affected gross production in *L. corallioides*, diel net calcification was reduced by up to 80 % under the 1000 μatm treatment. Our findings suggested that near future levels of CO_2 will have profound consequences for carbon and carbonate budgets in rhodolith beds and for the sustainability of these habitats.

Keywords: ocean acidification, coralline algae, maerl, calcification, photosynthesis, pigment

Acknowledgments

The authors thank the Marine Operations and Services Department (Hader *et al.*) from the Station Biologique de Roscoff for all the diving sampling and the help for system building. In addition we are grateful to the SOMLIT (Service d'Observation en Milieu LITtoral, INSU-CNRS) program for the temperature and nutrient datasets provided to calculate seawater carbon parameters. We also thank the co-editor and two anonymous reviewers for their helpful and constructive comments on the manuscript. This work was supported by the CALCAO project, which received funding from the Region Bretagne and contributes to the “European Project on Ocean Acidification” (EPOCA) which received funding from the European Community’s Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n_ 211384

Introduction

Since the beginning of the industrial revolution, the atmospheric CO₂ partial pressure ($p\text{CO}_2$) has continuously and unprecedentedly increased (Sabine *et al.* 2004) from 280 ppm to today's level of about 390 ppm. This climb in $p\text{CO}_2$ has enhanced the greenhouse effect and has led to an annual rise in temperature of 0.2-0.3°C (Solomon *et al.* 2007). Over the next century, seawater surface temperatures have been predicted to increase by 3°C and $p\text{CO}_2$ to reach 1000 ppm (Solomon *et al.* 2007). Increased CO₂ concentrations will cause a pH decrease termed “ocean acidification” of 0.1-0.4 units in the surface ocean by the end of the century (Caldeira & Wickett 2003). This would result in a decrease in carbonate ions (CO₃²⁻) concentration (Orr *et al.* 2005), and in the calcium carbonate saturation state (Ω) (Feely *et al.* 2004) which is a parameter controlling the calcification process (Millero *et al.* 2006; Millero 2007). Precipitating CaCO₃ could therefore become less efficient, making calcifying organisms particularly sensitive to ocean acidification (Doney *et al.* 2009; Hoegh-Guldberg 2009).

Coralline algae (Corallinaceae, Rhodophyceae) are the most common group of calcareous algae. They are widespread around the world from tropical to polar oceans and at all photic zone depths (Nelson 2009). They are considered ecosystem engineers (Nelson 2009) being major framework builders and carbonate producers especially in temperate and cold water benthic ecosystems (Basso 2012). Among coralline algae, rhodoliths are the free-living non-geniculate species, which form extensive beds by accumulating live and dead thalli. These so-called “maerl beds” constitute one of the four world's largest macrophyte-dominated benthic communities together with kelp-beds, seagrass meadows and crustose coralline algal reefs (Foster 2001). Thanks to the three-dimensional lattice formed by their branches crossed, rhodolith beds have several key ecological roles (Foster 2001) and provide ecosystem services. They represent microhabitats for cryptofauna (Grall *et al.* 2006), settlement places for invertebrate larvae (Kamenos *et al.* 2004b) and nursery for commercial invertebrate and fish juveniles (Kamenos *et al.* 2004b; Kamenos *et al.* 2004a). Rhodolith beds support a highly diversified fauna and fleshy macroalgae (Cabioch 1969; Foster 2001; Barbera *et al.* 2003; Grall *et al.* 2006; Pena & Barbara 2010) making them a hot-spot of biodiversity. They also make a large contribution to global carbon production (Martin *et al.* 2005). In the Bay of Brest, France, annual primary production of maerl beds is 2-fold higher than annual phytoplanktonic production, contributing about a third of the bay total productivity (Martin *et al.* 2007b). Although temperate rhodoliths have very slow growth

rates (around 1 mm year⁻¹; Potin *et al.* 1990; Blake & Maggs 2003), they are major carbonate producers with a production rate around 490 g CaCO₃ m⁻² y⁻¹ in Brittany waters (Martin *et al.* 2007b) which is close to that reported for tropical reef environments (Bosence & Wilson 2003; Gherardi 2004; Amado-Filho *et al.* 2012).

Coralline algae precipitate high magnesium-calcite (Mg-calcite) to form their thalli, with the highest mol% MgCO₃ rate at low latitudes and warm temperature (Andersson *et al.* 2008). High Mg-calcite is the most soluble form of biogenic CaCO₃ when mol% MgCO₃ is higher than 12% (Morse *et al.* 2006; Andersson *et al.* 2008). The physiological mechanism of calcification is poorly understood in coralline algae. The rate of calcification can vary as a function of the CO₃²⁻ concentration (Borowitzka 1981; Gao *et al.* 1993; Raven 2011), although HCO₃⁻ ions may also be a substrate for calcification (Digby 1977; Koch *et al.* 2013). Due to the solubility of their skeleton, coralline algae appear to be the most sensitive calcifying organisms to near future ocean acidification (Kroeker *et al.* 2010; Basso 2012). Among the first studies conducted in the 80's on the effects of pH on coralline algae, Borowitzka (1981) demonstrated that a decrease in pH (from 9 to 7) increases photosynthesis and calcification in the light. Conversely, most of the recent studies have shown a general negative impact of elevated *p*CO₂ on coralline algae on recruitment (Kuffner *et al.* 2008), abundance (Martin *et al.* 2008; Porzio *et al.* 2011), growth (Jokiel *et al.* 2008), calcification (Semesi *et al.* 2009a; Gao & Zheng 2010). Furthermore, bleaching can lead to mortality (Anthony *et al.* 2008; Diaz-Pulido *et al.* 2012) and bleaching has been found to increase in response to high *p*CO₂. In addition, Ries *et al.* (2009) found that in some coralline algae, calcification has a parabolic response to *p*CO₂ with the highest calcification rate under intermediate *p*CO₂ levels (600 and 900 µatm). The majority of these measurements were conducted in mesocosms, but recent open field and *in situ* flume experiments agree that increasing *p*CO₂ causes reduced abundances (Hall-Spencer *et al.* 2008; Porzio *et al.* 2011) and increased dissolution (Kline *et al.* 2012) of coralline algae exposed to naturally decreased pH levels.

The interacting effect of temperature has to be considered together with the effect of increased *p*CO₂ because these two environmental variables fundamentally influence the physiology of algae. Algal photosynthesis and respiration are usually enhanced under warmer temperatures (Steller *et al.* 2007). In various studies on coralline algae, temperature has been shown to emphasize the negative effects of ocean acidification on algae (Anthony *et al.* 2008; Martin & Gattuso 2009; Diaz-Pulido *et al.* 2012), although the mechanism is not well understood. The interaction of elevated *p*CO₂ and increasing temperature, which will

inevitably come in parallel to ocean acidification, should induce various species specific responses. The aim of this study was to investigate the interactive effects of $p\text{CO}_2$ and temperature on *Lithothamnion corallioides*, the most common rhodolith species of Brittany coasts, in France. Because photosynthetic calcifying marine organisms use DIC as substrate for both photosynthesis and calcification, the response of these metabolic activities were explored.

Material and Methods

Biological material

Lithothamnion corallioides P.L. Crouan & H.M. Crouan, 1867 thalli were collected by SCUBA diving on the 15th December 2010, in a maerl bed of the Bay of Brest (northwest Brittany, France), at the Roscanvel site (4°24'59"W/48°17'46"N), at 10 meters depth below Chart Datum. They were transferred directly in a cool box maintained at *in situ* temperature to the laboratory at the *Station Biologique de Roscoff*. Rhodolith thalli of around 3 cm in diameter were selected, gently cleaned to remove most epiphytes and biofilm-forming organisms. They were kept in natural unfiltered seawater until the beginning of the experiment. The thalli were softly brushed to take off epiphytes and biofilm prior to experiments. Dry weight (DW) of each thallus was measured at the end of the experiment after oven drying fresh samples at 60°C for 48h.

Experimental conditions

Organisms were exposed for 3 months (20th December 2010 to 14th March 2011) to four $p\text{CO}_2$ treatments: an ambient $p\text{CO}_2$ of 380 μatm ($\text{pH}_T = 8.07$), and three elevated $p\text{CO}_2$ treatments of 550 μatm ($\text{pH}_T = 7.94$), 750 μatm ($\text{pH}_T = 7.82$) and 1000 μatm ($\text{pH}_T = 7.77$). Elevated $p\text{CO}_2$ treatments correspond to different scenarios predicted by the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) for the end of the century (Solomon et al. 2007) and were selected according to the recommendations of Riebesell *et al.* (2010).

Algae were grown at three successive temperature levels, according to *in situ* temperature data recorded in the Bay of Brest by the *Service d'Observation des Milieux Littoraux* (SOMLIT) in winter ($9.49 \pm 0.16^\circ\text{C}$) and in summer ($16.36 \pm 0.09^\circ\text{C}$). The initial experimental temperature was adjusted to the *in situ* temperature when algae were collected

(10°C, winter temperature), and algae were grown at this temperature for 12 days at which time metabolic rate measurements (see below) were made. Then, the temperature was progressively increased over three weeks to reach 16°C (summer temperature), and algae were grown at this stable temperature for a further 12 days, and the metabolic rates were measured again. Finally, the temperature was increased over a one week period (0.5°C per day) to reach 19°C (summer temperature elevated by 3°C, representative of the temperature predicted by the end of the century), and algae were grown for a further 12 days prior to making the last set of metabolic rate measurements.

Light was provided by 39 W fluorescent tubes (JBL Solar Ultra Marin Day, JBL Aquaria, Nelson, New Zealand) with a photoperiod of 12:12 h. Irradiance was adjusted to 15 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ using a quantum sensor (LiCor®, LI-192 SA). Irradiance reproduced a mean annual irradiance level in the Bay of Brest at 10 meters depth using an mean attenuation coefficient of -0.395 m^{-1} determined according to those reported by Martin *et al.* (2006) for the Bay of Brest of -0.41 m^{-1} in winter and -0.38 m^{-1} in summer.

Experimental set up

Experimental set up is presented in Figure 1. 24 sets of 5-6 thalli were labeled with small plastic numbers attached with nylon wire and randomly distributed into twelve 10-L aquaria (2 sets of algae per aquarium). In addition unlabelled thalli were kept in each aquarium for pigment analyses. The $p\text{CO}_2$ was adjusted by bubbling CO_2 free air (ambient $p\text{CO}_2$) or pure CO_2 (elevated $p\text{CO}_2$) in four 100 L header tanks supplied with unfiltered seawater pumped in front of the *Station Biologique de Roscoff*. Each of the four $p\text{CO}_2$ treatments had three 10 L replicate aquaria which continuously received CO_2 -treated seawater at a rate of 9 L h^{-1} (*i.e.* a renewable rate of 90% h^{-1}) from the mixing header tanks. Water velocity in the aquaria was around 0.5 cm s^{-1} . The 12 aquaria were placed in thermostated baths where temperature was controlled to within $\pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ using 100 and 150 W submersible heaters. $p\text{CO}_2$ and temperatures were monitored and controlled by an off line feedback system (IKS Aquastar, Karlsbad, Germany) that regulated the addition of gas in the header tanks and the on/off heater switch in thermostated bath. The pH values of the pH-stat system were adjusted from daily measurements of pH on the total scale (pH_T) in the 12 aquaria using a pH meter (HQ40D, Hach Lange, Ltd portable LDO™, Loveland, Colorado, USA) calibrated using Tris/HCl and 2-aminopyridine/HCl buffers (Dickson *et al.* 2007). The different $p\text{CO}_2$

conditions were reached gradually (0.05 pH units per day) before the beginning of the experiment.

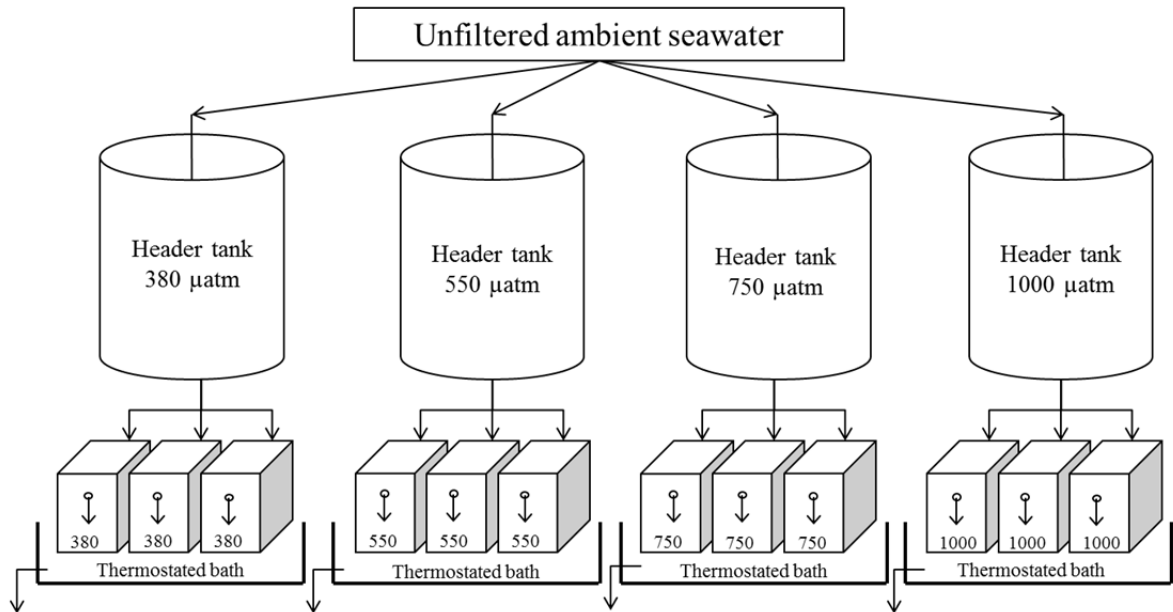


Figure 1: Schematic of laboratory experimental open set up with four $p\text{CO}_2$ conditions: 380 μatm as current $p\text{CO}_2$ condition and 550, 750 and 1000 μatm as elevated $p\text{CO}_2$ conditions. Arrows indicate ambient seawater flowing into the header tanks and subsequently treated water flowing through aquaria out of the system. All the aquaria were maintained at constant temperature in a thermostated bath. Each aquaria contained 18 *L. corallioides* thalli

Seawater parameters

Seawater parameters were monitored throughout the experiment. pH_T and temperature were recorded daily in each of the twelve aquaria with a pH meter (HQ40D, Hach Lange, Ltd portable LDOTM, Loveland, Colorado, USA). Total alkalinity was measured every three weeks. Salinity was also measured every three weeks, at each temperature, with a conductimeter (LF 330/ SET, WTW, Weilheim, Germany) and remained constant with a mean value of 35.1 ± 0.1 . The carbonate chemistry of seawater, *i.e.* dissolved inorganic carbon (DIC), exact CO_2 partial pressure ($p\text{CO}_2$) and saturation state of aragonite (Ω_{Ar} ; solubility of high Mg-calcite closer to aragonite than calcite) were calculated at each $p\text{CO}_2$ and temperature treatment using CO₂SYS software (Lewis & Wallace 1998) with constants of Mehrbach *et al.* (1973) (refitted by Dickson & Millero 1987).

Metabolic rate measurements

Photosynthesis (net and gross production), respiration and net calcification rates were determined for *L. corallioides* in each $p\text{CO}_2$ treatment and at each of the successive temperature levels through short incubations in 185 mL acrylic respirometry chambers (Engineering & Design Plastics Ltd, Cambridge, UK), in both the light and dark. The labeled sets of 5-6 thalli were placed into the respirometry chamber that was filled with seawater from the 10-L aquarium. Thalli were put on a plastic grid above a stirring bar (speed 100 r.p.m.), which ensured water homogeneity. Respirometry chambers were kept in their respective aquarium during the incubation to keep the temperature constant. Light incubations were carried out under the culture irradiance ($15 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and dark incubations were achieved by covering the aquaria with black plastic bags, and the fluorescent tubes switched off. Incubations varied between 4 h at 10°C and 3 h at 19°C in order to maintain oxygen saturation above 80 % at the end of dark incubation. At the end of the incubation, pH in the chamber did not increase or decrease more than 0.1 unit from the value measured at the beginning of the incubation. Control incubations without algae were carried out to correct fluxes from any biological activity in seawater.

Net production (measured during light incubation) and respiration rates (dark incubation) were calculated by measuring oxygen molar concentration at the beginning and the end of the incubation period with a non-invasive optical fiber system (FIBOX 3, PreSens, Regensburg, Germany). The reactive oxygen spots were calibrated at the beginning of each incubation set (*i.e.* each temperature level) with 0% and 100% oxygen buffers. Net production (NP), respiration (R) and gross production (GP) rates (in $\mu\text{mol O}_2 \text{g}^{-1} \text{DW h}^{-1}$) were corrected from controls and calculated as:

$$R = \frac{\Delta\text{O}_2 \times V}{\Delta t \times \text{DW}} \quad \text{NP} = \frac{\Delta\text{O}_2 \times V}{\Delta t \times \text{DW}} \quad \text{GP} = \text{NP} - R$$

where ΔO_2 is the difference between initial and final O_2 concentrations ($\mu\text{mol O}_2 \text{L}^{-1}$), V is the volume of the chamber (L), Δt is the incubation time (h), and DW is the dry weight of the algae (g).

Calcification rates were estimated using the alkalinity anomaly technique (Smith & Key 1975) based on a decrease of total alkalinity (A_T) by 2 equivalents for each mole of CaCO_3 precipitated (Wolf-Gladrow *et al.* 2007). This method is usually used to examine the changes in calcification rate that may occur over time (Chisholm & Gattuso 1991; Gattuso *et*

al. 1998; Semesi *et al.* 2009b; Semesi *et al.* 2009a; Büdenbender *et al.* 2011). Seawater was sampled at the beginning of the incubation, directly in the aquaria just after the chambers were closed, and at the end, in the incubation chamber. Samples were filtered through 0.7 µm Whatman GF/F filters into 100 mL glass bottles and immediately poisoned with mercuric chloride (0.02 % vol/vol; Dickson *et al.* 2007). A_T value (in µEq L⁻¹) were determined by HCl 0.01N potentiometric titration on an automatic titrator (Titroline alpha, Schott SI Analytics, Mainz, Germany) and by using the Gran method (non-linear least-squares fit) applied to pH values from 3.5 to 3.0 (Dickson *et al.* 2007). Light and dark calcification rates (g, in µmol CaCO₃ g⁻¹ DW h⁻¹) were corrected from controls and calculated as:

$$g = - \frac{(\Delta A_t) \times V}{2 \times \Delta t \times DW}$$

where ΔA_t is the difference between initial and final total alkalinity concentrations (µmol Eq L⁻¹), V is the volume of the chamber (L), Δt is the incubation time (h), and DW is the dry weight of the algae (g).

Diel calcification rates (in µmol CaCO₃ g⁻¹ DW d⁻¹) were calculated from light (g light) and dark (g dark) calcification rates based on a 12:12 (light:dark, h) photoperiod as:

$$G = (g \text{ light}) \times 12 + (g \text{ dark}) \times 12$$

Pigment analyses

The pigment content of *L. corallioides* thalli were analysed by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). Three individuals (distinct from those used in the measurements described above) were collected at each temperature level in each aquarium, gently brushed and immediately frozen at -20°C, pending analyses. Frozen samples were ground within a bead grinder (Retsch ®, GmbH, Haan, Germany) and the resulting powder was precisely weighted, then frozen until pigment extraction.

The maerl powder (200-500 mg) was suspended in 100 % methanol for 2 hours at -20°C and centrifuged at 20,000 x g. The supernatant was collected and centrifuged again to ensure total removal of particles and cell debris. The supernatant was then brought to 10% Milli-Q water to avoid peak distortion (Zapata & Garrido 1991) and a volume of 100 µL of

the pigment extract was immediately injected into an HPLC Hewlett-Packard HPLC 1100 Series system, equipped with a quaternary pump and diode array detector. Pigment separations were performed using a Waters Symmetry C₈ column (150 x 3 x 4.6 mm, 3.5 µm particle size) according to procedures published elsewhere (Zapata *et al.* 2000; Six *et al.* 2005) at a flow rate of 1 mL min⁻¹. All sample preparations were made under subdued light at low temperature. Chlorophylls and carotenoids were detected by their absorbance at 440 nm and identified by diode array spectroscopy. Pigments were identified and quantified using standards derived from macroalgae and phytoplankton cultures by preparative HPLC (Repeta & Bjørnland 1997), using previously compiled extinction coefficients (Jeffrey *et al.* 1997).

Statistics

All statistical analyses were performed using the free software R 2.15.0 version (©The R Foundation for Statistical Computing). Three-way repeated analyses of variance (ANOVA) were performed with the GAD package to investigate the impact of *p*CO₂, temperature and aquarium on the different metabolic rates with repeated measures on the same individuals. *p*CO₂ and temperature were considered as fixed factors. To take in account spatial pseudoreplication, individuals were nested in their own aquarium and aquarium was considered as a random factor. Any changes in pigment content were assessed using a three-way non-repeated ANOVAs (*p*CO₂, temperature, and aquarium as factors). Normality of the data and homoscedasticity were checked by Kolmogorov-Smirnov's test and Levene's test respectively. Student-Newman-Keuls (SNK) post hoc tests were applied to establish differences among treatments with a confidence level of 95% when ANOVA showed significant results. All the results are presented as mean ± standard error.

Results

Seawater parameters

Temperature was maintained stable and showed little variability (± 0.5°C; Table 1; Figure 2). The different *p*CO₂ levels were kept close to the selected values of 380, 550, 750 and 1000 µatm (Figure 2). The ambient *p*CO₂ showed little increase from 365 µatm at 10°C to 440 µatm at 19°C. Elevated *p*CO₂ showed variations of about 100 µatm, ranging from 516 to 607 µatm, 705 to 830 µatm, and 961 to 1049 µatm in the 550, 750 and 1000 µatm treatments,

respectively (Table 1). Total alkalinity ranged from 2322 to 2367 $\mu\text{Eq kg}^{-1}$. The carbonate saturation state with respect to aragonite (Ω_{Ar}) never decreased under 1, even at 1000 μatm .

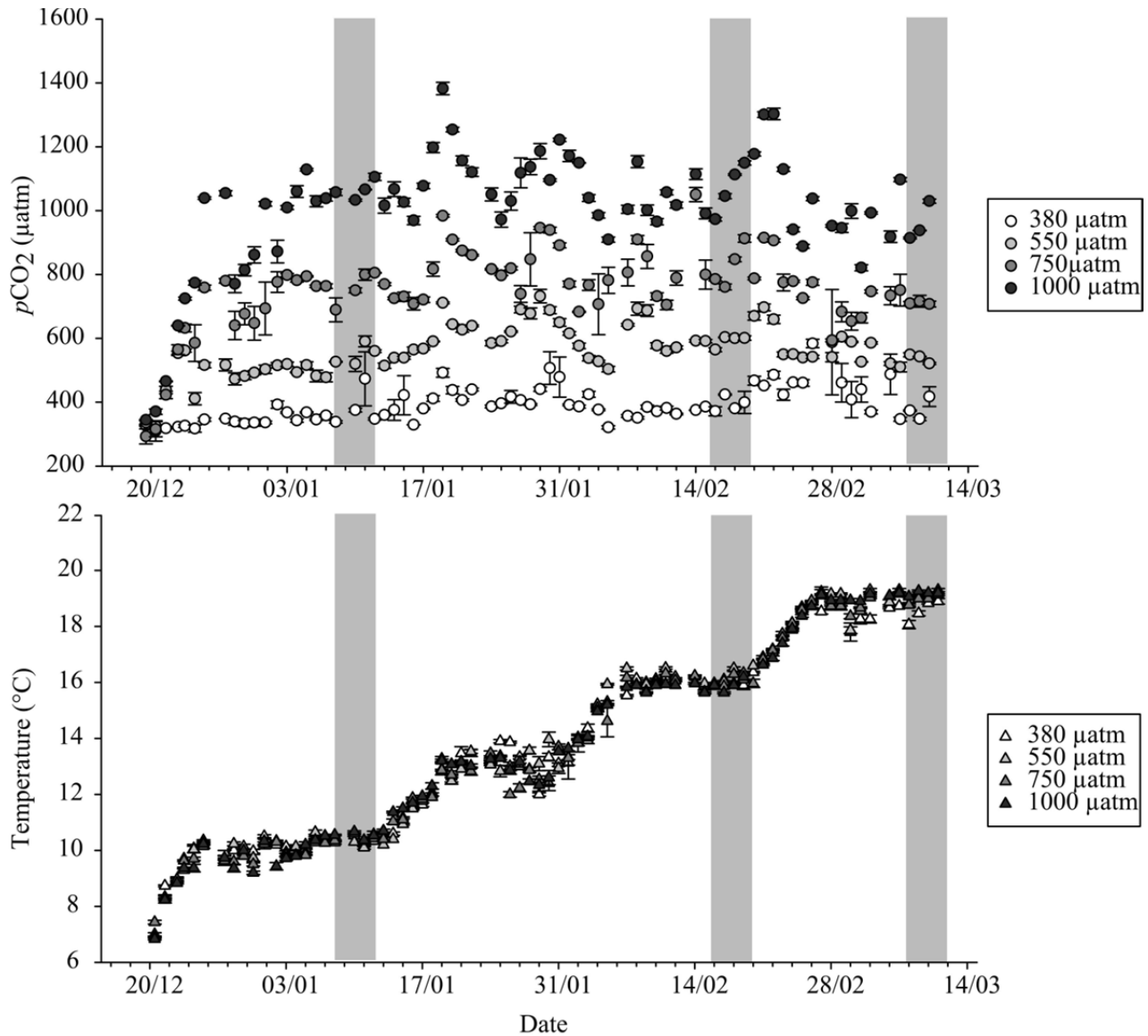


Figure 2: Evolution of $p\text{CO}_2$ and temperature during the experimental period in the four $p\text{CO}_2$ treatments. Grey bars represent the measurement periods where metabolic rates were assessed (10th -12th January; 16th - 18th February; 8th - 10th March 2011). Results are expressed as mean \pm standard error, $n = 3$ (3 aquaria for each $p\text{CO}_2$ treatment).

Table 3: Mean seawater temperature and parameters of the carbonate system in each $p\text{CO}_2$ treatment (3 aquaria per treatment) and at each temperature level. The pH_T (on the total scale) and total alkalinity (A_T) were measured while other parameters were calculated. $p\text{CO}_2$: CO_2 partial pressure; DIC : dissolved inorganic carbon; Ω_{Ar} : saturation state of seawater with respect to aragonite

		Temperature ($^{\circ}\text{C}$)		$p\text{CO}_2$ (μatm)		pH_T		A_T ($\mu\text{Eq kg}_{\text{SW}}^{-1}$)		DIC ($\mu\text{mol C kg}_{\text{SW}}^{-1}$)		Ω_{Ar}	
		n = 12		n = 12		n = 18		n = 12		n = 12		n = 12	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
10 $^{\circ}\text{C}$	380 μatm	10.3	0.1	365.19	11.07	8.09	0.01	2340.43	4.24	2138.96	8.74	2.28	0.04
	550 μatm	10.3	0.1	516.42	9.32	7.95	0.01	2335.65	10.72	2189.47	2.68	1.73	0.02
	750 μatm	10.2	0.1	755.16	14.80	7.81	0.01	2350.56	4.63	2261.77	2.31	1.29	0.03
	1000 μatm	10.3	0.1	1023.54	23.32	7.68	0.01	2353.35	3.90	2300.56	2.67	1.00	0.02
16 $^{\circ}\text{C}$	380 μatm	16.1	0.0	378.83	5.62	8.07	0.01	2325.54	6.52	2085.34	3.81	2.67	0.02
	550 μatm	16.2	0.1	606.95	12.84	7.89	0.01	2321.81	6.71	2162.50	3.55	1.90	0.03
	750 μatm	16.0	0.1	829.55	27.25	7.78	0.01	2339.50	3.63	2228.09	4.84	1.50	0.04
	1000 μatm	16.2	0.3	1048.81	19.60	7.68	0.01	2347.78	2.16	2267.13	2.39	1.25	0.02
19 $^{\circ}\text{C}$	380 μatm	18.5	0.1	440.33	23.66	8.02	0.02	2333.69	12.47	2117.93	18.00	2.71	0.08
	550 μatm	18.9	0.1	547.73	8.64	7.94	0.01	2358.43	5.02	2158.41	2.95	2.33	0.03
	750 μatm	18.9	0.1	705.05	14.41	7.84	0.01	2355.13	6.25	2200.04	3.32	1.92	0.03
	1000 μatm	19.0	0.0	961.17	21.55	7.72	0.01	2366.73	2.55	2255.95	3.20	1.53	0.03

Photosynthesis and respiration

The mean rates of gross primary production varied from 0.50 (19°C, 750 μatm) to 0.69 $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$ (16°C, 550 μatm) (Figure 3a). The gross production was not significantly affected by the aquarium or temperature. Conversely, rates significantly differed among $p\text{CO}_2$ treatments (Table 2) with values being 17% higher at 550 μatm relative to 380 μatm (Figure 3a). No significant difference in gross production were detected between $p\text{CO}_2$ treatments of 750 and 1000 μatm but the rates were higher than at 380 μatm .

The mean respiration rates ranged from 0.25 to 0.37 $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$ (Figure 3b). They were significantly affected by temperature, being lower at 10°C (0.31 $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$) than at 16°C and 19°C (0.36 $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$) (Table 2). No effect of the aquarium or $p\text{CO}_2$ were detected.

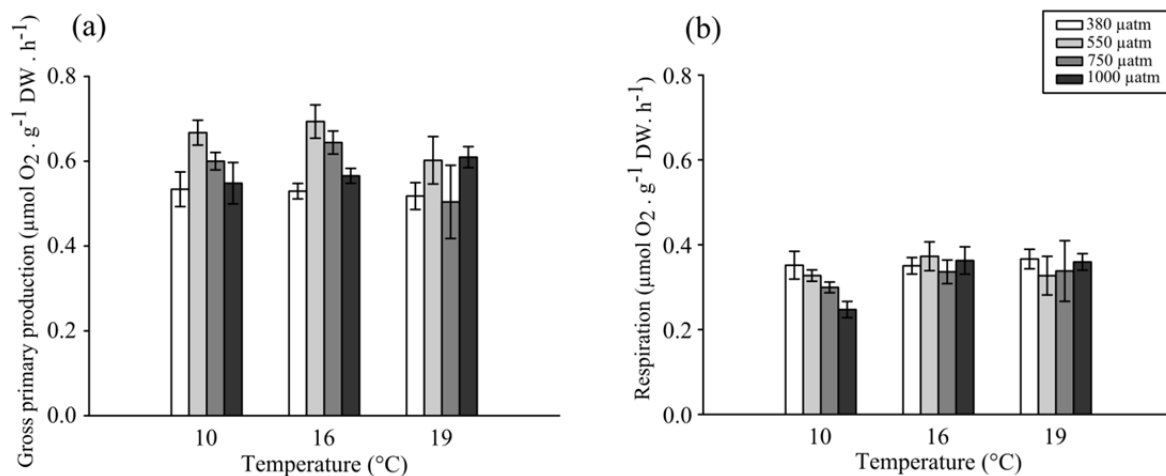


Figure 3: Gross production (a) and respiration (b) rates in the four $p\text{CO}_2$ treatments at 10, 16 and 19°C. Results are expressed by mean \pm standard error, n = 6.

Table 2: Summary of three-way repeated ANOVAs followed by SNK post hoc tests testing the effects of $p\text{CO}_2$, temperature and aquarium on the metabolic rates. Bold numbers indicate significant level greater than 95%.

	Gross production $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1}\text{DW h}^{-1}$	Respiration $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1}\text{DW h}^{-1}$	Light calcification $\mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1}\text{DW h}^{-1}$	Dark calcification $\mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1}\text{DW h}^{-1}$	Diel calcification $\mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1}\text{DW d}^{-1}$
$p\text{CO}_2$	0.005*	0.337	< 0.001***	< 0.001***	< 0.001***
Temperature	0.260	0.034*	0.062	0.032*	0.146
Aquarium	0.158	0.873	0.296	0.436	0.181
$p\text{CO}_2$ x temperature	0.375	0.610	0.427	0.008**	0.050
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$					
<i>Post hoc SNK test for $p\text{CO}_2$ and temperature factors independently ($p < 0.05$)</i>					
$p\text{CO}_2$	550 > 380 μatm		380 > 750 > 1000 μatm	380 > 550 > 750 > 1000	380 > 750 > 1000 μatm
	550 > 750 > 380 μatm		550 > 750 > 1000 μatm	μatm	
	550 > 1000 > 380 μatm				550 > 750 > 1000 μatm
temperature		10°C < 16°C		10°C > 16°C	
		10°C < 19°C			

Pigment analyses

A large number of pigments were detected in the HPLC analyses of maerl thalli, with most of them present as traces, and only the major pigments were identified (Figure 4). Even though thalli were brushed before extraction, pigment analyses revealed the presence of epiphytes on *L. corallioides* thalli: chlorophyll *b* (chl *b*), neoxanthin and siphonaxanthin derivatives are characteristic pigments of green seaweeds (*Ulvophyceae*). In particular, siphonaxanthin related compounds are common in siphonous green algae and *Umbraulva* species that commonly occur in maerl bed ecosystems (Cabioch 1969). Furthermore, fucoxanthin and diadinoxanthin were often detected, showing that brown plastid bearing organisms were also present on the maerl thalli (*Phaeophyceae*, diatoms, etc.;(Roy *et al.* 2011)). These epiphyte pigments were generally found in low amounts and their quantities were very variable from one sample to another, with no relation to the experimental setup.

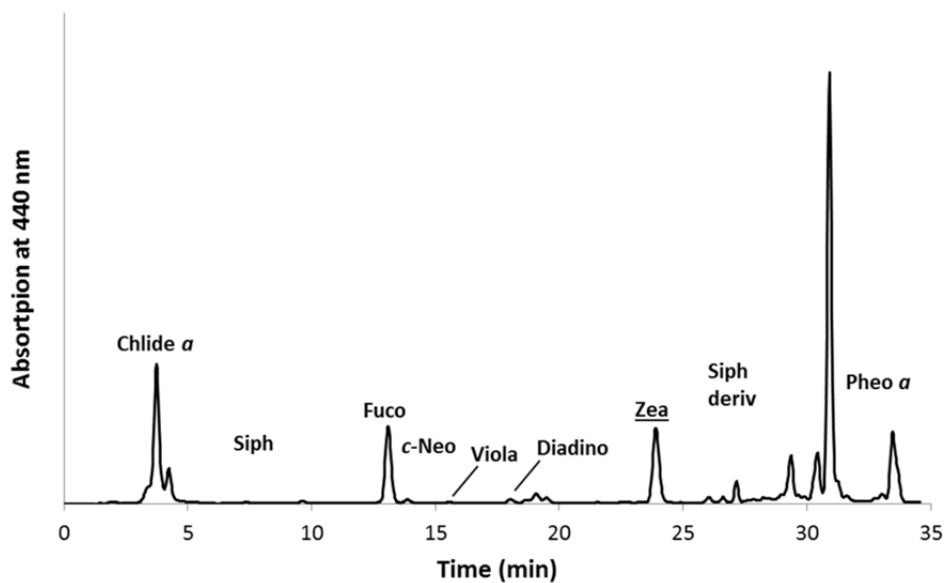


Figure 4: Example of photosynthetic pigments analysis by high pressure liquid chromatography of a *Lithotamnion coralloides* thallus. Underlined pigments are associated to *L. coralloides*. Abbreviations are as suggested by Roy *et al.* (2011): Chlide *a*: chlorophyllide *a*; Siph: siphonaxanthin; Fuco: fucoxanthin, *c*-Neo: 9'-*cis*-neoxanthin; Viola: violaxanthin; Zea: zeaxanthin; Siph deriv: siphonaxanthin derivative; Chl: chlorophyll; Pheo: pheophytin; Car: carotene.

Three pigments, zeaxanthin, chlorophyll *a* (chl *a*) and carotene, were systematically present in relatively high and stable amounts and were therefore attributed to *L. corallioides* (Figure 5). Chl *a* was the dominant pigment with concentrations varying between 37.81 ± 5.75 and $72.80 \pm 4.42 \mu\text{g g}^{-1}$ FW. Chlorophyllid *a*, a degradation product of chl *a* was detected at

all temperature and $p\text{CO}_2$ conditions, with concentrations ranging from 14.18 ± 2.34 to $27.48 \pm 2.76 \mu\text{g g}^{-1}$ FW. Carotene molecules, usually associated to chl a in photosystem reactive centers were also detected, with concentrations varying from 0.85 ± 0.18 at 16°C to $1.53 \pm 0.24 \mu\text{g g}^{-1}$ FW at 19°C (Figure 5b). The shouldered shape of the peak suggests the presence of both α - and β -carotene. The last characteristic pigment was the xanthophyll zeaxanthin whose contents ranged from 0.90 ± 0.07 to $1.35 \pm 0.20 \mu\text{g g}^{-1}$ FW at 16 and 10°C , respectively (Figure 5c). Interestingly, this zeaxanthin-based pigmentation does not agree with the chemosystematic pigmentation described by Schubert et al. (2006) for the Corralinales order to which *L. corallioides* belongs, and whose representative species usually contain lutein or antheraxanthin as major xanthophyll.

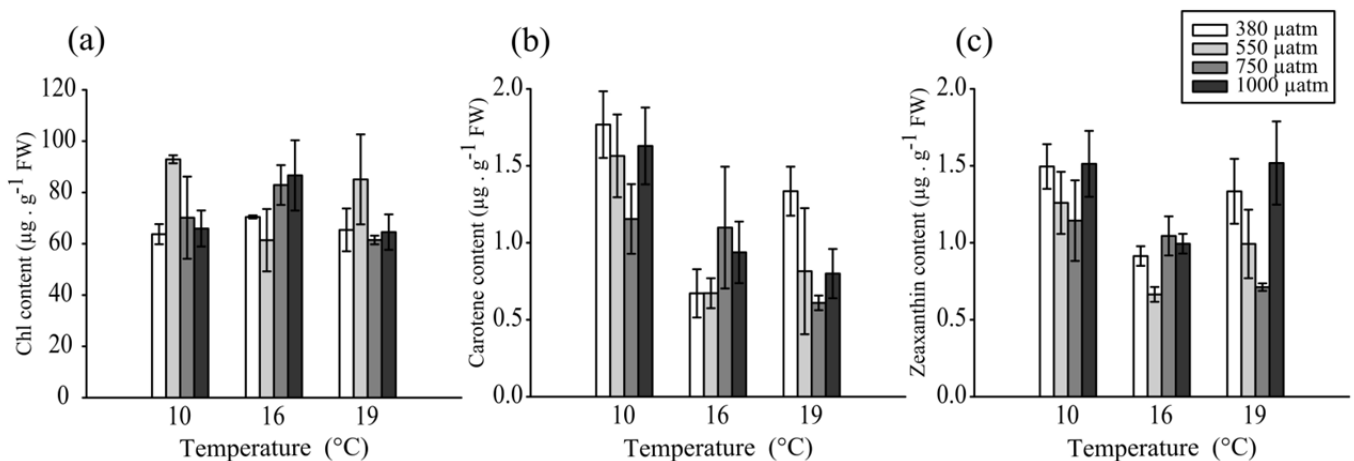


Figure 7 : Chlorophyll compounds (a), carotene (b) and zeaxanthin (c) contents in the four $p\text{CO}_2$ treatments at 10°C , 16°C and 19°C . Results are expressed by mean \pm standard error, $n = 3$ (or 6).

To examine the $p\text{CO}_2$ effect, chl a and chlorophyllid a were grouped as chl a compounds (Figure 5a). $p\text{CO}_2$ and aquarium had no detectable effect on pigment contents (Table 3), whereas temperature impacted all pigments, except chlorophyll a compounds (Table 3, $p = 0.732$). Carotene content was higher at 10°C than at 16 and 19°C . The zeaxanthin content was significantly different only between 10 and 16°C . The interaction between $p\text{CO}_2$ and temperature was never significant (Table 3).

Table 3: Summary of three-way ANOVAs followed by SNK post hoc tests testing the effects of $p\text{CO}_2$, temperature and aquarium on pigment contents. Chlorophyll compounds are the sum of chlorophyll *a* and chlorophyllid *a*. Bold numbers indicate significant level greater than 95%.

	Chlorophyll a compounds	Carotene	Zanthophyll
$p\text{CO}_2$	0.499	0.204	0.979
Temperature	0.732	< 0.001***	0.009**
Aquarium	> 0.05	> 0.05	> 0.05
$p\text{CO}_2$ x temperature	0.999	0.553	0.936

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

Post hoc SNK test ($p < 0.05$)

Temperature	10°C > 16°C 10°C > 19°C	10°C > 16°C
-------------	----------------------------	-------------

Calcification

Net calcification rate measured in the light was higher than calcification in the dark (Figure 6). The aquarium effect was non-significant for both light and dark calcification rates as well as diel calcification (Table 2).

In the light (Figure 6a), mean net calcification rates varied from 0.11 (10°C, 1000 μatm) to 0.35 $\mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$ (10°C, 380 μatm). Light calcification rates were affected by $p\text{CO}_2$ decreasing by 58% between 380 and 1000 μatm (Figure 6a). In the light, calcification was similar at 380 and 550 μatm and higher at 380 μatm than at 750 and 1000 μatm (Table 2). Temperature had no significant effect on calcification in the light ($p = 0.062$).

In the dark (Figure 6b), mean net calcification rates varied according to the temperature and $p\text{CO}_2$ conditions, from -0.10 to 0.19 $\mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$ (Figure 6b). Net calcification was positive in all $p\text{CO}_2$ and temperature treatments except at 1000 μatm at temperatures of 10 and 16°C, where dissolution processes were more important than calcification ones. Dark calcification was affected by $p\text{CO}_2$, temperature and the interaction of the two factors (Table 2). Rates of dark calcification increased significantly when temperature

as increased from 10°C to 16°C ($p = 0.032$), but this trend was not observed at 19°C. Dark calcification strongly decreased with increased $p\text{CO}_2$ (Table 2). It was negative at 1000 μatm , turning into net dissolution at 10 and 16°C. The interaction between temperature and $p\text{CO}_2$ was marked at 1000 μatm with an increase in dark calcification with rising temperature (Figure 6b).

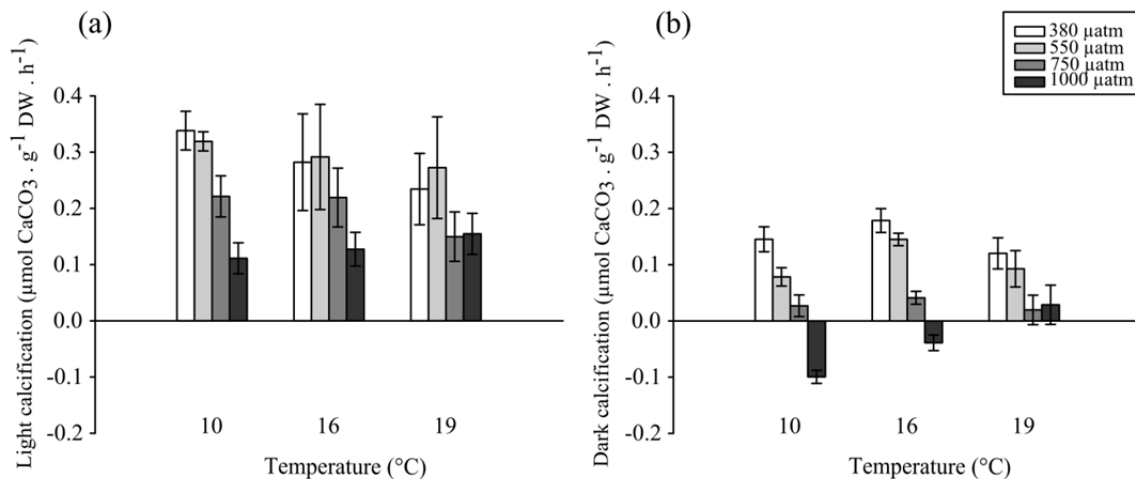


Figure 8: Calcification rates in the light (a) and dark (b) in the four $p\text{CO}_2$ treatments at 10°C, 16°C and 19°C. Results are expressed as mean \pm standard error, $n = 6$

Diel (24 h) net calcification rates calculated assuming a 12:12 photoperiod were presented in Figure 7. They ranged from 0.14 (10°C, 1000 μatm) to 5.80 $\mu\text{mol CaCO}_3 \text{g}^{-1} \text{DW day}^{-1}$ (10°C, 380 μatm). Diel calcification was significantly affected by $p\text{CO}_2$, decreasing by 50 and 80 %, respectively, at 750 and 1000 μatm relative to 380 μatm . No significant $p\text{CO}_2$ effect was detected between 380 and 550 μatm (Table 2). Temperature did not impact diel calcification. The interaction between $p\text{CO}_2$ and temperature was not significant but, at 1000 μatm , diel calcification increased from 0.14 $\mu\text{mol CaCO}_3 \text{g}^{-1} \text{DW d}^{-1}$ at 10°C to 2.20 $\mu\text{mol CaCO}_3 \text{g}^{-1} \text{DW day}^{-1}$ at 19°C (Figure 7).

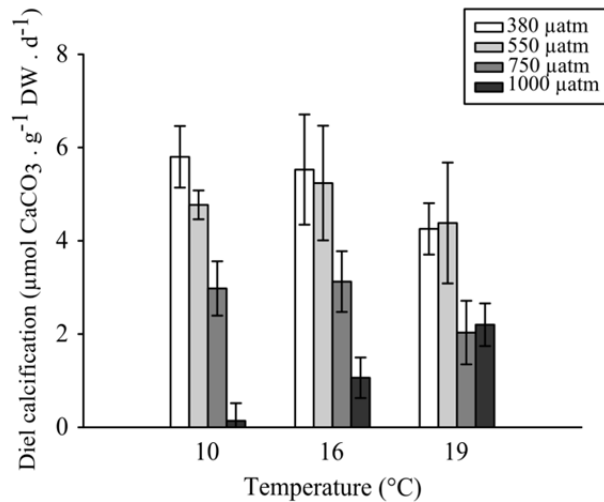


Figure 7: Diel calcification rates in the four $p\text{CO}_2$ treatments at 10, 16 and 19°C. Results are expressed as mean \pm standard error, $n = 6$.

Discussion

Studying ocean acidification in mesocosms represents a challenge because of the difficulties in reproducing field conditions in the laboratory with restricted material and time. Studies on the impact of elevated $p\text{CO}_2$ on coralline algae have shown strong species-specific responses (Martin *et al.* 2013b) which can vary between two studies on the same species. The different responses may be due to the timescale of the physiological measurement (short-term estimate vs integrated growth), the duration of the study (days vs months), the acclimation period or the time of the year (Hurd *et al.* 2009). In our study, we evaluated the impact of elevated $p\text{CO}_2$ at different temperatures on photosynthesis and calcification processes by measuring metabolic rates (gross primary production, respiration and calcification rates) in short-term measurements.

The gross primary production rate of *L. corallioides* measured under current $p\text{CO}_2$ (380 µatm) averaged $0.53 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$ at 10°C and 16°C. This production is estimated to be $0.45 \mu\text{mol C g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$ by using a photosynthetic ratio of 1.17 (Martin *et al.* 2006a). It was close to the rates recorded *in situ* for the same species at 10 m depth in the Bay of Brest in winter ($0.3 \mu\text{mol C g}^{-1} \text{ DW d}^{-1}$) and summer ($2.1 \mu\text{mol C g}^{-1} \text{ DW d}^{-1}$); (Martin *et al.* 2007b). These values are slightly lower than the productivity calculated by Steller *et al.* (2007) at 10°C for *Lithothamnion margaritae* in the Gulf of California ($3.45 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$) and

strongly lower than the rates reported for tropical coralline algae growing under higher irradiance and temperature (Payri 2000).

L. corallioides photosynthesis was not affected by temperature. This non responsiveness of photosynthesis to temperature was also observed in the rhodolith species *Phymatolithon calcareum* by Wilson *et al.* (2004). However, these findings contrast with previous results acquired *in situ* on *L. corallioides* (Martin *et al.* 2006a) and *L. margaritae* (Steller *et al.* 2007) which showed strong variations in photosynthesis according to seasonal changes in temperature. In these previous studies, photosynthesis was higher in summer, when temperatures were the highest. In the present study, the seasonal cycle was not applied as temperature was increased in short steps, independently from light intensity, photoperiod and nutrient adjustments. It is likely that the changes in productivity observed by Martin *et al.* (2006) and Steller *et al.* (2007) were also related to the seasonal variations of other environmental parameters.

No $p\text{CO}_2$ effect was detected on *L. corallioides* respiration rate. However, gross production was significantly affected by $p\text{CO}_2$ with an increase at 550 μatm relative to 380 μatm . In addition, no interactive effect between increased temperature and $p\text{CO}_2$ was observed on photosynthesis and respiration. Macroalgal response to elevated $p\text{CO}_2$ has been investigated in numerous studies (see Wu *et al.* 2008 and Hurd *et al.* 2009 for a review). Responses varied among species, from an enhancement (Gao *et al.* 1991) to a decrease in productivity (Gao & Zheng 2010) and many algae remained non impacted (Israel & Hophy 2002). As reported in *L. corallioides* under moderate $p\text{CO}_2$, other studies on coralline algae reported an increase in photosynthesis under elevated $p\text{CO}_2$ (Borowitzka 1981; Semesi *et al.* 2009a; Cornwall *et al.* 2012; Hofmann *et al.* 2012b). As a red coralline alga living in shaded environments, *L. corallioides* is likely to be a carbon concentrating mechanism (CCM)-lacking species (Giordano *et al.* 2005; Hepburn *et al.* 2011). Instead of using HCO_3^- , it may thus rely on CO_2 as photosynthetic substrate (Murru & Sandgren 2004; Hurd *et al.* 2009) and may be CO_2 limited in current $p\text{CO}_2$ (Kubler *et al.* 1999). The increased amount of CO_2 increases the affinity of the RuBisCO enzyme (Raven 2011) and may enhance gross primary production rate in *L. corallioides* under 550 μatm . This positive effect of increased $p\text{CO}_2$ decreased at 750 and 1000 μatm and may be attributed to the effect of lower pH level on periplasmic redox activity (Gao & Zheng 2010). Moreover, under elevated $p\text{CO}_2$, more energy can be required to cell maintenance, reallocated from down-regulating photosynthesis. The changes in photosynthesis may also be related to changes in algal photosynthetic pigments content according to $p\text{CO}_2$ and temperature treatments.

Among the main pigments determined in *L. corallioides* by HPLC, chl *a* compounds concentrations remained constant whatever the temperature and $p\text{CO}_2$ conditions. The absence of $p\text{CO}_2$ effect on algal chl *a* content was consistent with the results reported by Zou and Gao (2009) for *Gracilaria lemaneiformis*. Conversely, Gao and Zheng (2010) observed a down regulation of the chlorophyll content in *Corallina sessilis* under elevated $p\text{CO}_2$ that may be caused by a lower demand of energy for the HCO_3^- utilization mechanism. $p\text{CO}_2$ did not affect the carotenoids, but their concentrations decreased from 10°C to 16°C. This decrease between 10°C and 16°C may reflect an acclimation process from the *in situ* to the laboratory culture conditions. Such HPLC analyses do not allow the quantification of phycobiliproteins which are hydro soluble proteins. Although Zou and Gao (2009) did not observe a CO_2 effect on phycobiliproteins in *G. lemaneiformis*, other authors have shown that they were negatively affected by elevated $p\text{CO}_2$ in the coralline algae *Corallina sessilis* (Gao & Zheng 2010). A down regulation of phycobiliprotein contents at 750 and 1000 μatm could explain the decrease in gross production at these elevated $p\text{CO}_2$ relative to the 550 μatm condition.

In macroalgae, under light conditions, photosynthetic activity lead to a pH increase in the intercellular spaces and in the diffusion boundary layer. As *L. corallioides* precipitate CaCO_3 in their cell wall (Giraud & Cabioch 1979), the pH increase in intercellular spaces shifts the equilibrium toward an increase in CO_3^{2-} concentration (Borowitzka 1981; Koch *et al.* 2013) and promotes precipitation of CaCO_3 . Conversely, in dark conditions, respiration leads to a decrease in the intercellular pH, and hinder precipitation of CaCO_3 . This “vital effect” demonstrated by numerous authors (Borowitzka 1979; Gao *et al.* 1993; Hurd *et al.* 2009; Raven 2011) may explain the higher rates observed in the light than in the dark. The persistent diffusion boundary layer at the surface of coralline algae creates a pH microenvironment very different from the mainstream seawater (Hurd *et al.* 2009; Hurd *et al.* 2011) with strong diel pH variations ($\Delta\text{pH}_{\text{NBS}}$: 7.64 – 8.52; Hurd *et al.* 2011).

Calcification measured in *L. corallioides* at 380 μatm ranged between 0.58 and 0.60 $\text{mg CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW d}^{-1}$, it was close to the rate recorded *in situ* for *L. corallioides* at 10 meters depth of 0.1 $\text{mg CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW d}^{-1}$, in winter and 0.3 $\text{mg CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW d}^{-1}$, in summer (Martin *et al.* 2006a). The consistence between laboratory and *in situ* calcification data confirmed the good health and development of *L. corallioides* under experimental conditions. Only dark calcification was positively affected by increased temperature from 10 to 16°C at 380 and 550 μatm , and from 10 to 19°C at 1000 μatm . The effect of temperature on calcification rate was already underlined by several authors in various coralline algal species (Steller *et al.* 2007; Büdenbender *et al.* 2011) and in particular in *L. corallioides* (Martin *et al.*

2006a), in which calcification rates were the highest in summer, under warmer temperature. In our experiment, the temperature factor could not be dissociated from the time effect because temperature was progressively increased. Thus, even if temperature acclimation was quite long at each step (10, 16, 19°C), temperature impact on algal physiology has to be considered with caution. Particularly at 1000 μatm , increased calcification at 19°C may result from an acclimation of the physiology of *L. corallioides* to stressful $p\text{CO}_2$ condition.

The $p\text{CO}_2$ effect was more pronounced than the temperature effect on calcification with a decrease of the different calcification rates with increasing $p\text{CO}_2$. Diel calcification was lowered by 50% at 750 μatm to 80% at 1000 μatm . This general trend was already observed in several tropical coralline algae (Anthony *et al.* 2008; Semesi *et al.* 2009a; Diaz-Pulido *et al.* 2012). In polar species, net calcification may even turn into net dissolution under elevated $p\text{CO}_2$ (Büdenbender *et al.* 2011). This sensitivity of coralline algae to elevated $p\text{CO}_2$ is attributed to the high Mg-calcite they precipitate, which is the most soluble form of CaCO_3 . Light calcification in *L. corallioides* was less impacted by $p\text{CO}_2$ than dark calcification, as reported for *Corallina pilulifera* (Gao *et al.* 1993). This may be attributed to the changes in pH at the site of calcification due to photosynthesis and respiratory activities. Temperature and $p\text{CO}_2$ acted antagonistically at 1000 μatm , where diel net calcification increased with temperature from 10 to 19°C. Although most of the studies show that temperature exacerbated the negative impacts of ocean acidification in coralline algae (Anthony *et al.* 2008; Martin & Gattuso 2009; Diaz-Pulido *et al.* 2012), other authors reported that calcification remain unaffected under elevated temperature and $p\text{CO}_2$ (Johnson & Carpenter 2012). The mechanisms of the interactive effects between temperature and $p\text{CO}_2$ are yet not well understood and in our case can result from an acclimation process over time.

Rhodolith beds have low resilience in the face of major disturbances and are predicted to rapidly decline across the globe, at faster rates than those expected for coral reefs (Amado-Filho *et al.* 2012). Under the most optimistic future $p\text{CO}_2$ scenario (550 μatm), we showed that the gross production of rhodolith beds may be enhanced by 20 % and that their calcification may be maintained at rates similar to current rates. Accordingly, rhodolith beds may contribute in a larger way to the productivity of the ecosystem. In the Bay of Brest, this may lead to an increase in productivity from 241 to 289.2 $\text{g C m}^{-2} \text{y}^{-1}$ (Martin *et al.* 2007b). Moreover, soft red algae are largely present on rhodolith beds particularly microscopic stages of macroalgae as shown by the HPLC data. These life cycle stages are highly productive forms of macroalgae and may contribute in a large part to the global gross production of maerl beds. In summer, increase epiphytic macroalgal biomass has been observed on the

rhodolith beds of the Bay of Brest (Guillou *et al.* 2002). Under elevated temperature, soft macroalgae could become more important in rhodolith beds. Some authors have shown that, fleshy algae are favored against calcareous algae under elevated $p\text{CO}_2$, (Anthony *et al.* 2008; Kuffner *et al.* 2008). In a context of global change, soft macroalgae may be favored in detriment of rhodolith, leading to major changes in rhodolith bed functioning and productivity.

It is likely that the 550 μatm level will be exceeded and $p\text{CO}_2$ will reach 750 to 1000 μatm by the end of the century (Gattuso & Hansson 2011). Under the previous $p\text{CO}_2$ levels, *L. corallioides* primary production may remain constant but calcification is likely to decrease by up to 80% at 1000 μatm , relative to the ambient conditions. This may lead to a reduction in CaCO_3 precipitation from 490 (current $p\text{CO}_2$, (Martin *et al.* 2007b) to 97 g $\text{CaCO}_3 \text{ m}^{-2} \text{ y}^{-1}$ in the most pessimistic scenario (1000 μatm) in the Bay of Brest. The calcification process ($\text{Ca}^{2+} + 2\text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CaCO}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$) releases one mole of CO_2 for each mole of CaCO_3 precipitated (Wolf-Gladrow *et al.* 2007). In that way, the CO_2 released by maerl net calcification, currently estimated to 39 g C $\text{m}^{-2} \text{ y}^{-1}$ (Martin *et al.* 2007b), may be reduced to 8 g C $\text{m}^{-2} \text{ y}^{-1}$ at 1000 μatm . Such changes in carbonate production induced by elevated $p\text{CO}_2$ will thus have major implications for carbon and carbonate budgets in rhodolith beds. The decrease in calcification in rhodolith is also likely to cause major habitat losses for numerous species (Amado-Filho *et al.* 2012) and main changes in the ecosystem services they provide as habitat, food provision, predation sheltering for early life stages of numerous marine species and nurseries for commercial invertebrate and fishes (Kamenos *et al.* 2004b; Kamenos *et al.* 2004a).

Chapitre 3 : Synthèse générale sur l'impact de l'acidification des océans sur les Corallinacées en zone côtière

1. Réponses physiologiques individuelles des Corallinacées à l'AO

Les réponses physiologiques en termes de production primaire, respiration et calcification mesurées au cours des expériences menées dans cette thèse montrent qu'il n'existe pas de réponse standard des algues Corallinacées face à l'AO. Le processus de photosynthèse peut être stimulé comme contraint par l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ suivant la physiologie de chaque espèce. En revanche, la respiration est généralement non affectée (Tableau I3-1). Bien que la calcification présente une tendance assez générale à diminuer quand le pH diminue (Tableau I3-1), certaines espèces, notamment inféodées aux milieux hypervariables (cuvettes rocheuses, estran etc) semblent être préadaptées à de fortes variations de pH et ne souffrent d'aucun changement de calcification (ex : *Corallina elongata* ; Egilsdottir *et al.* 2013 ; Noisette *et al.* 2013a). Ces réponses sont spécifiques des espèces et peuvent varier en fonction des mécanismes d'assimilation de carbone des macroalgues (Hepburn *et al.* 2011) et de leur régulation pour économiser de l'énergie (Cornwall *et al.* 2012), d'adaptations développées en fonction de leur l'histoire de vie environnementale (*i.e.* les variations abiotiques subies par les organismes) (O'Connor *et al.* 2012) mais aussi en fonction des paramètres expérimentaux appliqués.

Les temps d'acclimatation aux différents scénarios de $p\text{CO}_2$ semblent jouer un rôle majeur dans les réponses mesurées chez les macroalgues (Harley *et al.* 2012). Hoffman *et al.* (2013) ont notamment montré que les premières réponses enzymatiques de *C. officinalis* à l'augmentation de $p\text{CO}_2$ n'avaient lieu que 3 semaines après le début de l'expérience. Alors que le taux de calcification de *Lithophyllum cabiochae* a été significativement réduit à une $p\text{CO}_2$ de 700 μatm au bout d'un mois de traitement, aucun effet de la $p\text{CO}_2$ n'a pu être mis en évidence sur le processus de calcification durant la suite de l'expérience menée sur un an (Martin & Gattuso 2009). Cette absence d'effet est le signe potentiel d'une acclimatation des algues à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ au cours du temps. La rapidité et la stabilité du stress dans le temps (*i.e.* faible pH constant versus variations de pH nyctémérales) peuvent aussi influencer les mécanismes de réponse des macroalgues (Cornwall *et al.* 2013b). Par exemple,

chez *Lithothamnion glaciale*, la calcification augmente pour résister à une diminution de pH qui reste stable dans le temps, alors qu'une diminution de pH rapide et brutale altère sa structure calcaire la rendant plus fragile (Kamenos *et al.* 2013). La vitesse réelle de la diminution du pH induite par le phénomène d'AO (0,02 à 0,045 unités an⁻¹ en zone côtière ; Wootton *et al.* 2008 et Provoost *et al.* 2010, respectivement) est impossible à reproduire à la même échelle temporelle en laboratoire en raison de moyens techniques, humains et financiers à mettre en œuvre. Respecter une phase d'acclimatation relativement longue devient alors important pour éviter d'observer des réactions subites à des phénomènes de stress et appréhender les réponses spécifiques des macroalgues, aussi réelles que possible, à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$.

Il est important de souligner que la majorité des études traitant de l'impact de la $p\text{CO}_2$ sur les macroalgues ont été conduites sur des thalles adultes. Il est en effet plus facile de récolter et d'utiliser ces stades macroscopiques que de travailler sur les jeunes stades de vie souvent microscopiques et dont la production en laboratoire n'est pas toujours maîtrisée. Les stades de vie précoces pourraient être les stades les plus sensibles à l'AO mais très peu d'études se sont concentrées sur leurs réponses physiologiques et leur colonisation dans un contexte d'augmentation de la $p\text{CO}_2$. Les jeunes thalles de l'algue Corallinacée encroûtante *Phymatholithon lenormandii* sont affectés par la diminution du pH, maintenant un processus de calcification désordonné malgré une augmentation de la mortalité et des anomalies du thalle (Bradassi *et al.* 2013). Cette sensibilité des jeunes stades d'algues calcaires est aussi démontrée dans une étude *in situ* de Porzio *et al.* (2013) réalisée sur le site d'Ischia en Italie où les émissions de CO_2 volcanique font naturellement diminuer le pH. En zone de faible pH, le recrutement des algues calcaires est quasi inexistant (Kroeker *et al.* 2013b) et les structures reproductives d'espèces calcifiantes comme *Jania rubens* sont réduites (Porzio *et al.* 2011). Ces modifications entraînent un changement dans les phases successives de colonisation des macroalgues. Les algues calcaires pionnières sont remplacées par des algues encroûtantes non calcaires et les communautés sont finalement dominées par des espèces gazonnantes (Porzio *et al.* 2013).

Tableau I3-1: Synthèse des études traitant de l'impact de l'acidification des océans (augmentation $p\text{CO}_2$) sur les Corallinacées. Les symboles ↑ et ↓ représentent respectivement une augmentation et une diminution des processus avec l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ alors que ∩ fait état d'une réponse en forme de cloche. — signifie qu'il n'y a pas de variation significative de la réponse en fonction de la $p\text{CO}_2$. Les réponses surlignées en bleu sont des réponses à une augmentation conjointe de la $p\text{CO}_2$ et de la température.

Milieu	Morphotype	Espèce	Photosynthèse	Respiration	Calcification	Référence
Tropical	Géiculée	<i>Amphiroa anceps</i>	∩			Borowitzka 1981
Tropical	Géiculée	<i>Amphiroa foliacea</i>	↑		—	Borowitzka 1981
Tropical	Géiculée	<i>Corallina sessilis</i>	↓		↓	Gao & Zheng 2010
Tropical	Encroutante	<i>Hydrolithon onkodes</i>			↓	Johnson & Carpenter 2012
Tropical	Rhodolithe	<i>Hydrolithon</i> sp.	—	—	↓	Semesi <i>et al.</i> 2009a
Tropical	Encroutante	<i>Lithophyllum pallescens</i> , <i>Hydrolithon</i> sp. <i>Porolithon</i> sp.			↓	Jokiel <i>et al.</i> 2008
Tropical	Encroutante	<i>Neogoniolithon</i> sp.			∩	Ries <i>et al.</i> 2009)
Tropical	Encroutante	<i>Porolithon gardineri</i>			↓	Agegian 1985
Tropical	Encroutante	<i>Porolithon onkodes</i>	↓		↓	Anthony <i>et al.</i> 2008
Tropical	Encroutante	<i>Porolithon onkodes</i>	↓↓		↓↓	Diaz-Pulido <i>et al.</i> 2012
Tropical	Encroutante	<i>Porolithon onkodes</i>			↓	Kline <i>et al.</i> 2012
Tempéré	Géiculée	<i>Bossiella orbinaria</i>			∩	Smith and Roth 1979
Tempéré	Géiculée	<i>Corallina elongata</i>	—	—	—	Egilsdottir <i>et al.</i> 2013
Tempéré	Géiculée	<i>Corallina elongata</i>	—	—	—	Noisette <i>et al.</i> 2013a
Tempéré	Géiculée	<i>Corallina officinalis</i>	— ou ↓	∩	↓	Hofmann <i>et al.</i> 2012b
Tempéré	Géiculée	<i>Corallina officinalis</i>	—	—	∩	Hofmann <i>et al.</i> 2012a
Tempéré	Géiculée	<i>Corallina pilulifera</i>			↓	Gao <i>et al.</i> 1993
Tempéré	Encroutante	<i>Lithophyllum cabiochae</i>	↓	—	— ou ↑	Martin <i>et al.</i> 2013b
Tempéré	Encroutante	<i>Lithophyllum cabiochae</i>	—	— ou ↓	— ou ↓	
Tempéré	Encroutante	<i>Lithophyllum cabiochae</i>			—	Martin & Gattuso 2009
Tempéré	Encroutante	<i>Lithophyllum incrustans</i>	—	↑	↓	Noisette <i>et al.</i> 2013a
Tempéré	Rhodolithe	<i>Lithothamnion corallioides</i>	↑	—	↓	Noisette <i>et al.</i> 2013a
Tempéré	Rhodolithe	<i>Lithothamnion corallioides</i>	∩	—	↓↓	Noisette <i>et al.</i> 2013b
Polaire	Rhodolithe	<i>Lithothamnion glaciale</i>	—	—	↓	Büdenbender <i>et al.</i> 2011
Polaire	Rhodolithe	<i>Lithothamnion glaciale</i>			↓	Ragazzola <i>et al.</i> 2012
Polaire	Rhodolithe	<i>Lithothamnion glaciale</i>			—	Ragazzola <i>et al.</i> 2013
Polaire	Rhodolithe	<i>Lithothamnion glaciale</i>	—	—	↑	Kamenos <i>et al.</i> 2013

¹ Les réponses de respiration et de photosynthèse ont été déterminées par mesures d'O₂, de flux de carbone ou de fluorescence (PAM). Les réponses de calcification ont été déterminées par la technique d'anomalie de l'alcalinité, mesure du "buoyant weight", ou croissance par marquage à l'alizarine.

Connaitre les réponses des différentes phases du cycle de vie ainsi que les variations des conditions abiotiques du milieu de vie des macroalgues est nécessaire pour tenter de comprendre leur devenir dans des conditions futures d'AO. Alors que les Corallinacées étaient présentées jusqu'alors comme étant parmi les organismes les plus sensibles à l'acidification des océans, principalement à cause de leur squelette en calcite magnésienne, de plus en plus d'études tendent à démontrer que certaines espèces présentent d'importants potentiels de résistance face à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$. De potentielles capacités d'adaptation (O'Connor *et al.* 2012), une grande plasticité phénotypique (Ragazzola *et al.* 2013) et la découverte de la dolomite comme composante des thalles calcaires (Nash *et al.* 2011; Nash *et al.* 2013) sont autant d'éléments qui amènent à réviser le jugement général de sensibilité de ces espèces dans un contexte d'acidification des océans.

2. Effets et interactions de stress multiples

Dans le milieu naturel, les phénomènes climatiques et vecteurs anthropiques occasionnent des variations physico-chimiques de l'environnement donnant lieu à différents stress simultanés. Dans de nombreux cas, l'impact d'un stress abiotique sur la physiologie et les performances des macroalgues dépend de la présence et de l'intensité d'autres facteurs, biotiques ou abiotiques, et particulièrement des facteurs limitants comme la lumière ou les nutriments (Harley *et al.* 2012). Malheureusement, les recherches sur l'AO en laboratoire sont contraintes par les moyens logistiques, ce qui limite souvent le nombre de facteurs testés.

De très nombreuses interactions existent entre les facteurs perturbants que sont la température, la dessiccation, le pH, la salinité ou la lumière (UV, intensité). Dans un contexte de changement climatique, les deux facteurs majeurs covariants avec l'augmentation de la concentration en CO_2 atmosphérique et les plus susceptibles d'impacter la physiologie des macroalgues sont la température et la $p\text{CO}_2$ (et indirectement le pH). Au cours de cette thèse, l'interaction des deux facteurs a été testée uniquement chez le maërl (Noisette *et al.* 2013b). Bien que l'on ne puisse complètement dissocier l'effet du temps (acclimatation) de l'effet de la température, puisque celle-ci a été augmentée par paliers successifs, la calcification nette dans la condition de $p\text{CO}_2$ la plus drastique (1000 μatm) a augmenté avec l'augmentation de la température. Cette réponse est l'une des rares montrant que, dans un contexte de changement climatique, l'augmentation de la température pourrait tamponner les effets de

l'augmentation de la $p\text{CO}_2$. En effet, les effets conjugués de l'augmentation de la température et de la $p\text{CO}_2$ ont jusqu'ici plutôt eu tendance à agir de manière additive, augmentant par exemple le blanchissement des thalles et diminuant les taux de calcification chez des algues calcaires encroûtantes tropicales comme tempérées (Anthony *et al.* 2008; Martin & Gattuso 2009; Diaz-Pulido *et al.* 2012).

La lumière est un des facteurs limitants majeurs pour les organismes autotrophes en milieu marin, particulièrement pour les Corallinacées vivant à plusieurs mètres de profondeur. Les deux expérimentations menées durant cette thèse sur les Corallinacées se sont déroulées sous une irradiance stable tout au long de la phase diurne mais d'intensité différente suivant les mésocosmes : alors que l'irradiance était de $30 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ dans l'expérience sur les trois Corallinacées comprenant l'espèce *Lithothamnion corallioides* (Article n°1), elle était seulement de $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ durant l'étude monospécifique sur *L. corallioides* (Article n°2). Les réponses de photosynthèse et de calcification de *L. corallioides* ont varié entre les 2 études, peut-être à cause de cette différence d'intensité lumineuse. Alors que sous $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, la photosynthèse présentait une courbe en cloche avec une valeur maximale à $550 \mu\text{atm}$, elle a seulement augmenté de manière significative à $1000 \mu\text{atm}$ sous une irradiance de $30 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. La calcification, affectée de manière très significative par l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ sous une irradiance de $15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ne présente qu'une légère tendance négative (non significative) sous une lumière plus importante. On peut donc supposer que sous une lumière limitante pour l'espèce *L. corallioides* ($15 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), l'effet de la $p\text{CO}_2$ sur le métabolisme est beaucoup plus drastique que dans des conditions de lumière plus favorables. Cette modulation par la lumière de réponses physiologiques des Corallinacées à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ a aussi été mise en évidence chez l'espèce *Hydrolithon onkodes*. Cette espèce tropicale encroûtante présente une réponse parabolique de calcification sous une lumière de $336 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Johnson & Carpenter 2012) alors qu'une diminution constante est mesurée sous $1200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Diaz-Pulido *et al.* 2012). Ceci implique que l'effet de la $p\text{CO}_2$ peut varier en fonction de l'intensité lumineuse mais aussi au cours du cycle saisonnier des Corallinacées (Martin *et al.* 2013b) et que les réponses des macroalgues doivent être étudiées sous différentes conditions de lumière.

La quantité de nutriments contenue dans le milieu est un troisième facteur d'importance majeur pour le métabolisme algal. Durant cette thèse, les quantités de nutriments des aquariums contenant les algues n'ont pas été contrôlées, car l'eau arrivant dans

les aquariums était pompée directement en face de la Station Biologique. Les concentrations en nutriments ont donc été considérées comme proches de celles mesurées *in situ* sur une zone proche du point de pompage alimentant les installations de la Station Biologique (SOMLit, moyennes annuelles, $4,89 \mu\text{mol NO}_3 \text{ L}^{-1}$ et $0,26 \mu\text{mol PO}_4 \text{ L}^{-1}$, $n = 45$). Il a été supposé que l'azote et le phosphore n'étaient pas des facteurs limitant le développement des algues car présents en quantité suffisante dans l'eau de mer fournie en continu aux mésocosmes en circuit ouvert. La saturation du milieu en nutriment peut influencer de manière considérable sur les réponses algales à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$. Le recouvrement des espèces gazonnantes étudiées par Russel *et al.* (2009) dans des conditions élevées de $p\text{CO}_2$ a été diminué dans des conditions de nutriments similaires à celles de leur milieu et augmenté quand la concentration en nutriments a été augmentée (Russell *et al.* 2009). A l'inverse, chez *Ulva rigida*, la quantité de substrat azoté n'a pas influé sur sa réponse métabolique à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ (Gordillo *et al.* 2001). La croissance a augmenté et la photosynthèse a diminué sous $p\text{CO}_2$ élevée quelle que soit la condition de saturation en azote.

Il est difficile de prédire quel sera l'effet combiné de plusieurs facteurs de stress et seules les expériences "multi stress" étudiant l'interaction de différents facteurs peuvent mettre en évidence les effets synergétiques, additifs ou antagonistes que peuvent avoir la combinaison de plusieurs facteurs abiotiques.

3. Impacts sur les communautés algales

La connaissance des caractéristiques physiologiques des algues peut servir à prédire les changements de systèmes dominés par des macroalgues sous un scénario d'augmentation de la $p\text{CO}_2$. Par exemple, les espèces algales possédant des CCMs sont majoritaires dans les milieux à forte irradiance où la quantité importante de lumière permet d'exploiter au maximum ces mécanismes afin d'avoir une croissance optimale. A l'inverse, les algues ne possédant pas de CCMs dominent dans les milieux moins lumineux où la faible irradiance limite l'utilisation des CCMs coûteux en énergie (Hepburn *et al.* 2011). Cependant, les changements écologiques dans les écosystèmes côtiers résultent d'une combinaison d'impacts environnementaux directs sur les réponses individuelles des espèces et de modification des interactions entre les espèces (Harley *et al.* 2006). Bien que l'approche spécifique sur des individus isolés soit nécessaire pour comprendre les mécanismes inhérents aux effets du

changement global, elle ignore les interactions spécifiques qui peuvent tamponner ou amplifier les réponses individuelles et affecter les réponses prédites au niveau de la communauté (Kroeker *et al.* 2010).

Les impacts directs de l'AO sur les espèces sensibles vont orienter la composition de l'écosystème et ses réponses. Dans des milieux où une espèce a un rôle majeur dans la communauté, cette espèce majoritaire a plus d'effet sur l'écosystème que la diversité spécifique du milieu (Olabarria *et al.* 2013). Dans les forêts de kelps, la structure de la canopée affecte la disponibilité en ressource (oxygène, lumière, nutriments ; Hauri *et al.* 2010; Hepburn *et al.* 2011) pour les différentes algues de sous canopée et modifie différents paramètres physico-chimiques comme le pH ou le courant (Cornwall *et al.* 2013a). Les kelps jouent alors un rôle très important dans la modification des performances des assemblages de macroalgues et déterminent les réponses fonctionnelles de ces assemblages face au changement climatique (Connell & Russell 2010; Hepburn *et al.* 2011; Cornwall *et al.* 2013a). Ainsi, alors que sous conditions de $p\text{CO}_2$ actuelle, les canopées formées par les kelps inhibent la formation d'espèces gazonnantes, l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ a un effet direct sur l'inhibition du recrutement des kelps et favorise ainsi indirectement le développement et la croissance de ces espèces gazonnantes (Connell & Russell 2010). Par conséquent, l'altération des conditions environnementales au sein d'une communauté, par un phénomène comme l'acidification des océans peut déséquilibrer le système et favoriser une espèce normalement secondaire au détriment d'une espèce dominante.

L'augmentation de la $p\text{CO}_2$ peut agir comme un facteur de stress pour certaines espèces algales mais aussi comme une ressource pour d'autres permettant une augmentation de la photosynthèse (Connell *et al.* 2013). La disponibilité des ressources et la tolérance aux stress environnementaux conditionnent les capacités de compétition des espèces algales et de ce fait, influencent la mise en place des communautés. L'augmentation de CO_2 n'aura pas le même effet sur toutes les algues, dont les performances physiologiques varient en fonction de leur mode d'acquisition du carbone, de leur morphologie et de leur histoire de vie (espèce annuelle ou pérenne), et donc *in fine* sur la composition des communautés algales (Harley *et al.* 2012).

L'impact de l'acidification des océans sur les communautés a été principalement étudié sur des sites naturellement acidifiés à cause de dégazage de CO_2 pur par de l'activité volcanique sous-marine. Des études sur le site italien d'Ischia (Hall-Spencer *et al.* 2008;

Martin *et al.* 2008; Porzio *et al.* 2011; Porzio *et al.* 2013) et en Papouasie Nouvelle Guinée (Fabricius *et al.* 2011; Johnson *et al.* 2012) ont mis en évidence une diminution générale de la richesse spécifique et de la quantité d'espèces de macroalgues calcifiantes ainsi qu'une dominance en macroalgues non calcifiantes (principalement des espèces gazonnantes) dans ces zones au pH naturellement faible. Ce changement de composition de communautés s'explique principalement par la diminution de l'abondance et du recouvrement des algues calcaires qui libère de l'espace pour des espèces non calcaires compétitrices (Kuffner *et al.* 2008; Kroeker *et al.* 2013b) comme les espèces gazonnantes ou les espèces formant des tapis (Connell *et al.* 2013) qui ont des rôles écologiques plus limités (Hepburn *et al.* 2011). Dans des conditions futures d'acidification des océans et d'augmentation de la ressource en CO₂, il est ainsi prédit que les espèces à colonisation et croissance rapides avec un temps de génération court seront favorisées et pourront remplacer par compétition les espèces pérennes à croissance lente qui colonisent actuellement le plus d'espace dans les écosystèmes à macroalgues (Connell *et al.* 2013).

De plus en plus, des projets de manipulation de la $p\text{CO}_2$ *in situ* appelés projets x-FOCE ("Free Ocean Carbon dioxide Enrichment Experiment") se développent afin d'observer les réponses individuelles et communautaires des organismes dans les conditions de vie qu'ils expérimentent vraiment (exemples dans Kline *et al.* 2012; <http://efoce.eu/>). Dans ces dispositifs, l'impact de l'AO est étudié en interaction avec les facteurs abiotiques et biotiques au sein de communautés.

PARTIE 2

Impact de l'acidification des océans sur le gastéropode invasif *Crepidula fornicata*



PARTIE 2

Impact de l'acidification des océans sur le gastéropode invasif *Crepidula fornicata*

Dans cette deuxième partie, l'impact de l'acidification des océans a été étudié sur le gastéropode *Crepidula fornicata* Linné, espèce invasive sur les côtes européennes. Les études se sont d'abord concentrées sur les adultes de crépidule, connus comme étant très tolérants aux variations des facteurs abiotiques. Leur résistance à un fort stress thermique a tout d'abord été évaluée dans différentes conditions de $p\text{CO}_2$ puis plusieurs fonctions métaboliques ont été mesurées sous divers scénarios d'acidification des océans prévus aux horizons 2100 et 2300. Les jeunes stades de vie sont souvent considérés comme plus sensibles aux variations physico chimiques que les adultes de la même espèce. Le travail a donc ensuite porté sur différents jeunes stades de vie de la crépidule, espèce qui a la particularité d'encapsuler ses embryons jusqu'à leur développement en larves véligères. Cette partie est divisée en différents chapitres :

Chapitre 1 : Généralités sur la crépidule et la physiologie des mollusques marins

Chapitre 2 : Impacts de l'acidification des océans sur le stade de vie adulte de la crépidule

- Article n°3: Noisette F, Richard J, Le Fur I, Peck L, Davoult D, Martin S, *Metabolic responses to temperature stress under elevated $p\text{CO}_2$ in the slipper limpet *Crepidula fornicata*, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. (en révision)*
- Article n°4: Noisette F, Bordeyne F, Davoult D, Martin S, *From physiological processes to population extrapolation: the responses of *Crepidula fornicata* to elevated $p\text{CO}_2$ at different temperature levels*

Chapitre 3 : Impacts de l'acidification des océans sur les jeunes stades de vie de la crépidule

- Article n°5: Noisette F, Comtet T, Legrand E, Bordeyne F, Davoult D, Martin S, *Does encapsulation protect embryos from ocean acidification? The example of *Crepidula fornicata*, Plos One (soumis)*

Chapitre 4 : Synthèse générale sur l'impact de l'acidification des océans sur l'espèce invasive *Crepidula fornicata*

Chapitre 1 : Généralités sur la crépidule et la physiologie des mollusques marins

1. Caractéristiques biologiques de la crépidule

La crépidule, *Crepidula fornicata* est un gastéropode filtreur de la famille des Calyptraeidae qui présente des caractéristiques biologiques originales. C'est une espèce grégaire qui vit en chaînes composées en moyenne d'une dizaine d'individus (Coe 1936; Blanchard 1995). Par hermaphroditisme protandre, l'individu mâle au début de sa vie va progressivement changer de sexe pour devenir femelle (Collin 1995). Ainsi la base des chaînes, fixée sur un substrat dur, est constituée d'individus âgés de grande taille, de sexe femelle (sauf exception) alors que les petits individus au sommet de la chaîne, plus jeunes, sont généralement des mâles (Figure II1-1) (Le Cam 2009).



Figure II1-1 : Différences entre mâles (gauche) et femelles (droite) de *C. fornicata*. Flèche violette : pénis, Flèche rouge : papille génitale femelle. Photos issues de Le Cam (2009).

Comme de nombreux invertébrés marins, la crépidule a un cycle de vie benthopélagique (Figure II1-2) avec des écophases benthiques (juvéniles, adultes, embryons) et une écophase pélagique (larve) (Orton 1912). Après fécondation interne, les embryons se développent dans des capsules ovigères maintenues entre le cou et le propodium de la femelle pendant 3 à 4 semaines (Chipperfield 1951). Ces capsules sont rattachées au substrat de fixation de la femelle par un pédoncule (Orton 1912). A la fin de période d'incubation, la paroi de la capsule se rompt et les larves véligères d'une taille moyenne de 400 μm sont émises dans la colonne d'eau (Pechenik & Lima 1984). Le développement pélagique peut

durer entre 2 et 7 semaines en fonction de différents paramètres biotiques et abiotiques (Pechenik 1984). Cette phase d'émission est d'importance majeure pour la dispersion et la survie des populations (Pechenik 1999). Au cours du développement pélagique, les larves acquièrent la compétence et deviennent aptes à se métamorphoser à des tailles de 900-1000 μm (Pechenik & Lima 1984; Eyster & Pechenik 1988). La phase de métamorphose permet la transformation de la larve nageuse en juvénile sédentaire qui va recruter sur le fond en réponse à des stimuli naturels variés tels que la présence d'adultes conspécifiques ou de films bactériens (Pechenik & Lima 1984). Les juvéniles, mobiles au début, vont ensuite définitivement se sédentariser sur une chaîne (Orton 1912).

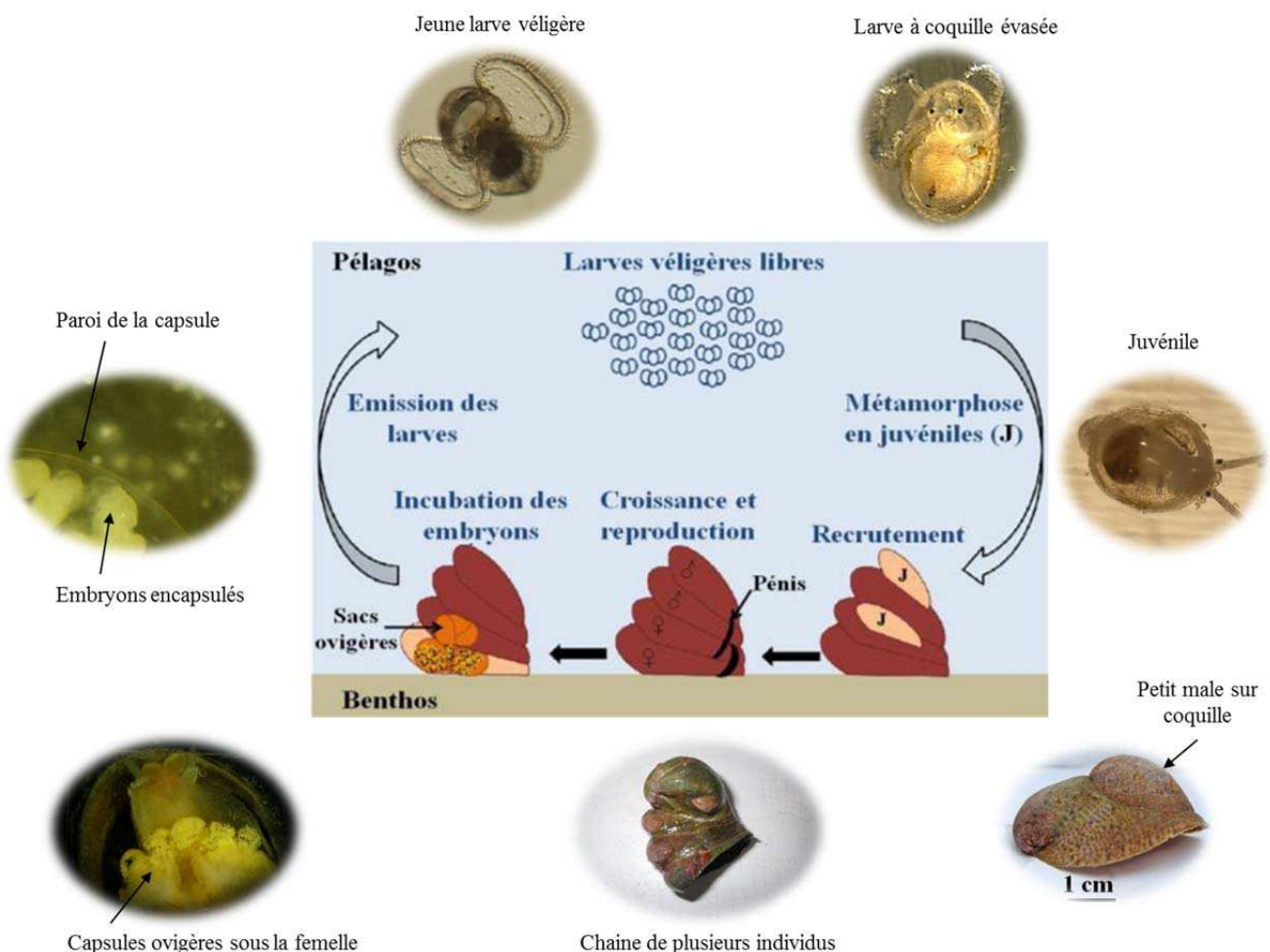


Figure III-2: Cycle benthopélagique de *C. fornicata*. Schéma central issu de Leroy (2011)

2. Introduction et invasion de la crépidule en Europe

Originnaire de la côte Est de l'Amérique du Nord (du Canada aux Caraïbes), la crépidule a été introduite sur les côtes européennes à la fin du 19^{ème} siècle. D'abord accidentellement importée en Angleterre avec les transferts d'huitre américaine *Crassostrea virginica* (Cole 1952), elle a ensuite proliféré vers le nord jusqu'à atteindre le sud de la Suède.

Sur les côtes françaises de la Manche et de l'Atlantique Nord, l'introduction s'est faite en deux phases majeures au cours du 20^{ème} siècle (Blanchard 1995) (Figure III-3). Les premières présences de crépidules ont été détectées sur les côtes normandes et en rade de Brest après la fin de la Seconde guerre mondiale. Les organismes auraient été amenés par les navires américains du débarquement, longtemps stationnés dans les ports anglais colonisés par les crépidules (Cole 1952). La deuxième phase de l'invasion a eu lieu lors de l'arrivée massive d'huitres creuses *Crassostrea gigas* dans les années 1970, importées dans les parcs ostréicoles pour faire face aux fortes mortalités de l'huitre portugaise *Crassostrea angulata* (Blanchard 1995). Suite à une rapide expansion, la crépidule a conquis une grande partie du littoral français et européen, depuis le sud de la Suède jusqu'au sud de la France (Hoagland 1979; Blanchard 1995; Blanchard 1997).

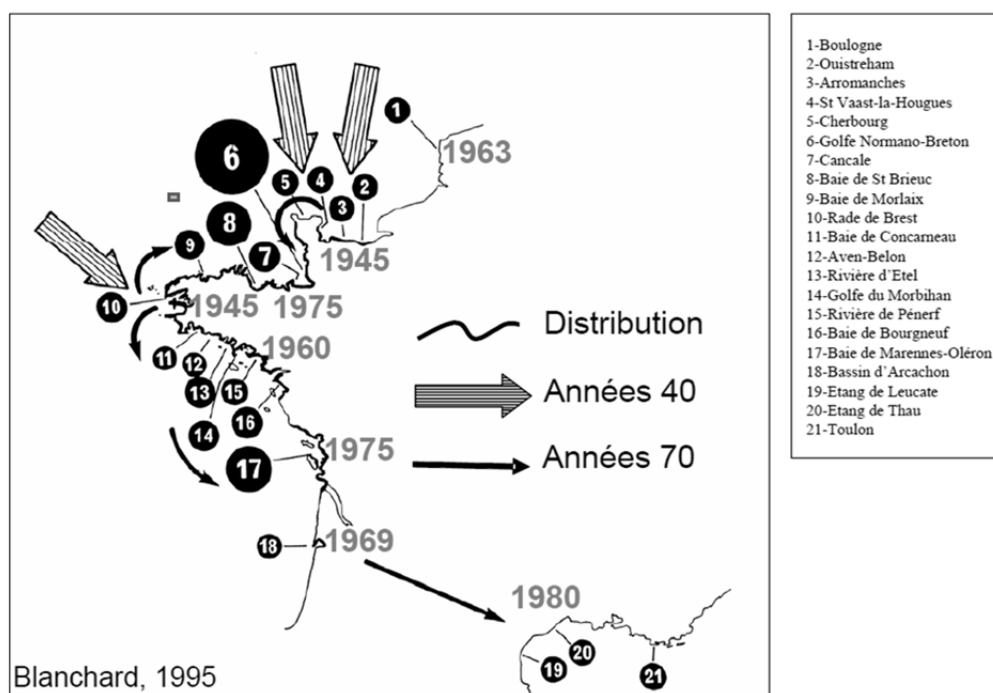


Figure III-3: Dynamique d'invasion de la crépidule sur le littoral français. Issu de Blanchard (1995)

Sur le littoral français, le golfe normano-breton avec une moyenne de 200 individus m^{-2} (Dupont 2004), est une des zones les plus fortement colonisées, avec cependant une grande hétérogénéité de peuplements. Les densités atteignent 250 000 tonnes en baie de Saint-Brieuc (Blanchard 1997) ou encore des pics de 2000 individus m^{-2} en baie du Mont-Saint-Michel (Viard *et al.* 2006). En baie de Morlaix en revanche, les densités sont bien moindres avec une moyenne de 21 individus par m^2 (Dupont 2004). La rade de Brest est également l'une des baies les plus densément peuplées par les crépidules. Le stock, estimé à 120 000 tonnes de poids frais en 2004, atteint des densités de 1700 individus m^{-2} (Ragueneau *et al.* 2002).

3. Impacts écologiques et économiques de la crépidule

La crépidule est une espèce eurytherme et euryhaline capable de coloniser tous types de substrats. L'introduction de la crépidule a eu des conséquences importantes sur la composition et le fonctionnement des communautés benthiques. Dans les milieux qu'elle a colonisés, cette espèce a entraîné une modification du substrat en augmentant l'hétérogénéité spatiale tout en étant responsable d'un important envasement des fonds liés à l'accumulation de fécès et pseudofécès (Ehrhold *et al.* 1998). Ces diverses modifications ont entraîné un changement de la composition des peuplements benthiques et en particulier de la faune associée (De Montaudouin *et al.* 1999; De Montaudouin & Sauriau 1999) tendant vers une homogénéisation des fonds (Thieltges *et al.* 2006). Alors que la compétition trophique de la crépidule avec les autres filtreurs reste controversée (Blanchard 1997; Decottignies *et al.* 2007a; Decottignies *et al.* 2007b), la compétition spatiale exercée par la crépidule a des effets négatifs sur les espèces natives. Le développement des crépidules aurait un impact majeur sur la densité de juvéniles de soles (*Solea solea*) dans les nurseries du Golfe de Gascogne (Le Pape *et al.* 2004) ou encore sur le recrutement de la coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus*) en rade de Brest (Thouzeau *et al.* 2000). Au niveau de l'écosystème, les processus de respiration, de calcification et d'excrétion des crépidules dans les zones où elles se sont développées en forte densité sont à l'origine de modifications des cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et de la silice (Ragueneau *et al.* 2002; Martin *et al.* 2006b; Martin *et al.* 2007c).

Outre les impacts écologiques, l'introduction de la crépidule a aussi un impact économique (Blanchard 1997). La compétition spatiale et trophique avec des espèces d'intérêt commercial influence de manière indirecte les activités conchylicoles et de pêcheries. De manière plus directe, la colonisation par les crépidules induit aussi des coûts supplémentaires aux professionnels de la mer comme par exemple pour le nettoyage des coquilles Saint Jacques (Fresard & Boncoeur 2006). Cependant, récemment, cette espèce considérée depuis toujours comme nuisible tente d'être valorisée à travers sa commercialisation pour l'alimentation humaine sous le nom de "berlingot de mer" (projet OPTICREP; Schoenn 2013) ou pour sa transformation en amendement calcaire (Blanchard & Hamon 2006).

4. Processus physiologiques chez les mollusques

4.1 Métabolisme

Le métabolisme est l'activité d'un organisme vivant qui permet son maintien et son croissance et qui repose sur des réactions chimiques catalysées par des enzymes (Lucas 1992). Les voies métaboliques sont classées en deux types : (i) les voies de synthèse organique (anabolisme ou biosynthèse) et (ii) les voies de dégradation (catabolisme). Les mollusques sont des organismes hétérotrophes (Wilbur & Yonge 1964) qui, par le processus de respiration, produisent du CO₂ et de l'énergie sous forme d'ATP (adénosine-5'-triphosphate) à partir de matière organique (C₆H₁₂O₆: glucose), d'oxygène (O₂), d'ADP (adénosine-diphosphate, précurseur de l'ATP) et de phosphate inorganique (Pi) selon la formule suivante (Lucas 1992) :



La matière organique est apportée par l'ingestion et l'absorption matière première (végétaux ou animaux) par le processus de nutrition ou par utilisation des réserves de l'individu. L'énergie générée par la respiration permet le fonctionnement, la croissance et la reproduction des organismes. Le catabolisme (des lipides, glucides ou protides) génère une production de déchets qui doivent être évacués hors de l'organisme par des processus d'excrétion (ex : excrétion ammoniacale) (Lucas 1992).

4.2 Régulation acide-base

Afin d'assurer un fonctionnement optimal des réactions biochimiques à l'intérieur de l'organisme, les invertébrés maintiennent un pH interne basique, souvent à des niveaux bien supérieurs à celui de l'environnement. Il existe deux systèmes tampons permettant le maintien du pH interne (Melzner *et al.* 2009) : le système des bicarbonates (HCO_3^-), et le système ne les utilisant pas. Le système des HCO_3^- , permet l'accumulation d'ions HCO_3^- , d'origine métabolique ou importés depuis l'eau de mer, dans les compartiments extracellulaires où ils se lient aux ions H^+ libres afin de limiter la diminution du pH interne. Il est cependant peu efficace chez les invertébrés marins (Michaelidis *et al.* 2005) et est relayé par le système n'utilisant pas les HCO_3^- (Melzner *et al.* 2009). L'action tampon de celui-ci est principalement issue de la protonation (ajout d'un proton) des groupements amino-acides des protéines ou des groupes phosphates. Les H^+ surnuméraires sont ensuite éliminés par transport actif à travers des épithéliums spécialisés afin de restaurer le pH originel des fluides (Melzner *et al.* 2009).

5. Formation de la coquille calcaire

Comme de nombreux mollusques, la crépidule forme une coquille calcaire, composée d'aragonite à plus de 97 % (Ries 2011a). La formation de cette coquille calcaire commence dès l'embryon avec production d'une protoconque I à la fin du stade trocophore. Puis une protoconque II est formée par la larve véligère avant la production de la coquille finale du futur adulte (teleoconque) au stade juvénile (ex : *Haliotis tuberculata* dans Auzoux-Bordenave *et al.* 2010).

Chez les mollusques, le processus de calcification se produit dans un compartiment de faible volume, entre l'extérieur du manteau bordé par l'épithélium calcifiant et la face interne de la coquille baignée par le fluide extrapalléal (Figure II1-4). Les mécanismes de calcification chez les mollusques ne sont pas encore complètement élucidés. Une matrice organique est sécrétée dans un premier temps afin d'initier le processus de cristallisation aussi appelé nucléation (Marin and Luquet 2004). Le CaCO_3 est ensuite déposé au site de nucléation qui serait toujours maintenu dans des conditions de sursaturation en CaCO_3 soit $\Omega > 1$ (Wada and Fujinuki 1976; Weiner and Dove 2003) alors que le reste du fluide extrapalléal

pourrait être exposé à des épisodes de sous-saturation ($\Omega < 1$) (Thomsen et al. 2010). Les ions contenus dans le fluide extrapalléal ne semblent pas être présents en quantité suffisante pour réaliser le processus de calcification. Le taux de formation de la coquille serait alors maintenu par le passage d'ions Ca^{2+} et HCO_3^- depuis le milieu extérieur vers le compartiment extrapalléal, la conversion du CO_2 métabolique en ions HCO_3^- (puis en CO_3^{2-}) par l'anhydrase carbonique dans ce compartiment et le transport actif d'ions Ca^{2+} à travers le manteau (Wilbur 1976) (Figure III-4). Les cristaux de CaCO_3 nouvellement formés sont ensuite intégrés dans la matrice et orientés afin de former les futures couches prismatique et nacrée (Wilbur 1976).

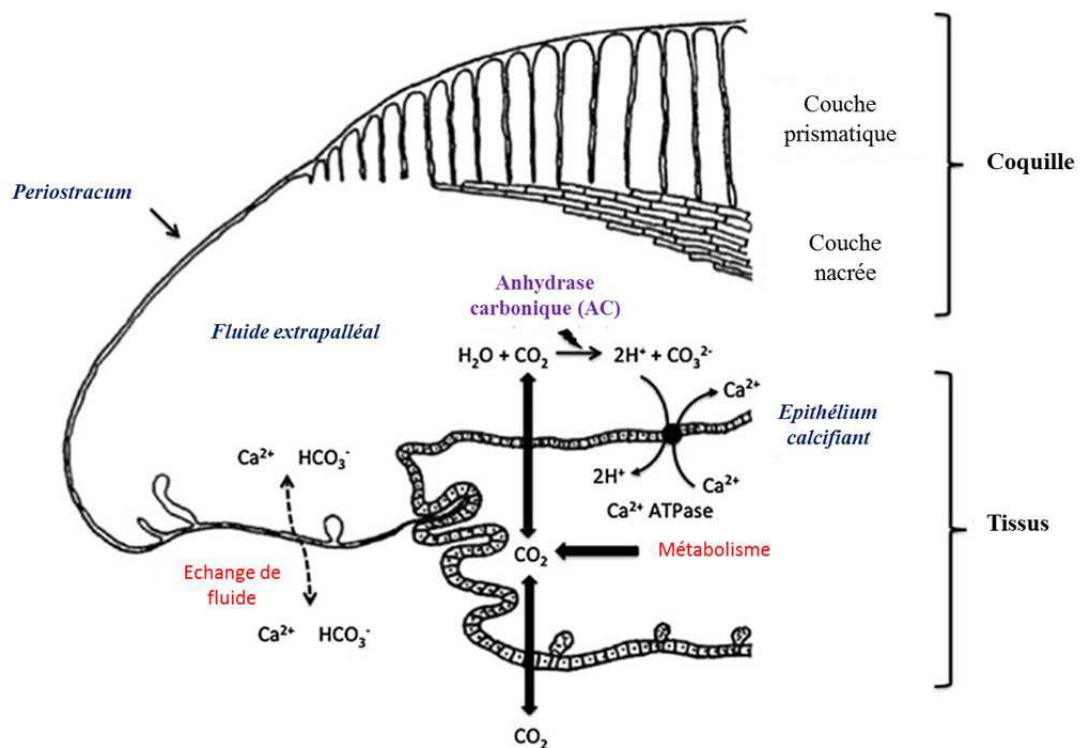


Figure III-4: Processus de calcification chez les mollusques. Issu de Gazeau *et al.* (2013) adapté de Marin & Luquet (2004). Les noms en bleu indiquent les différents tissus et compartiments où se font les échanges. Les noms en rouge indiquent l'origine des différentes formes de carbone et des ions.

La calcification chez les mollusques est un processus hautement régulé par l'organisme (Wilbur 1976) et qui est considéré comme coûteux à l'individu (Palmer 1992). De plus, de nombreux stress abiotiques et biotiques comme la température (Watson *et al.* 2012b), la pression hydrostatique (Machado *et al.* 2009), la salinité (Malone & Dodd 1967), la quantité de nourriture (Melzner *et al.* 2011) ou le parasitisme et la prédation (Lomovasky *et al.* 2005) sont susceptibles d'affecter le processus de calcification.

Chapitre 2 : Impact de l'acidification des océans sur la phase adulte de la crépidule

1. Etat de l'art sur l'impact de l'AO sur les mollusques marins

En tant que phylum abondant, largement distribué dans les océans et producteurs majeurs de CaCO_3 dans les écosystèmes marins, les mollusques ont largement été étudiés dans un contexte d'augmentation de la $p\text{CO}_2$. Les caractéristiques morpho-fonctionnelles et écologiques au sein de ce phylum sont très variées avec des espèces benthiques et d'autres planctoniques, certaines mobiles et d'autres sédentaires, avec une coquille externe ou un reliquat de coquille interne. Les différences de sensibilité au CO_2 étant potentiellement liées au niveau organisationnel de l'animal, à ses besoins énergétiques et à son mode de vie (Pörtner *et al.* 2004), les réponses des différentes espèces de mollusques à l'AO sont très variables comme le montrent les différentes réponses des bivalves, gastéropodes et céphalopodes listées dans la revue de Parker *et al.* (2013).

En milieu côtier, les principaux représentants des mollusques sont les bivalves et les gastéropodes. Une revue récente de Gazeau *et al.* (2013) recensant les réponses de ces espèces (21 espèces de bivalves et 8 espèces de gastéropodes) à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ a souligné que, malgré de nombreux impacts négatifs de la $p\text{CO}_2$ sur différentes fonctions écologiques et comportementales, la majorité des études portant sur la calcification ou la croissance coquillière (22 expériences) ne démontraient pas d'impact de l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ pour des diminutions de pH inférieures à 0,4 unités par rapport à la valeur actuelle (Figure II2-1). Cette absence d'effet sur un processus réputé sensible à l'AO serait due aux capacités des organismes à réguler leur équilibre acido-basique internes, à la minéralogie de la coquille mais aussi aux conditions environnementales de l'habitat des organismes. En effet, les mollusques des habitats côtiers subissent de fortes variations de la $p\text{CO}_2$ et de nombreuses espèces sont certainement déjà adaptées aux faibles pH.

Les effets de l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ peuvent aussi affecter des fonctions physiologiques autres que la calcification comme la respiration, l'excrétion, la capacité à se nourrir ou les réponses immunitaires (Figure II2-1) (Parker *et al.* 2013). Alors qu'aucune étude n'a à ce jour étudié la réponse du bilan énergétique total d'une espèce dans des

conditions élevées de $p\text{CO}_2$ (Gazeau *et al.* 2013), il est important d'étudier ces processus en parallèle pour comprendre la sensibilité des organismes à l'AO et quelles peuvent être les fonctions métaboliques ou physiologiques privilégiées dans un tel contexte de stress ainsi que les régulations mises en place pour s'adapter à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$.

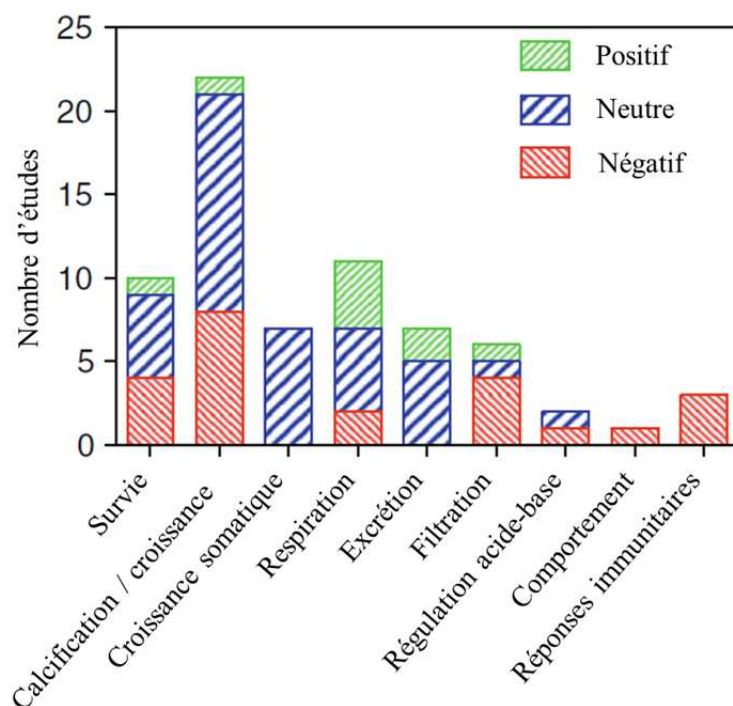


Figure II2-1: Résumé des impacts de l'AO sur les juvéniles et adultes de bivalves et gastéropodes pour les études considérant une diminution de pH inférieure ou égale à 0,4 unités. D'après Gazeau *et al.* (2013)

Dans les zones côtières où les conditions environnementales ne sont pas optimales (salinité fluctuante, hypoxie, limitation en nourriture ...), l'AO peut être un facteur additionnel poussant les organismes et écosystèmes en dehors de leurs tolérances physiologiques (Pörtner 2012). Les études sur les impacts conjugués de l'augmentation de la température et de la $p\text{CO}_2$ sur les mollusques ont mené à des observations contradictoires, les effets de l'AO pouvant être diminués (Brennand *et al.* 2010; Waldbusser *et al.* 2011) ou, comme dans la majorité des cas, exacerbés (Lannig *et al.* 2010; Schalkhauser *et al.* 2012; Watson *et al.* 2012a) par la température. Alors que seulement 26 % des études sur les bivalves et gastéropodes traitent à la fois de l'augmentation de pH et de température, il est important dans un contexte de changement climatique global d'étudier l'interaction de ces deux facteurs pour éviter de sous-estimer leurs effets futurs sur les mollusques benthiques.

2. Réponse métabolique de la crépidule à un stress thermique dans différentes conditions de $p\text{CO}_2$

2.1 Contexte général

L'importance des impacts écologiques engendrés par l'arrivée de la crépidule sur les côtes européennes en fait une espèce clé dans les écosystèmes côtiers qu'elle a massivement colonisés. Il est apparu important d'étudier les réponses métaboliques de cette espèce dans un contexte de changement climatique et en particulier d'acidification des océans afin de mieux comprendre quels sont ses "points sensibles" et ses futurs impacts sur les communautés.

Dans un contexte de changement global, il est nécessaire de prendre en compte l'interaction de différents facteurs afin de ne pas sous-estimer leurs effets simples et conjugués sur la physiologie des organismes. La température étant un facteur abiotique majeur contrôlant les processus métaboliques et biochimiques des êtres vivants, les effets de l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ et de la température ont été testés sur des individus adultes de l'espèce *C. fornicata* provenant de la population naturelle du site de la Barre des Flots en baie de Morlaix (Figure II2-2).

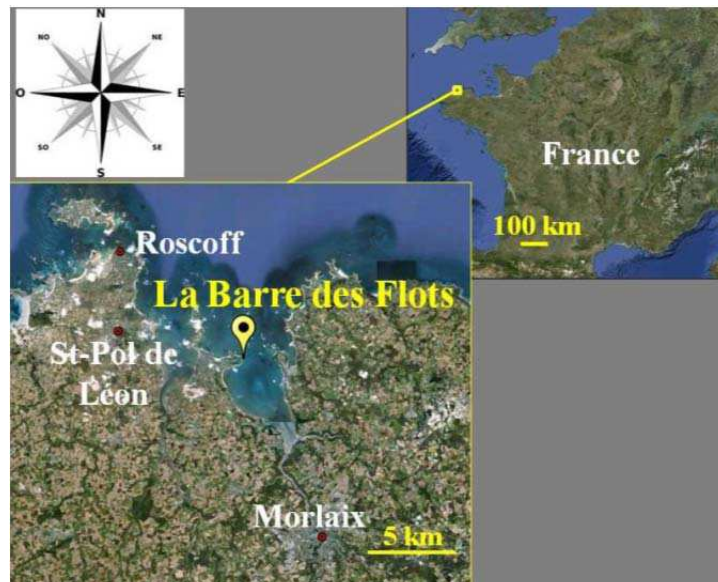


Figure II2-2: Site de prélèvement de crépidules de la baie de Morlaix

La première expérience, réalisée par Sophie Martin et Joëlle Richard entre janvier et juin 2010 a permis de mesurer les différences de résistance à un stress thermique de crépidules conditionnées plusieurs mois à différents niveaux de $p\text{CO}_2$. Les résultats obtenus au cours de cette première expérience font l'objet du premier article de ce chapitre (Article n°3). Une expérience de 6 mois (janvier-juin 2012) a ensuite permis de mesurer différentes réponses métaboliques (respiration, excrétion, calcification, filtration) de petites (supposées mâles) et grandes (supposées femelles) crépidules dans différentes conditions de $p\text{CO}_2$ et de température. Le deuxième article du chapitre (Article n°4) relate les résultats obtenus au cours de cette seconde expérimentation.

2.2 Résumé de l'article n°3 :

L'objectif de cette expérience était de tester les capacités de résistance à un fort stress thermique de crépidules adultes acclimatées depuis plusieurs mois à différentes conditions de $p\text{CO}_2$ prévues pour la fin du siècle. Faire subir des stress brutaux à des organismes n'est pas représentatif des conditions futures auxquelles ils seront soumis dans un contexte de changement global mais permet d'obtenir des réponses physiologiques intéressantes reflétant les capacités de résistance au stress des organismes.

Les crépidules, élevées depuis 3 mois à des $p\text{CO}_2$ de 380, 550, 750 et 1000 μatm ont subi une augmentation rapide de température à une vitesse de $1^\circ\text{C } 12 \text{ h}^{-1}$ entre 18 et 36°C , température létale atteinte au cours de l'expérience. La respiration des mâles et des femelles a été estimée par des mesures de la consommation en oxygène à 18, 22, 26, 30 et 34°C . A partir de ces données, des relations entre les taux de respiration et la température ont été construites pour les mâles et femelles séparément, dans chaque condition de $p\text{CO}_2$ et des Q_{10} ont été calculés dans chaque traitement. L'état de santé des spécimens a aussi été estimé à partir d'indices de condition calculés au début et à la fin de l'expérience dans les différents traitements et par comptage des individus morts.

Bien que la respiration ait augmenté significativement avec la température, aucun effet de la $p\text{CO}_2$ n'a pu être détecté ni sur la consommation en oxygène, ni sur les valeurs de Q_{10} , ni sur les indices de condition calculés à la fin de l'expérience, ni sur les taux de mortalité. La crépidule, déjà connue pour être une espèce eurytherme et euryhaline semble donc être une espèce très résistante à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$, qualité qui pourrait lui donner un avantage sur les espèces natives avec qui elle est en compétition.

Article n° 3

Metabolic responses to temperature stress under elevated $p\text{CO}_2$ in the slipper limpet *Crepidula fornicata*

Fanny Noisette^{1,2}, Joëlle Richard^{3,4}, Ines le Fur^{1,2}, Lloyd Peck⁴,
Dominique Davoult^{1,2}, Sophie Martin^{1,2}

¹CNRS, UMR 7144

Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29688 Roscoff Cedex, France

²UPMC Univ. Paris 6, UMR 7144

Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29688 Roscoff Cedex, France

³ Université de Bretagne Occidentale, Institut Universitaire Européen de la Mer,
Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (UMR CNRS 6539),
Technopôle Brest-Iroise, Place Copernic, F-29280 Plouzané, France.

⁴ Natural Environment Research Council British Antarctic Survey,
High Cross, Madingley Road, Cambridge CB3 0ET, United Kingdom

En révision pour

Journal of Experimental Marine Biology and Ecology

Abstract

In the current context of environmental change ocean acidification is predicted to affect the cellular processes, physiology and behavior of all marine organisms, impacting survival, growth and reproduction. In relation to thermal tolerance limits, the effects of elevated $p\text{CO}_2$ could be expected to be more pronounced at the upper limits of the thermal tolerance window. Estuarine and intertidal species experience high variations in both temperature and $p\text{CO}_2/\text{pH}$ because of the large fluctuations of the abiotic parameters in their habitat. Our study focused on *Crepidula fornicata*, an invasive gastropod which colonized shallow waters around European coasts during the XXth century. We investigated the effects of 10 weeks exposure to current (380 μatm) and elevated (550, 750, 1000 μatm) $p\text{CO}_2$ on this species and how this impacted their response to an acute increase in temperature (1°C per 12 h). Respiration rates were measured on both

small (male) and large (female) individuals. Mortality increased suddenly from 34°C, particularly in females. Metabolic rate in *C. fornicata* increased linearly with temperature between 18°C and 33°C. Hypercapnia had little or no impact on the effect of temperature on respiration as there were no differences between $p\text{CO}_2$ treatments either in the slopes of regressions between respiration rate and temperature or in Q_{10} values. In the same way, condition indices were similar in all the $p\text{CO}_2$ treatments. This species was highly resistant to hypercapnia whatever the temperature. Having evolved to live in strongly fluctuating habitats, *C. fornicata* appears to have either a strong phenotypic plasticity or well developed resistance mechanisms to survive acute changes in temperature and pH. This suggests that this invasive species may be more resistant to future environmental changes compared to its native competitors.

Keywords: hypercapnia, invasive species, Q_{10} , respiration, temperate waters, warming

Acknowledgments

The authors thank the Marine Operations and Services Department from the Station Biologique de Roscoff for the sampling and the help for system building. This work was supported by the CALCAO project, which received funding from the Region Bretagne and Interreg Marinexus. It also contributes to the “European Project on Ocean Acidification” (EPOCA) which received funding from the European Community’s Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n_ 211384

Introduction

Changes in climate caused by increasing anthropogenic CO₂ emissions since the beginning of the industrial revolution have resulted in both warming and acidification in the oceans (Solomon *et al.* 2007). Sea surface temperatures have been predicted to increase by 2 to 5°C by the year 2100 (Solomon *et al.* 2007). At the same time, increased *p*CO₂ (ocean acidification) is predicted to reduce the pH of surface waters by 0.3 - 0.4 units by the end of the century (Caldeira & Wickett 2003; Orr *et al.* 2005). Such decreases will produce changes in carbon and carbonate seawater chemistry through decreased carbonate ion concentrations (CO₃²⁻) and a lower calcium carbonate saturation state (Ω). These changes are predicted to have major consequences for marine life (Fabry *et al.* 2008; Kroeker *et al.* 2013a) and, in a global warming context, could have broad impacts on physiological functions of heterotrophic marine organisms (Pörtner 2008; Hofmann & Todgham 2010).

The decrease in pH is likely to have a wide range of effects on marine invertebrates via shifts in acid-base homeostasis, changes in metabolism and energy balance (Pörtner *et al.* 2005) leading to effects on somatic growth (Berge *et al.* 2006; Thomsen & Melzner 2010), respiration (Melatunan *et al.* 2011; Schalkhauser *et al.* 2012), excretion (Liu & He 2012), calcification (Gazeau *et al.* 2007; Wood *et al.* 2008; Watson *et al.* 2012b) or feeding rates (Bamber 1990; Navarro *et al.* 2013). Many marine invertebrates exposed to elevated *p*CO₂ have exhibited metabolic depression (Willson & Burnett 2000; Michaelidis *et al.* 2005; Navarro *et al.* 2013) as a decrease in respiration rate while others have remained unaffected (Gutowska *et al.* 2008; Lannig *et al.* 2010; Clark *et al.* 2013), or even increased their metabolic rate (Wood *et al.* 2008; Beniash *et al.* 2010). These responses are highly species-specific and may vary with organism size (Beniash *et al.* 2010). The resilience of the species studied, and the capacity to regulate metabolism under stressful conditions are also important (Pörtner 2008). These physiological impacts are likely to have broad effects on the survival, growth and reproduction of the marine species (Shirayama & Thornton 2005; Byrne 2011), which would lead to changes in community structure from altered diversity and abundances (Hale *et al.* 2011).

Temperature is a primary driver for physiological, life history, and ecological functions of ectotherms (Hofmann & Todgham 2010). Many organism's capacities and ecological interactions also depend on temperature (Peck *et al.* 2004). Increasing temperature affects the rate of all biochemical reactions, and hence cellular processes and physiological

functions (Clarke 1983; Pörtner 2012). In the context of environmental change, elevated temperature may impact organisms by increasing metabolic costs within a limited thermal tolerance window (Peck *et al.* 2002; Marshall *et al.* 2003). Survival beyond tolerance limits depends on the duration and extent of the temperature excursion (Peck 2005), and exposure to high temperature can cause rapid deterioration of cellular processes and performances that cannot be sustained long term (Pörtner 2012). Experimental short-term approaches have been developed to estimate thermal limit capacities in marine invertebrates (Sokolova & Pörtner 2003; Peck *et al.* 2004; Pörtner *et al.* 2006), and the rate of warming has been shown to markedly affect thermal limits (Peck *et al.* 2009). Such experiments usually use faster temperature elevations than natural changes but provide valuable insight into physiological responses of marine organisms and their thermal tolerances (Peck *et al.* 2009; Richard *et al.* 2012; Peck *et al.* 2013b).

In changing marine environments the interactive effects of increased temperature and elevated CO₂ concentrations (hypercapnia) are likely to impair physiological processes (Clarke 2003; Pörtner 2008) by narrowing the thermal tolerance window of the organisms (Metzger *et al.* 2007; Lannig *et al.* 2010) and elevating vulnerability to extreme temperature (Schalkhauser *et al.* 2012). Respiration responses during rapid temperature increase under different pCO₂ conditions could therefore be used to investigate resistance to hypercapnia stress.

Identifying the effects of large physico-chemical fluctuations in the habitat is valuable as it has been reported that the interval between high temperature events will likely be an important determinant of species' resilience in the face of global change and particularly ocean acidification (Hofmann & Todgham 2010).

Estuarine and intertidal species from coastal habitats are generally more tolerant to physico-chemical fluctuations (e.g. temperature, salinity, turbidity) than open ocean species (Bamber 1990; Burnett 1997; Stillman 2003). In many of these coastal fluctuating habitats, native and introduced species co-exist and compete for the same resources (space, food etc). Under stressful conditions, non-native species have been shown to be more resistant and to have less metabolic disturbance than taxonomically related native species in the habitat where they were introduced (Lenz *et al.* 2011). Thus, our study focused on the response of an invasive Calyptraeidae gastropod living on western European coasts, but which originates from North East America. *Crepidula fornicata* (the slipper limpet) was introduced in Europe at the end of the 19th century, mainly with oysters (*Crassostrea gigas*) which were imported for farming (Blanchard 1995) and has subsequently colonized European coasts from Southern

of Sweden to Southern France. *C. fornicata* has had significant impacts on biodiversity and ecosystem functioning where it has established (De Montaudouin *et al.* 1999; Decottignies *et al.* 2007a; Martin *et al.* 2007c). It lives in shallow sites, especially in bays and estuaries where very high densities of over one thousand individuals m⁻² have been reported (Blanchard 1995). A few populations have even been observed in intertidal locations, underlining the acclimation and adaptive capacity of this species (Bohn *et al.* 2012; Diederich & Pechenik 2013). Indeed, *C. fornicata* is known to be strongly resistant to environmental stress, particularly temperature and salinity (Blanchard 1995; Blanchard 1997), which both vary widely in their habitat. There is, to our knowledge, only one publication to date investigating the thermal stress effects on metabolism in *C. fornicata* (Newell & Kofoed 1977b) and the interaction between acute temperature elevation and altered *p*CO₂ has never been explored in this species.

Following the hypothesis that CO₂ stress (hypercapnia) will increase sensitivity to temperature change and narrow the thermal tolerance windows of marine ectotherms, we evaluated the metabolic response of *C. fornicata* individuals previously reared under elevated *p*CO₂ for 10 weeks during a rapid temperature increase. Respiration rates were measured as a proxy for metabolism on small (male) and large (female) individuals. As the species lives in stacks and change sex with age and size (Coe 1936; Collin 1995) the effects of sex and size were confounded. To our knowledge this is the first investigation of combined temperature and altered pH effects in a species that changes sex with age.

Material and methods

Biological material

Crepidula fornicata stacks (Linné 1758) were collected by SCUBA divers on February, 4th 2010, in Morlaix Bay (northwest Brittany, France), at the “Barre des Flots” site (3°53.015'W; 48°40.015'N) at an *in situ* temperature of 11.6°C (*Service d’Observation de la Mer et du Littoral* data). They were transferred directly to aquaria at the Station Biologique de Roscoff where they were kept in natural unfiltered seawater at a temperature around 10°C, until they were used in experiments starting on March, 10th.

Males at the top of the stack and females at the bottom were selected, separated and individually labelled. Small males (23.31 ± 0.16 mm length), which were still slightly mobile,

were placed individually on 3 cm Petri dishes one month before the beginning of the trials. Dead individual shells at the base of stacks were kept as the substratum under the largest living immobile females (47.53 ± 0.25 mm length). All individuals were gently brushed to remove epibionts and biofilm before proceeding to the metabolic measurements.

Shell weight and length and tissue dry weight (DW) were determined separately on each individual after drying at 60°C for 48h at the beginning of the experiment (March) on a pool of individuals and at the end of trials (May, 29th) on the remaining individuals. Specimens were ignited in a muffle furnace at 520°C for 6 h, with tissue ash-free dry weight (AFDW) being obtained by difference. Condition indices (CI) were calculated on a pool of 20 specimens in March and on all remaining living and recently dead individuals (n males = 74; n females = 99) at the end of the increase in temperature on the May, 29th, as:

$$\text{CI} = (\text{Tissue AFDW} / \text{Shell DW}) \times 100.$$

Mortality was checked during the experiment. Individuals with no reaction when the foot was stimulated were classed as dead and removed from the tanks.

Experimental conditions & set-up

After distributing randomly in each of twelve 10-L aquaria composing the experimental set up, 120 males and 120 females (i.e. 10 individuals of each sex per aquaria) were held in different $p\text{CO}_2$ conditions between March, 13th and May, 28th 2010. At the beginning of the experiment, pH was gradually decreased over four days at 0.1 pH units day⁻¹ from 8.1 until the required pH was reached. Specimens were subsequently held for ten weeks in four different $p\text{CO}_2$ conditions: a current $p\text{CO}_2$ of 380 μatm ($\text{pH}_T = 8.07$), and three elevated $p\text{CO}_2$ levels of 550 μatm ($\text{pH}_T = 7.94$), 750 μatm ($\text{pH}_T = 7.82$) and 1000 μatm ($\text{pH}_T = 7.77$). The elevated $p\text{CO}_2$ values corresponded to different scenarios predicted by the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) for the end of the century (Solomon *et al.* 2007) and were selected according to the recommendations of Barry *et al.* (2010). $p\text{CO}_2$ was adjusted by bubbling CO_2 -free air (current $p\text{CO}_2$) or pure CO_2 (elevated $p\text{CO}_2$) in four 100 L header tanks supplied with unfiltered seawater pumped from the sea directly in front of the Station Biologique de Roscoff. Seawater was delivered by gravity from each tank to aquaria (in triplicate) at a rate of 9 L h⁻¹. $p\text{CO}_2$ was monitored and controlled by a feedback system (IKS Aquastar, Karlsbad, Germany) that regulated the addition of gas in the header tanks. pH values of the pH-stat system were adjusted from daily measurements of pH on the total scale

(pH_T) in the aquaria using a pH meter (HQ40D, Hach Lange, Ltd portable LDO™, Loveland, Colorado, USA) calibrated using Tris/HCl and 2-aminopyridine/HCl buffers (Dickson et al., 2007). The twelve aquaria were placed in four thermostatic baths where temperature was controlled to ± 0.2 °C using 100 - 150 W submersible heaters.

Before the rapid temperature increase experiment, *C. fornicata* were grown in the different pCO_2 treatments for 10 weeks (March, 10th to May, 18th 2010) while temperature was raised successively to mimic the natural rate of temperature change from winter to summer. Temperature was maintained at 10°C from the beginning of the trial to March, 29th. It was 13°C from April, 5th to 19th and 16°C from April, 26th to May, 18th. To reach these set levels the temperature was increased in the period between by 0.5°C/day until the new set temperature was achieved. Mortality observed during this 2 months period was low, 14 females (9, 3 and 2 at 10, 13 and 16°C, respectively) and 13 males (6, 3 and 4 at 10, 13 and 16°C, respectively) in total. There were no differences between pCO_2 treatments (7, 6, 9 and 5 specimens at pCO_2 of 380, 550, 750 and 1000 μatm , respectively).

Rapid temperature increase experiments were conducted between the 18th and 28th May 2010. In all four pCO_2 treatments, temperature was increased from 16 to 36°C at 1°C/12h. *C. fornicata* oxygen consumption was measured (see below) both in small and large individuals in the different pCO_2 treatments during this rapid temperature increase.

Seawater parameters

Seawater parameters were monitored throughout the experiment. pH_T and temperature were recorded daily in each of the 12 aquaria using a pH meter (HQ40D, Hach Lange, Ltd portable LDO™, Loveland, Colorado, USA). Total alkalinity was determined every 3 weeks by HCl 0.01N potentiometric titration on an automatic titrator (Titroline alpha, Schott SI Analytics, Mainz, Germany). Seawater carbonate chemistry of seawater, *i.e.* dissolved inorganic carbon (DIC), exact CO_2 partial pressure (pCO_2) and saturation state of aragonite (Ω_{Ar}) were calculated in each pCO_2 condition using CO_2SYS software (Lewis & Wallace 1998) using constants from Mehrbach *et al.* (1973) refitted by Dickson and Millero (1987). Mean values (\pm standard error, SE) of the parameters in each pCO_2 treatment are presented in Table 1.

Table 2: Mean carbonate chemistry parameters for each $p\text{CO}_2$ treatment ($\pm\text{SE}$). pH (on the total scale, pH_T) was measured daily and total alkalinity (A_T) was measured every 3 weeks. Other parameters were calculated with CO2sys software. $p\text{CO}_2$: CO_2 partial pressure; Ω_{Ar} : saturation state of seawater with respect to aragonite

$p\text{CO}_2$ treatment	pH_T	$p\text{CO}_2$ (μatm)	Ω_{Ar}	A_T ($\mu\text{Eq kg}^{-1}$ SW)
	n = 69	n = 69	n = 69	n = 76
380 μatm	8.13 ± 0.01	324 ± 8	2.72 ± 0.06	2332.73 ± 1.39
550 μatm	7.89 ± 0.01	619 ± 16	1.69 ± 0.04	2334.29 ± 1.62
750 μatm	7.75 ± 0.01	873 ± 20	1.28 ± 0.03	2335.45 ± 1.93
1000 μatm	7.66 ± 0.01	1138 ± 65	1.05 ± 0.02	2334.20 ± 1.79

Oxygen consumption measurements

During the rapid temperature increase trial (18th - 29th May 2010), oxygen consumption of 6 randomly selected labeled individuals of each sex (2 per aquaria) was measured in each of the $p\text{CO}_2$ treatments every two days, at 18, 22, 26, 30 and 34°C. Respiration rates were determined using closed incubations in 75 mL (males) or 180 mL (females) acrylic chambers (Engineering & Design Plastics Ltd, Cambridge, UK) filled with water from the same aquarium. Chambers were placed in their respective aquaria during incubations to keep the temperature constant. Incubations varied between 3 h and 1 h depending on temperature. Trials were halted before oxygen saturation fell below 80% saturation. Control incubations without animals (n = 1 control incubation / aquarium / measurement) were carried out to allow correction for microbial activity in seawater. Respiration rates were calculated from the differences in measurements of oxygen concentration during trials and controls using a non-invasive fibre-optical system (FIBOX 3, PreSens, Regensburg, Germany). Chamber contents were mixed gently by inverting chambers several times before each oxygen measurement. Reactive oxygen spots attached to the inner wall of the chambers were calibrated with 0 % and 100 % oxygen buffers made from the manufacturer instructions. 0 % O_2 buffer was prepared by dissolving 10 g of Na_2SO_3 in 1 L of seawater and 100 % O_2 buffer was prepared by bubbling air in 1L of seawater for 3-4 hours to achieve oxygen saturation. Respiration (R) rates (in $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ AFDW h}^{-1}$) were corrected for oxygen consumption in controls and calculated as:

$$R = - (\Delta O_2 \times V) / (\Delta t \times AFDW)$$

where ΔO_2 ($\mu\text{mol O}_2 \text{L}^{-1}$) is the difference between initial and final O_2 concentrations, V (L) is the chamber volume minus the individual *C. fornicata* volume, Δt (h) is the incubation time and AFDW (g) is the tissue ash free dry weight of the slipper limpet incubated.

Statistics

All statistical analyses were performed using R 2.15.0 version (R Core Team 2013). The effect of $p\text{CO}_2$ on body mass index (CI) at the end of the experiment was investigated by 1-way analysis of variance (ANOVA). T-tests were then used to identify differences between condition indices at the beginning and at the end of the trial. Linear regressions between respiration rates and increasing temperatures were fitted in the four different $p\text{CO}_2$ treatments for males and females separately. Differences between $p\text{CO}_2$ treatments were explored using an ANCOVA with temperature as co-factor. Q_{10} coefficients were calculated by using the standard equation $Q_{10} = (R_H / R_L)^{10 / (T_H - T_L)}$ where T_L and T_H were the lowest and highest temperature reached and R_L and R_H the respiration rates in these temperature respectively. Q_{10} values were analyzed using a 2-way ANOVA with $p\text{CO}_2$ and sex (male, female) as fixed factors. Normality was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test and Levene's test was used to ensure that variances were homogenous. All the results are presented as mean \pm SE.

Results

Mortality occurred between 34 and 36°C for females and 22 and 36°C for males (Figure 1). There were no differences in mortality between the different $p\text{CO}_2$ treatments. 29, 28, 18, and 21 females and 27, 6, 8, and 5 males died at $p\text{CO}_2$ of 380, 550, 750 and 1000 μatm , respectively. At the end of the acute temperature increase nearly twice the number of females had died (82) compared with the males (46).

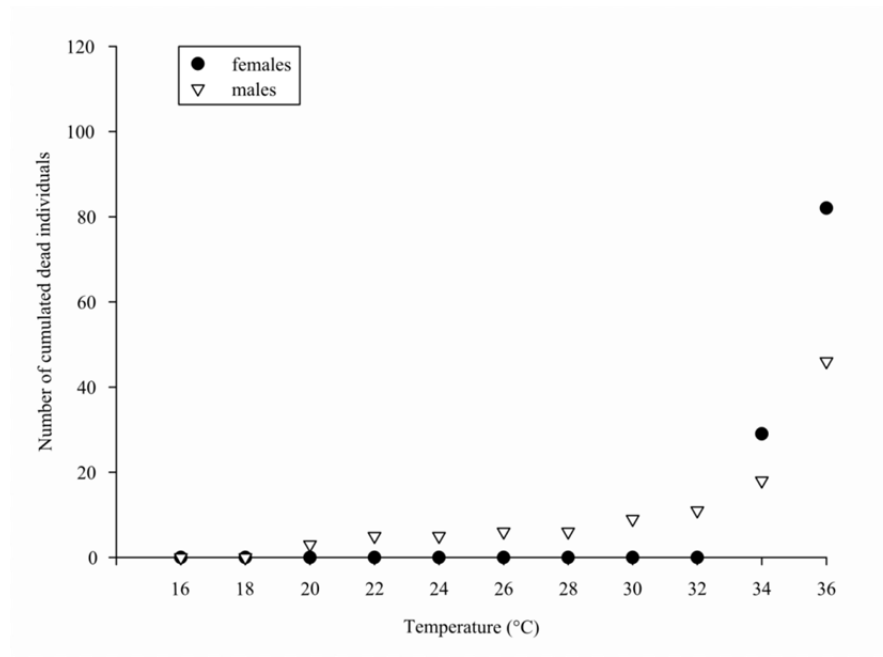


Figure 1: Cumulated mortalities in males (triangles) and females (circles) during the rise in temperature (16-36°C)

The mean condition index at the end of the experiment varied between 1.69 ± 0.13 for males at $p\text{CO}_2$ of $380 \mu\text{atm}$ and 2.41 ± 0.27 for females at $p\text{CO}_2$ of $550 \mu\text{atm}$ (Table 2). There were no $p\text{CO}_2$ (2-way ANOVA, $df = 4$, $F = 1.245$, $p = 0.295$) or sex (2-way ANOVA, $df = 1$, $F = 2.472$, $p = 0.118$) effects on the condition index. Conversely, the condition index from the beginning of the experiment (3.00 ± 0.27) was different from the condition index (2.11 ± 0.07) at the end of the trial (t-test, $df = 181$, $t = 3.159$, $p = 0.002$).

Table 3: Mean (\pm SE) for condition index values calculated for each $p\text{CO}_2$ treatment for *C. fornicata* males and females at the end of the experiment.

$p\text{CO}_2$	Males		Females	
	n	Condition index	n	Condition index
380	22	1.69 ± 0.13	21	2.15 ± 0.20
550	26	2.07 ± 0.16	20	2.41 ± 0.27
750	24	1.91 ± 0.14	20	2.23 ± 0.24
1000	27	2.35 ± 0.14	13	2.08 ± 0.22

Female respiration rates varied between $0.51 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ AFDW h}^{-1}$ at 18°C and $p\text{CO}_2$ of $750 \mu\text{atm}$ and $91.62 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ AFDW h}^{-1}$ at 32°C and $p\text{CO}_2$ of $380 \mu\text{atm}$. Males had higher rates, which ranged between $5.13 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ AFDW h}^{-1}$ at 18°C and $p\text{CO}_2$ of $380 \mu\text{atm}$ and $175.51 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ AFDW h}^{-1}$ at 32°C and $p\text{CO}_2$ of 380 (Figure 2).

Relationships between respiration rate and temperature were linear at each $p\text{CO}_2$ level (Figure 2). Respiration rose significantly with increasing temperature in all $p\text{CO}_2$ treatments, for both males and females (Table 3, p -values < 0.05). There were no significant differences between the different $p\text{CO}_2$ treatments, regardless of sex (ANCOVA, $df = 3$, $F = 0.30$, $p = 0.829$).

Table 4 : Relationships between *C. fornicata* male and female respiration rates and temperature in each $p\text{CO}_2$ treatment

	$p\text{CO}_2$	Regression equation	n	R	R ²	F	p
males	380	$y = 3.691 x - 34.455$	42	0.60	0.37	22.97	< 0.001
	550	$y = 2.993 x - 18.461$	42	0.46	0.21	10.56	0.002
	750	$y = 2.406 x - 4.543$	41	0.40	0.16	7.55	0.009
	1000	$y = 3.701 x - 41.556$	41	0.56	0.31	17.37	< 0.001
females	380	$y = 1.826 x - 7.635$	42	0.49	0.24	12.72	< 0.001
	550	$y = 1.585 x - 4.218$	42	0.55	0.30	16.89	< 0.001
	750	$y = 2.637 x - 26.240$	42	0.63	0.40	26.66	< 0.001
	1000	$y = 1.442 x + 3.435$	42	0.37	0.14	6.26	0.017

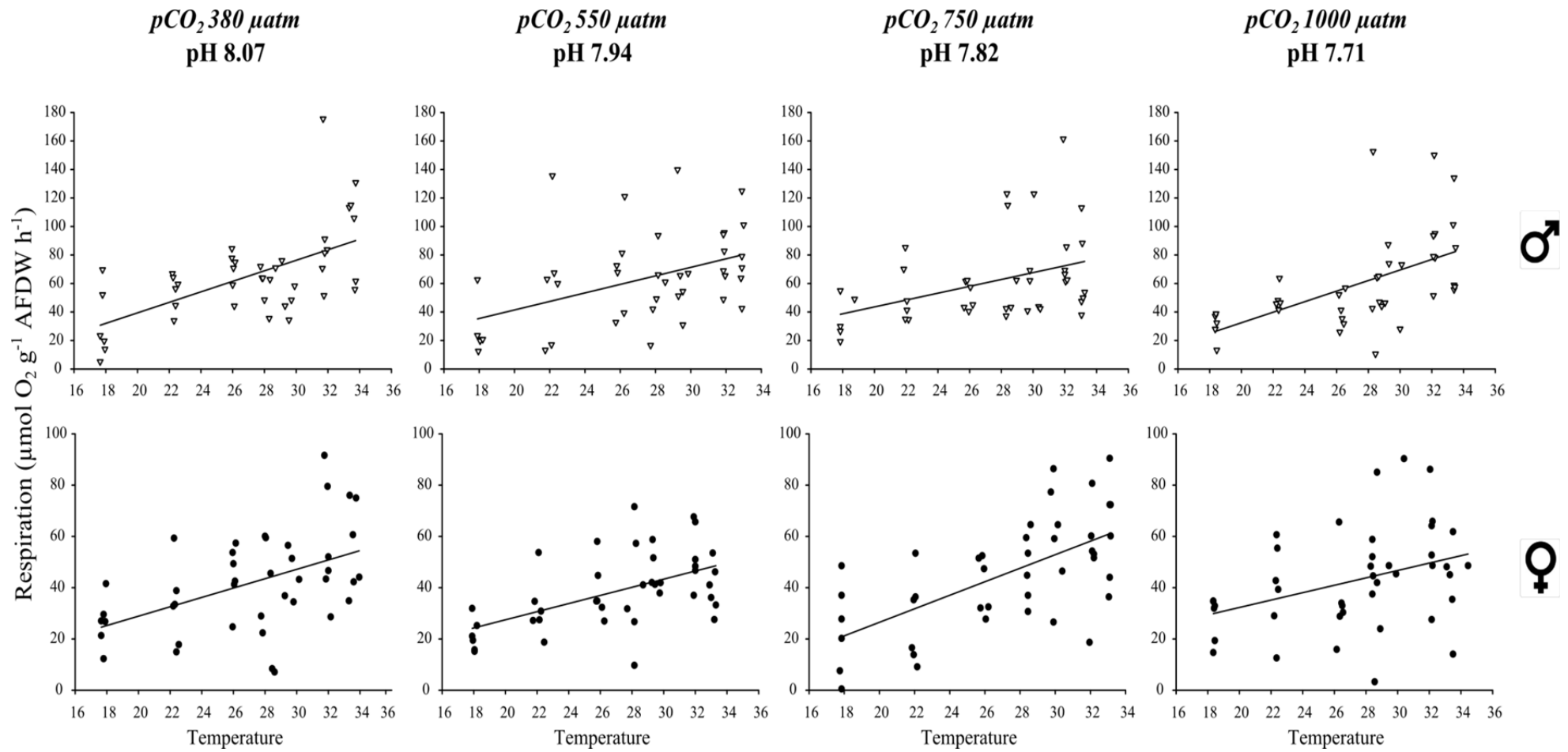


Figure 2: Respiration rates as a function of increasing temperature in each $p\text{CO}_2$ treatment, for *C. fornicata* males (top, triangles) and females (bottom, circles)

Q_{10} values ranged from 1.24 to 2.40 for females and from 1.36 to 2.77 for males among the different $p\text{CO}_2$ treatments (see means Table 4). There was no significant $p\text{CO}_2$ effect on Q_{10} values for either males or females (2-way ANOVA, $df = 3$, $F = 0.550$, $p = 0.651$). Across all $p\text{CO}_2$ treatments, females had significantly lower Q_{10} values than males with means (\pm SE) of 1.61 ± 0.11 and 2.00 ± 0.12 for females and males, respectively (2-way ANOVA, $df = 1$, $F = 5.110$, $p = 0.036$). The interaction between $p\text{CO}_2$ and sex, however, was not-significant (2-way ANOVA, $df = 3$, $F = 2.623$, $p = 0.086$).

Table 5 Mean (\pm SE) for Q_{10} values calculated for each $p\text{CO}_2$ treatment for *C. fornicata* males and females

$p\text{CO}_2$	Males	Females
380 μatm	2.21 ± 0.37	1.62 ± 0.13
550 μatm	2.15 ± 0.11	1.51 ± 0.04
750 μatm	1.69 ± 0.32	2.01 ± 0.33
1000 μatm	1.94 ± 0.06	1.30 ± 0.04

Discussion

Significant mortalities started to occur from 34°C , particularly in females. Large mortality occurred at and above 36°C . These values are consistent with the upper lethal temperature recorded for *C. fornicata* by Diederich and Pechenick (2013) in a laboratory study investigating a population from Rhode Island, USA, in which only 40% of the adults survived after a 3 h exposure to 34°C , and all died after a 36°C exposure. These temperatures are within the range of LT_{50} values recorded for temperate estuarine bivalves (Kennedy & Mihursky 1971; Incze *et al.* 1980). Under thermal stress, a few males died at temperatures below those of the females which may have had more reserves, as their condition index was higher at the start of the rapid temperature rise trials (Table 2). The difference in CI and sensitivity of some of the males to rapid temperature rise may be explained by the relation between food-supplied energy and temperature resistance (Branch *et al.* 1988). During the 3 months of the study, no additional food was supplied and the only nutrition available was the particulate organic matter present in the unfiltered seawater supply. Small individuals had higher energy requirements (respiration rate) than the larger ones per unit tissue weight and if resources were close to maintenance levels, some of the small males may not have been able

to maintain a positive energy balance. However, CI were similar in males and females remaining at the end of rapid temperature rise trials (36°C) and the mortality was higher in females (larger individuals) than in males. Thus the mechanisms setting acute temperature limits at this rate of warming may not be energy availability (Peck *et al.* 2013b). Peck *et al.* (2009) demonstrated for 14 species that smaller species survived to higher temperatures than large ones when temperature was raised at 1°C day⁻¹, and Peck *et al.* (2013a) showed that early juveniles survived to higher temperatures than large adults in rapid warming trials in Antarctic sea urchins, starfish, sea cucumbers and bivalve mollusc.

A size effect, which cannot be discriminated from sex as a factor, because *C. fornicata* change sex with age and size, was also present for oxygen consumption. Respiration rates were higher in *C. fornicata* males than in females regardless of the temperature. Mean respiration rates at 18°C and $p\text{CO}_2$ of 380 μatm were 31 and 26 $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ AFDW h}^{-1}$ for males and females, respectively. *In situ* respiration rates estimated for *C. fornicata* from the Bay of Brest, Brittany, France, ranged from 6 to 63 $\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ AFDW h}^{-1}$ (Martin *et al.* 2006b). Our values were within this range, which indicates specimens in the experiments here had similar metabolic rates to wild specimens and were in good condition. The differences in condition indices observed between the beginning and the end of the experiment could be due to insufficient levels of particulate material available in the unfiltered seawater supply, but levels were not measured.

In both *C. fornicata* males and females, respiration rates increased with temperature, as previously demonstrated for this species by Newell & Kofoed (1977b). Most ectotherm metabolic rates are correlated positively with temperature (Cossins & Bowler 1987). In temperate molluscs, respiration rate has been shown to increase with temperature in a similar fashion to that here in *Mytilus galloprovincialis* (Jansen *et al.* 2009), limpets (Branch *et al.* 1988) and *Littorina littorea* (Sokolova & Pörtner 2003). In *L. littorea*, respiration rate increased between 0 and 28°C, but then decreased significantly at the highest temperature (32°C). Peck *et al.* (2002) found a similar pattern of increase to a peak followed by a rapid decline in oxygen consumption in the Antarctic clam *Laternula elliptica*. Conversely, *C. fornicata* respiration in our study increased linearly up to 34°C without any metabolic decline in males or females. Following the “oxygen and capacity limited thermal tolerance” (OCLTT) hypothesis (Pörtner 2012), a decrease in respiration rates was expected at temperatures beyond *pejus* levels (Pörtner 2002; Pörtner & Knust 2007; Pörtner *et al.* 2007). That a decrease did not occur or could not be measured before the *C. fornicata* died is difficult to explain using the OCLTT hypothesis.

The impact of increased temperature on metabolic rates was also evaluated using Q_{10} calculations in males and females in each $p\text{CO}_2$ treatment. Even if temperature sensitivities are strongly species-specific and vary with the temperature range studied, Q_{10} values are usually in the range 1-4 (Cossins & Bowler 1987; Clarke 1991), as found here for *C. fornicata*. The Q_{10} values here were within the range of values recorded for other temperate invertebrates (Branch *et al.* 1988; Marshall *et al.* 2003). Although metabolism increased with temperature in both males and females, the Q_{10} values calculated in each $p\text{CO}_2$ treatment were lower for females than males, suggesting their metabolism may be less temperature-dependent than males (Branch *et al.* 1988).

In our study, elevated $p\text{CO}_2$ did not alter the temperature effect on respiration rate in *C. fornicata*, as Q_{10} values were similar across treatments in both males and females. Although studies investigating the response of mollusc respiration to elevated $p\text{CO}_2$ have often demonstrated metabolic depression under high $p\text{CO}_2$ in mussels, oysters and gastropods (Michaelidis *et al.* 2005; Bibby *et al.* 2007; Thomsen & Melzner 2010; Liu & He 2012; Navarro *et al.* 2013), a few others have reported no effect of $p\text{CO}_2$ on bivalve and limpet respiration (Gazeau *et al.* 2007; Marchant *et al.* 2010; Clark *et al.* 2013) as reported in our study. When $p\text{CO}_2$ and temperature were studied together here *C. fornicata* did not seem to be affected by hypercapnia in the range of $p\text{CO}_2$ tested, which has been seen previously in some studies (e.g. Gutowska *et al.* 2008; Clark *et al.* 2013). Conversely to our results, Lannig *et al.* (2010) found that a temperature rise caused a more rapid increase in metabolic rate in *Crassostrea gigas* under elevated $p\text{CO}_2$ conditions because there was a synergistic effect of temperature and $p\text{CO}_2$. The lack of change between $p\text{CO}_2$ conditions in *C. fornicata* may be related to a stronger ability to up-regulate metabolism with increasing temperature. Thus, under warming conditions sufficient energy is generated to cope with any effects from decreased pH (Wood *et al.* 2010). This phenomenon has also been demonstrated by Christensen *et al.* (2011) for *Ophionereis schayeri* who showed that pH only affected respiration at low temperature, and there was no effect of pH on respiration rate at normal or elevated temperatures. In the same way, Wood *et al.* (2010) showed that $p\text{CO}_2$ did not affect motility at elevated temperatures in brittle stars. The combined effects of temperature and elevated $p\text{CO}_2$ are complex and not well understood, but several studies have shown temperature to have a larger effect (e.g. Clark *et al.* 2013; Matoo *et al.* 2013). Furthermore the effects of hypercapnia as a single factor on metabolism are species-specific and depend on resistance capacities of the organisms (Melzner *et al.* 2009).

Responses to elevated $p\text{CO}_2$ can vary from metabolic depression and reduced shell growth (Willson & Burnett 2000) to increased physiological process rates, including calcification in some species (Bibby *et al.* 2007; Wood *et al.* 2008; Beniash *et al.* 2010; Wood *et al.* 2010). It has been widely reported that exposure to environmental hypercapnia leads to changes in homeostasis and extracellular acid-base balance counterbalanced by metabolic depression in many cases (Pörtner *et al.* 2005; Pörtner 2008). Differences in acid-base regulatory capacities by increasing HCO_3^- internal concentrations (Michaelidis *et al.* 2005; Gutowska *et al.* 2010b) or H^+ excretion (Pörtner *et al.* 2005) are taxa specific and are more or less effective in mitigating the effects of hypercapnia. It has also been suggested that organisms could maintain low metabolic rates without controlling internal pH by not using pH-sensitive oxygen-binding pigments (Thomsen *et al.* 2010; Hiebenthal *et al.* 2012). Such mechanisms are crucial factors in explaining the observed variation in sensitivities and resistances of marine invertebrates to both elevated temperature and $p\text{CO}_2$ (Gutowska *et al.* 2010b). It should, however, be noted here that many of the studies of effects of elevated $p\text{CO}_2$ on organisms are short-term and acute. This is likely to produce some confusion when identifying response mechanisms as stress or transitional effects may dominate and more long-term, acclimation scale studies are needed.

Resistance can also come from acclimation or adaptation to fluctuations in the environment where species live (Burnett 1997). Species living in environments with large abiotic variation have a high phenotypic plasticity which can allow them to survive in stressful conditions (Hofmann & Todgham 2010). Estuarine and coastal organisms inhabit environments characterized by not only seasonal and extreme temperature events but also periodic large fluctuations in seawater pH, driven by biological process that sequester and release large amounts of CO_2 (Beniash *et al.* 2010). This exposure to strong variation has likely lead to the evolution of resistance mechanisms to elevated $p\text{CO}_2$ and decreased pH (Lannig *et al.* 2010).

As a coastal (sometimes intertidal) species adapted to high fluctuations of abiotic parameters, *C. fornicata* in this study were strongly resistant to both elevated $p\text{CO}_2$ and temperature as also demonstrated by the maintenance of similar condition indices across the different $p\text{CO}_2$ treatments. Indeed, acclimation capacities of temperate marine species are strong, resulting in wide shifts in thermal window and extensive passive tolerance ranges (Pörtner 2012). In this context $p\text{CO}_2$ is considered to be an additional stressor which can constrain aerobic performance and fitness leading to a narrowing of the thermal window (Pörtner 2012). However, *C. fornicata* here had a very high lethal temperature (UTL) and

respiration rates close to that UTL did not decrease, as would be predicted by the OCLTT model (Pörtner 2010), and there was little or no *pejus* range. Temperature and $p\text{CO}_2$ are two major stressors of coastal habitats, and the low sensitivity to them observed here for *C. fornicata* probably confers a competitive advantage to this invasive species over taxonomically or functionally related species (Lenz *et al.* 2011).

We have to bear in mind that in a context of global change, warming and increasing $p\text{CO}_2$ are occurring and will continue during the coming decades. Our study is based on faster warming than predicted for natural environments. When conditions change rapidly, resistance mechanisms are important (Somero 2010; Peck 2011). In such rapid temperature increases, the use of resistance mechanisms such as heat shock proteins or anti-oxidative responses can extend the time period of survival (Pörtner 2010), but this is time limited because of metabolic waste accumulation (Peck *et al.* 2009; Peck *et al.* 2013b) or metabolic depression (Pörtner 2012). At slow rates of warming (monthly to annual), it has been shown that acclimation and adaptation effects become important and the lethal temperature is generally reduced compared to faster temperature elevations (Peck *et al.* 2009; Somero 2010). At the same time, negative effects of elevated $p\text{CO}_2$ may produce an energetic cost that is difficult to maintain over longer time periods which could impact all physiological processes (Catarino *et al.* 2012). For example, Bibby *et al.* (2008) demonstrated that exposure to hypercapnic conditions may compromise the ability to express an immune response in mussels. They showed that *Mytilus edulis* phagocytosis declined as function of decreased pH. In the same way, Matozzo *et al.* (2012) showed that elevated $p\text{CO}_2$ and temperature may strongly affect haemocyte functionality in the bivalves *Chamelea gallina* and *Mytilus galloprovincialis*. Other cellular processes have also been shown to be negatively impacted by hypercapnia, including protein synthesis in the sipunculid *Sipunculus nudus* (Langenbuch *et al.* 2006) or enzyme activities in *C. gallina* and *M. galloprovincialis* (Matozzo *et al.* 2013). When external conditions move away from optimal, an increase in metabolic rate may be expected as the organisms need more energy to fuel the extra processes entrained to resist the stresses involved and to maintain organism stability. This may result in changes in overall physiological condition (Cummings *et al.* 2011) and impact ecological processes and community interactions. Such cascades of effects are factors dictating “winners” and “losers” that could lead to a restructuring of benthic communities. This restructuring could possibly be in favor of invasive species that a growing body of evidence shows they are more resistant to change than their native competitors.

3. Réponses physiologiques de crépidules adultes à différentes conditions croisées d'augmentation de la $p\text{CO}_2$ et de la température

3.1 Contexte général

La première expérience sur les crépidules adultes a permis de mettre en évidence leur fort potentiel de résistance à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$. Néanmoins, seuls les taux de respiration ont été mesurés pour avoir une estimation de la réponse du métabolisme basal de cette espèce durant un stress thermique. Il a de plus été démontré dans de nombreuses études que certains procédés métaboliques comme la calcification pouvaient être affectés par l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ sans qu'aucun effet ne soit détectable sur le taux de respiration.

Il a paru intéressant de poursuivre l'étude du métabolisme de la crépidule en étudiant conjointement différents taux métaboliques sur des crépidules de petite et grande taille, soumises à des $p\text{CO}_2$ élevées dans différentes conditions de température. Même si la mesure de ces différents taux n'a pas permis de faire un bilan énergétique des organismes, ils permettent cependant de mieux comprendre le fonctionnement global de cette espèce.

3.2 Résumé de l'article n°4:

Des crépidules adultes, mâles (petites) et femelles (grandes) individualisées sur leur coquille support ainsi que des chaînes complètes (Figure II2-3), ont été maintenues dans 3 conditions de $p\text{CO}_2$ différentes : 390 μatm , témoin correspondant à la pression atmosphérique actuelle ; 750 μatm , scénario le plus probable pour la fin du siècle et 1400 μatm , valeur prédite à l'horizon 2300 mais qui pourrait être atteinte en zone côtière d'ici 2100.

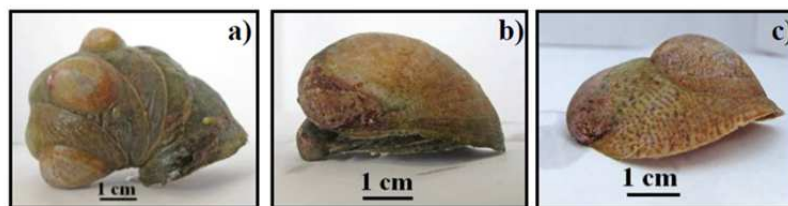


Figure II2-3: Chaines et organismes individualisés. a) Chaines de crépidules. b) Grand individu (femelle) sur son support. c) Petit individu (mâle) sur sa coquille support.

La température initialement maintenue à 10°C (température hivernale) a ensuite été successivement augmentée pour atteindre 13 puis 16 °C afin de reproduire les moyennes printanières/automnale et estivales du cycle de saisonnier de la crépidule en baie de Morlaix. Un dernier palier de température à 19°C a ensuite été effectué pour simuler une température prédite pour la fin du siècle (moyenne estivale + 3°C). Entre chaque palier, la température était progressivement augmentée à la vitesse de 0,2°C jour⁻¹. Chaque palier était composé d'une phase d'acclimatation de 2-3 semaines suivie d'une période de 2 semaines durant laquelle étaient effectuées les mesures métaboliques. En parallèle du système principal (voir figure II2-4), un bac témoin composé de 3 aquariums a été maintenu à 10°C sans régulation pH tout au long de l'expérience afin d'observer si le conditionnement en mésocosme avait en lui-même un effet sur le métabolisme des crépidules, induisant un potentiel biais dans les mesures métaboliques.

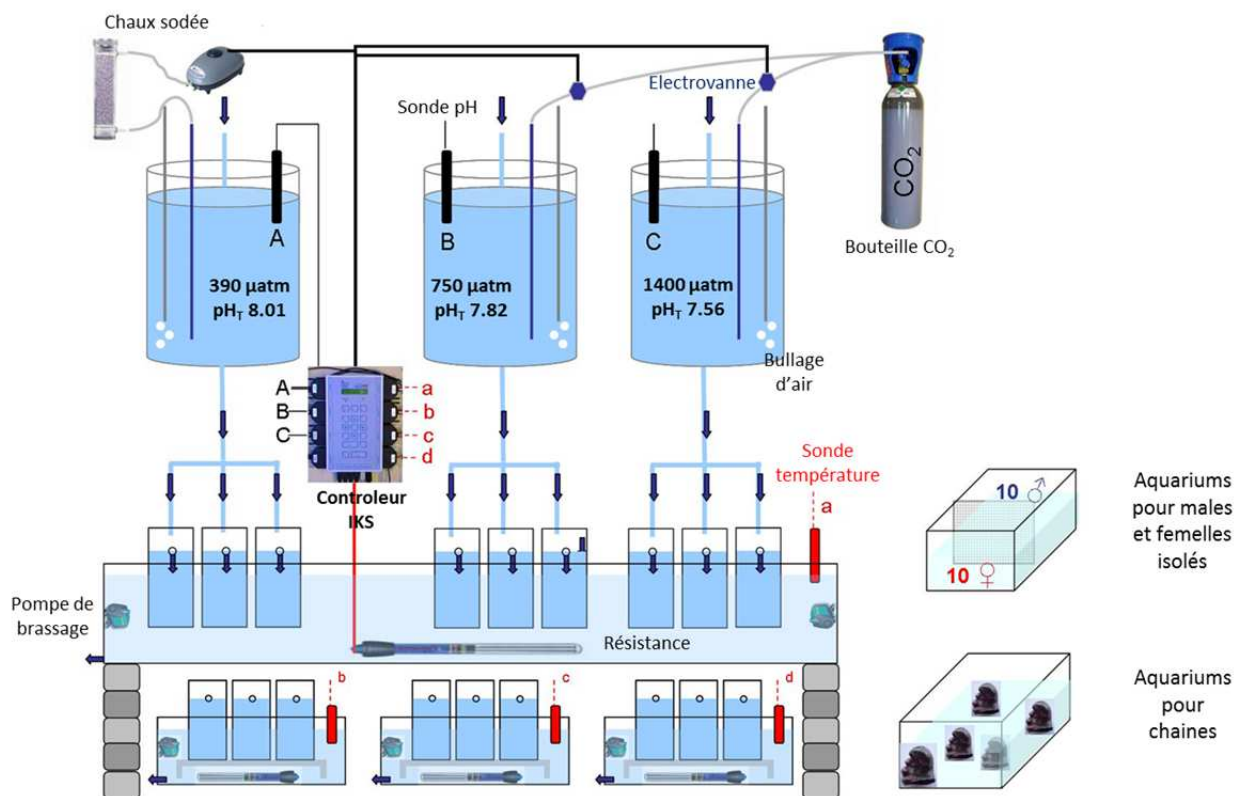


Figure II2-4: Système expérimental utilisé dans l'étude du métabolisme de la crépidule adulte dans des conditions croisées de pH et température. Le pH était régulé directement dans des grands bacs de 100 L par ajout de CO₂ pur ou d'air appauvri en CO₂ par passage sur chaux sodée. La température était maintenue par chauffage de bains-marie. Les résistances et électrovannes étaient contrôlées par un contrôleur autonome IKS.

La température est le facteur majeur régulant les taux de respiration, d'excrétion et de filtration des petites comme des grandes crépidules. Aucun effet de la $p\text{CO}_2$ n'a été mis en évidence sur les processus métaboliques, soulignant d'autant plus la résistance de la crépidule à des $p\text{CO}_2$ élevées. En revanche, la calcification nette, similaire dans les conditions 390 et 750 μatm , a diminué à 1400 μatm . Grâce aux mesures de flux bruts et à celles effectuées sur les coquilles vides, il a été mis en évidence que cette diminution de calcification nette serait principalement due à la dissolution de la coquille dans des conditions d'eau de mer sous saturées en CaCO_3 et non une diminution drastique du taux de calcification brut de l'organisme.

L'absence d'effet $p\text{CO}_2$ sur différents taux métaboliques ainsi que la calcification brute positive de la crépidule même dans des conditions sous saturées en CaCO_3 soulignent ses fortes capacités de résistance à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$. Espèce des milieux intertidaux et estuariens où les fluctuations des paramètres abiotiques sont importantes, la crépidule possède certainement une forte plasticité phénotypique ainsi que des adaptations lui permettant de compenser les stress induits par son environnement. Ses capacités de tolérance pourraient être un avantage évolutif face aux espèces natives de son aire d'introduction, lui conférant une plus grande compétitivité.

En plus des potentiels changements de communauté induits par l'hyper-compétitivité de la crépidule, l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ et de la température pourrait induire des modifications des flux biogéochimiques au niveau de l'écosystème, générés par les populations de crépidule. A l'horizon 2100, la calcification des populations de crépidules de la rade de Brest pourrait diminuer de 60 % en parallèle d'une diminution des flux de CO_2 de 12 %. En 2300, en revanche, sous l'effet conjugué de l'augmentation de température et de $p\text{CO}_2$, la production de CaCO_3 pourrait être négative, attestant de flux nets de dissolution sur les populations de crépidules. L'augmentation des taux d'excrétion pourrait augmenter la concentration en nutriments, profitant ainsi à la croissance phytoplanctonique de la rade. A l'horizon 2300, la diminution des flux de carbone et carbonates dans un contexte d'AO amènerait les populations de crépidules à devenir puits de CO_2 alors qu'elles en étaient auparavant une source.

Article n° 4

From physiological processes to population extrapolations: the responses of *Crepidula fornicata* to elevated $p\text{CO}_2$ at different temperature levels

Fanny Noisette, François Bordeyne, Dominique Davoult, Sophie Martin

CNRS, UMR 7144

Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29688 Roscoff Cedex, France

UPMC Univ. Paris 6, UMR 7144

Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29688 Roscoff Cedex, France

En préparation

Abstract

Organisms inhabiting estuarine and coastal waters naturally experience high fluctuations of various abiotic parameters. They are often considered to be highly tolerant to pH and temperature changes and making them more resistant to ocean acidification. This study focused on *Crepidula fornicata*, an invasive gastropod which colonized bay and estuaries on the Northwestern European coasts in the 20th century. Small and large individuals of *C. fornicata* were grown for 6 months in 3 different $p\text{CO}_2$ conditions (390, 750 and 1400 μatm) at 4 successive temperature levels (10, 13, 16 and 19°C). In each crossed conditions of $p\text{CO}_2$ and temperature, physiological responses of respiration, ammonia excretion, filtration and calcification processes were assessed on living individuals and empty shells. Temperature mainly influenced the metabolic (respiration and excretion) and filtration rates in a positive way while

$p\text{CO}_2$ had no effects on both small and large individuals. Conversely, calcification rates were mainly impacted by increasing $p\text{CO}_2$ leading to net dissolution in the most drastic $p\text{CO}_2$ condition. We showed that external shell dissolution overreached new shell material deposition even if *C. fornicata* were able to calcify in unsaturated seawater conditions. The lack of $p\text{CO}_2$ effects on metabolic and filtration rates and the ability of *C. fornicata* to precipitate CaCO_3 highlighted the tolerance of this species to ocean acidification. Extrapolations at a population level led to reductions of carbon and carbonates production coupled with the enhancement of nitrogen release at 1400 μatm $p\text{CO}_2$ in communities dominated by *C. fornicata*. These changes are likely to deeply affect energy and matter fluxes, impacting the whole ecosystem functioning in bay and estuaries where *C. fornicata* is a dominant species.

Keywords: ocean acidification, temperature, calcification, clearance rate, metabolism, mollusc, coastal system, invasive species

Acknowledgments

The authors thank the “Marine Operations and Services Department” from the *Station Biologique de Roscoff* for the diving sampling. We also thank the “Multicellular Marine Models” team and especially Ronan Garnier for microalgae provision and their help for building the rearing system. In addition we are grateful to the SOMLIT (Service d’Observation en Milieu LITtoral, INSU-CNRS) program for the temperature and nutrient datasets provided to calculate seawater carbon parameters. We are also grateful to Roseline Edern for helped us with cytometry flux analyses. This work was supported by the CALCAO project, which received funding from the Region Bretagne, and contributed to the “European Project on Ocean Acidification” (EPOCA) funded by the European Community’s Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 211384. It was also supported by the Interreg IV a France (Channel) – England Marinexus project n°4073 funded by the FEDER programme.

Introduction

In a current context of global change, ocean warming and ocean acidification are two main phenomena impacting marine life. Due to the increase in atmospheric CO₂ partial pressure ($p\text{CO}_2$), sea surface temperatures are likely to increase by 1.0 to 3.7°C and pH in surface waters to decline by 0.06 - 0.32 units depending on the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) representative concentration pathways considered. Modifications in seawater carbonate chemistry due to ocean acidification lead to a decrease in carbonate ion concentrations (CO_3^{2-}) and a reduction in calcium carbonate saturation state (Ω) (Orr *et al.* 2005). In estuarine and coastal waters, the pH is more variable than in the open ocean due to the intense biological and biogeochemical processes (Andersson & Mackenzie 2011; Duarte *et al.* 2013). In these habitats, ocean acidification and increased temperature will shift the baselines and exacerbate natural variations in pH and temperature (Waldbusser & Salisbury 2013) and their ecosystems are predicted to be strongly impacted in the future (Harley *et al.* 2006; Hale *et al.* 2011).

Molluscs are a major taxonomic group in community structure and ecosystem functioning of estuarine and coastal waters (Gutiérrez *et al.* 2003). Most of marine molluscs taxa accumulate amount of calcium carbonate (CaCO_3) to form external protective shells (Wilbur & Yonge 1964). Changes in carbonate chemistry induced by ocean acidification through a reduction in Ω which regulates the thermodynamics of CaCO_3 precipitation are predicted to have strong impacts on molluscs (Feely *et al.* 2004; Kroeker *et al.* 2013c). Most of mollusc species experienced a reduction in calcification under high $p\text{CO}_2$ / low pH (see reviews (Gazeau *et al.* 2013; Parker *et al.* 2013)). The severity of this decline in calcification is likely dependent on the capacity to regulate internal acid-base status and can also be modulated by the regulation of pH at the calcification site, the presence and composition of a protective organic layer, and the form of CaCO_3 composing the shell (Ries *et al.* 2009). Recent studies demonstrated that the negative trend in calcification observed under ocean acidification context was not a generality as calcification could be non-impacted (Range *et al.* 2011) or positively affected (Ries *et al.* 2009; Findlay *et al.* 2011) under elevated $p\text{CO}_2$. Measuring net calcification can lead to wrongly interpret the ability of marine organisms to produce CaCO_3 as the decrease in calcification may result from increase in dissolution rates of the shell overreaching CaCO_3 gross production (Findlay *et al.* 2009). Quantifying both net and gross calcification of organisms is thus of major importance to define if the animal's

ability to deposit new shell material is impairing by ocean acidification and to clearly understand the effects of high $p\text{CO}_2$ /low pH on CaCO_3 budget.

Increased CO_2 concentrations and changes in carbonate chemistry could not only have direct effects on calcification rate and shell integrity but may also have indirect impacts on metabolism by disturbing extracellular acid-base equilibrium leading finally to a general internal acidosis (Melzner *et al.* 2009). The effects of elevated $p\text{CO}_2$ and/or decreased pH alone are strongly species-specific indicating different sensitivities among mollusc species (see review in Gazeau *et al.* 2013). Various physiological processes have been largely studied in bivalves and gastropods such as respiration (Michaelidis *et al.* 2005; Bibby *et al.* 2007; Beniash *et al.* 2010), excretion (Thomsen & Melzner 2010; Fernandez-Reiriz *et al.* 2011; Liu & He 2012), feeding (Marchant *et al.* 2010; Fernandez-Reiriz *et al.* 2012), immune response (Bibby *et al.* 2008; Matozzo *et al.* 2012) and protein or enzymes production (Tomanek *et al.* 2011; Matozzo *et al.* 2013). In most of the cases, metabolic depression has been evidenced to compensate hypercapnic conditions (Pörtner *et al.* 2005). However, internal acidosis can also be regulated by increasing calcium (Ca^{2+}) concentration in hemolymph (Burnett 1997) or by HCO_3^- buffering (Michaelidis *et al.* 2005). The large variations in responses can be also driven by the interaction between multiple stressors.

The concomitant increase in seawater temperature and $p\text{CO}_2$ are likely to highly affect mollusc metabolism because in addition to change gas solubility and proportion of carbon species (Zeebe 2011) temperature strongly affects physiological and biochemical reactions (Cossins & Bowler 1987). The interactive effects of temperature and hypercapnia are likely to impair physiological processes (Clarke 2003; Pörtner 2008; Hofmann & Todgham 2010; Pörtner 2012). Temperature and $p\text{CO}_2$ act most often synergistically to worsen mortality and stress and to increase deleterious effects (Lannig *et al.* 2010; Parker *et al.* 2010; Matozzo *et al.* 2012; Watson *et al.* 2012a; Ivanina *et al.* 2013; Melatunan *et al.* 2013) but can also interact in an antagonistically way (Hiebenthal *et al.* 2012). Such variability in the responses to elevated $p\text{CO}_2$ and temperature makes prediction about direction and intensity of responses difficult (Parker *et al.* 2013).

One of the most abundant and spread shelled mollusc on the French Northwestern Atlantic and Channel coasts is the slipper limpet *Crepidula fornicata*, Linnaeus 1758 (Blanchard 1997). This invasive gastropod native from the Northeastern American coast was introduced in Europe at the end of the 19th century, mainly through importation of oysters for farming (Blanchard, 1995) and colonizes the European coasts from Southern Sweden to Southern France (Blanchard 1997). It lives in shallow sites, especially in bays and estuaries

where it can reach very high densities of more than one thousand individuals m^{-2} (Blanchard 1995). This species is known to be highly robust to environmental stress, in particular temperature and salinity (Blanchard, 1995; Blanchard, 1997), both parameters that present wide variations in their habitat. This resistance increases the capacity to compete others species as commercial bivalves (e.g. oyster, scallops) and fish juveniles for food (Decottignies *et al.* 2007a; Decottignies *et al.* 2007b) or space (Thouzeau *et al.* 2000; Le Pape *et al.* 2004). *C. fornicata* has large impacts on biodiversity and ecosystem functioning where it has established. Its settlement modifies the nature of sediments because of the retention of biogenic mud (Ehrhold *et al.* 1998), changes faunal assemblages due to the addition of hard substrata over soft sediment (De Montaudoin *et al.* 1999) and impacts the trophic structure of the system (Chauvaud *et al.* 2000). *C. fornicata* also affect carbon, carbonate and nutrient cycles of benthic ecosystems by enhancement of filtration, metabolic activities (respiration and excretion), high $CaCO_3$ production and recycling of nutrients and dissolved carbon back to the pelagic ecosystem (Ragueneau *et al.* 2002; Martin *et al.* 2006b; Martin *et al.* 2007c)

Considering that *C. fornicata* is a key engineer of coastal ecosystems, investigating its metabolic responses in a context of climate change is a major issue for a better understanding of the sensitivities of this species and its ecological impacts in the future. Thus, the objective of this work was to quantify the respiration, ammonia (NH_4^+) excretion, filtration and calcification responses of small and large specimens of *C. fornicata* in crossed conditions of temperature and pCO_2 . Metabolic fluxes were used as a tool to understand organism response and were extrapolated to fluxes at the level of *C. fornicata* populations to evaluate the response in terms of C, $CaCO_3$ and N budget in a context of future climate change.

Materials and methods

Biological material

Crepidula fornicata forms stacks of several individuals in which each individual adheres to the dorsal surface of the shell of the subjacent partner in the stack (Coe 1936). Following a protandrous hermaphroditism, the small individuals at the top of the stacks are generally males and the large ones at the bottom, females (Collin 1995). Stacks were collected by SCUBA divers on November, 30th, 2011, in the Morlaix Bay (Northwestern Brittany, France), at the “Barre des Flots” site ($3^{\circ}53.015'W$; $48^{\circ}40.015'N$). They were transferred

directly to the *Station Biologique de Roscoff* where they were kept in natural unfiltered seawater during 6 weeks at a temperature gradually decreasing down to 10°C, following seasonal temperature variation between autumn and winter. Small individuals (29.5 ± 0.9 mm length) at the top of the stack and larger ones (45.4 ± 0.6 mm length) at the bottom were selected for the experiment, separated from the stack and individually labeled by numbered tags glued on their shell. After removing their soft tissue, the empty shell of the subjacent partners was kept as substratum for living individuals. Entire stacks composed of 3 to 9 individuals and empty shells similar in size to those used as substratum for the single living individuals were also selected for the experiment. All the shells were brushed to remove epibiontes.

Experimental conditions & set-up

Single small and large individuals on their substratum were randomly distributed into nine 10-L aquaria in proportion to 10 individuals of each class size per aquarium. Stacks were also spread in nine other 10-L aquaria (5-6 stacks per aquarium) and kept for morphometric measurements (see below). At the beginning of the experiment, pH was gradually decreased over 2 weeks at 0.02 pH unit day^{-1} from 8.1 until the required pH was reached, to avoid any acute pH stress. *C. fornicata* organisms were then subsequently held for 24 weeks (January, 12th to June, 27th 2012) in three $p\text{CO}_2$ treatments selected according to the recommendations of Barry et al. (2010): $390 \mu\text{atm}$ ($\text{pH}_T = 8.07$) has been chosen as the current control $p\text{CO}_2$, $750 \mu\text{atm}$ ($\text{pH}_T = 7.82$) corresponded to an elevated $p\text{CO}_2$ predicted by the IPCC for the end of the century (Solomon et al. 2007) and $1400 \mu\text{atm}$ ($\text{pH}_T = 7.56$) represented a $p\text{CO}_2$ 5-fold higher than preindustrial $p\text{CO}_2$ ($280 \mu\text{atm}$) as predicted for 2300 (Caldeira & Wickett 2003). The $p\text{CO}_2$ was adjusted by bubbling CO_2 -free air (current $p\text{CO}_2$) or pure CO_2 (elevated $p\text{CO}_2$) in three 100 L header tanks supplied with unfiltered seawater pumped directly in front of the *Station Biologique de Roscoff*. Each of the three $p\text{CO}_2$ treatments had six 10 L replicate aquaria, three for single organisms and three for stacks. They continuously received CO_2 -treated seawater at a rate of 9 L h^{-1} (i.e. a renewable rate of $90\% \text{ h}^{-1}$) from the mixing header tanks. $p\text{CO}_2$ was monitored and controlled by an off line feedback system (IKS Aquastar, Karlsbad, Germany) that regulated the addition of gas in the header tanks. The pH values of the IKS system were adjusted from daily measurements of pH on the total scale (pH_T) in the 18 aquaria using a pH meter (826 pH mobile, Metrohm AG, Herisau, Switzerland) calibrated using Tris/HCl and 2-aminopyridine/HCl buffers (Dickson et al. 2007).

In each $p\text{CO}_2$ treatment, temperature was raised incrementally from 10 to 16°C to mimic the natural changes of temperature from winter to summer. The first three temperature levels (10, 13 and 16°C) were selected according to *in situ* temperature data recorded in the Bay of Morlaix between 2010 and 2013 by the *Service d'Observation des Milieux Littoraux* (SOMLIT) in winter ($10.1 \pm 0.2^\circ\text{C}$), spring ($12.7 \pm 0.4^\circ\text{C}$) and summer ($15.8 \pm 0.02^\circ\text{C}$). The last temperature level was 19°C, representing summer temperature elevated by 3°C (mean temperature raise predicted for the end of the century; Solomon *et al.* 2007). *C. fornicata* organisms were held for three weeks at each temperature level before proceeding the metabolic measurements (see below) which was an acclimation time long enough to be beyond the immediate stress response (Meistertzheim *et al.* 2007). Temperature was maintained at (i) 10°C (“winter conditions”) from January 16th, to February 12th, 2013; (ii) 13°C (“spring conditions”) from February 27th to March 25th, 2013; (iii) 16°C (“summer conditions”) from April 9th to May 6th, 2013, and (iv) 19°C (“future summer conditions”) from May 21th to June 27th, 2013. Between two temperature levels, temperature was gradually increased by 0.2°C/day over two weeks. The 18 aquaria were placed in thermostatic baths where temperature was regulated to within $\pm 0.2^\circ\text{C}$ using 150 to 250 W submersible heaters controlled by the IKS system.

To estimate a potential bias on organism's metabolism induced by culture in mesocosm over time, three independent 10-L aquaria, each containing 10 small and 10 large single slipper limpets on empty shell substratum were maintained at 10°C under ambient pH until the end of the experiment. Aquaria were supplied with the same seawater filling the header tanks. They were kept in a thermostatic bath regulated at 10°C by an aquarium chiller (TC5, TECO®, Ravenna, Italy).

All slipper limpets were fed twice a week with a mix composed of stock solution of *Chaetoceros gracilis* ($\sim 15 \times 10^6$ cells mL^{-1}) and *Isochrysis affinis galbana* ($\sim 26 \times 10^6$ cells mL^{-1}). 400 mL of this algal mix were distributed in batch in each aquarium. Seawater flow was stopped for two hours when organisms were fed and filtered actively. During this feeding time, pH variation did not exceed 0.05 units.

Seawater parameters

Seawater parameters were monitored throughout the experiment. pH_T and temperature were recorded daily in each of the 21 aquaria (18 + 3 control) using a pH meter (826 pH mobile, Metrohm AG, Herisau, Switzerland) previously described. Total alkalinity (A_T) was

measured at each temperature level by HCl 0.01N potentiometric titration on an automatic titrator (Titroline alpha, Schott SI Analytics, Mainz, Germany). Salinity was also measured at each temperature level with a conductimeter (LF 330/ SET, WTW, Weilheim, Germany). Seawater carbonate chemistry, i.e. dissolved inorganic carbon (DIC), $p\text{CO}_2$ and saturation state of aragonite (Ω_{Ar}) were calculated for each crossed condition of $p\text{CO}_2$ and temperature with CO₂SYS software (Lewis & Wallace 1998) using constants from Mehrbach *et al.* (1973) refitted by Dickson & Millero (1987).

Morphometric parameters

At each temperature levels, 9 to 12 individuals (3-4 per aquaria) were removed from the entire stacks. Shell length and tissue dry weight (DW) of each individuals were determined after drying fresh samples at 60°C during 48h. Then, specimens were ignited in a muffle furnace at 520°C for 6 hours to obtain by difference tissue ash-free dry weight (AFDW). The DW of the shell was estimated from the shell length and the length-weight relationships established on a separate pool of individuals at the beginning of the experiment: $\text{DW} = 0.000030885 \times \text{Length}^{3.3158}$, $n = 32$.

Volume, size of the subjacent empty shell, length and estimated DW of the shell of the living individuals, and fresh weight (FW), DW and AFDW of the soft body tissues of living individuals were determined for each incubated specimen when they were sacrificed at the end of “season” or at the end of the experiment.

Condition indices (CI) were calculated according to Davenport and Chen (1987) from individuals removed from the stacks and from those used to estimate soft body metabolic rates (see below) in each crossed condition of $p\text{CO}_2$ and temperature as:

$$\text{CI} = \frac{\text{Tissue AFDW}}{\text{Shell DW}} \times 100$$

Mortality was checked during the experiment. Individuals with no reaction when the foot was stimulated were count as dead ones and removed from the tanks.

Filtration rates

At each “season”, the filtration rate of 3 small and 3 large slipper limpet per $p\text{CO}_2$ condition (i.e. 1 individual per size per aquarium) was determined by calculating clearance

rates (Coughlan 1969). 10 and 20 mL of microalgae mix (*C. gracilis*, *T. affinis galbana*, 1:1) were supplied with a 10 mL syringe equipped with a thin pipe to small and large chambers, respectively, which enclosed the slipper limpets. Water from the chambers were sampled with the syringe every 15 min until the water become totally clear (around 2 hours). Samples were immediately fixed with glutaraldehyde 25% and frozen at -80°C pending analyses. The number of microalgal cells in each sample was then determined on 200 µL aliquots by flux cytometry (Cell Lab Quanta™, SC, Beckman Coulter, USA). Filtration rates (F, in mL SW g⁻¹ DW min⁻¹) were calculated as:

$$F = V \times \frac{\ln[Ci] - \ln[Cf]}{\Delta t \times DW}$$

where [Ci] and [Cf] (in cell mL⁻¹) were respectively the initial and final cell concentrations in the chamber water; V (in L) is the volume of the chamber of the chamber minus individual *C. fornicata* volume; Δt (in h) is the incubation time and DW (in g) is the tissue dry weight of the slipper limpet incubated.

O₂, *NH₄⁺* and *CaCO₃* fluxes

Respiration (R), excretion (E) and net calcification (G_n) rates of 6 small and 6 large individuals were assessed in each *pCO₂* condition at each temperature level (2 small and 2 large ones in each aquarium). Empty shell incubations were carried out to correct rates from oxygen (fO₂), ammonia (fNH₄⁺) and CaCO₃ (fCaCO₃) fluxes related to the subjacent shell (substratum). These corrected rates corresponded to the metabolism of the whole organism including fluxes from both the shell and the soft tissues of the living animal. Soft body respiration and excretion (R_{sb} and E_{sb}, respectively) and gross calcification rates (G_g) were estimated from additive incubations performed on 3 small and 3 large single slipper limpets in each *pCO₂* conditions at 13, 16 and 19°C. Organisms were then killed and their shell were glued on their support with Holdfast® epoxy stick (Aquarium Systems, Sarrebourg, France) by plugging internal space. Plugged shells were re-incubated to take off the corresponding metabolic fluxes from those measured on living whole organisms. These rates were related to fluxes induced only by *C. fornicata* organism without the contribution of external shell metabolism. Finally, oxygen consumptions of the slipper limpets maintained at 10°C were assessed on 6 small and 6 large individuals at each period to test if mesocosm conditioning

induced metabolic depletion over time. They are called in the rest of the text “Control respiration”. At each trial, blank incubations without *C. fornicata* specimens (i.e. just containing seawater from the aquarium) were carried out each time to correct fluxes from any microbiological activity in seawater.

Prior to each rate measurement, the shells were gently cleaned to remove biofilm-forming organisms. O_2 , NH_4^+ and $CaCO_3$ fluxes were assessed after a 4 days starvation using incubations in 185 and 316 mL acrylic chambers (Engineering & Design Plastics Ltd, Cambridge, UK) for small and large individuals, respectively. Specimens were incubated individually in the chambers that were filled with seawater from their respective aquarium. They were put on a plastic grid above a stirring bar (speed 100 r.p.m.), which ensured water homogeneity. Chambers were placed in their respective aquaria during incubations to keep the temperature constant. Incubations were carried out for 2 to 10 h depending on the temperature and the size of the organisms, in order to maintain oxygen saturation above 80 % until the end of the incubation. Oxygen concentrations were measured at the beginning and the end of the incubation period with a non-invasive fibre-optical system (FIBOX 3, PreSens, Regensburg, Germany). The reactive oxygen spots attached to the inner wall of the chambers were calibrated at the beginning of each incubation set (i.e. each temperature level) with 0 % and 100 % oxygen buffers. Seawater was sampled for ammonia (NH_4^+) concentration and A_T measurements with 100 mL syringes at the beginning of the incubation, directly in the aquaria just after the chambers were closed, and at the end of the incubation, in the incubation chamber. Samples were filtered through 0.7 μm Whatman GF/F filters into 100 mL glass bottles and fixed with reagent solutions for ammonia or poisoned with mercuric chloride (0.02 % vol/vol; Dickson *et al.* 2007) for A_T measurements. Vials were stored in dark pending analysis. Ammonia concentrations were then determined by the Solorzano method (Solorzano 1969) using spectrophotometry at a wavelength of 630 nm (spectrophotometer UV-1201V, Shimadzu Corp, Kyoto, Japan). A_T (in $\mu Eq L^{-1}$) were determined by HCl 0.01N potentiometric titration on an automatic titrator (Titroline alpha, Schott SI Analytics, Mainz, Germany) and by using the Gran method (non-linear least-squares fit) applied to pH values from 3.5 to 3.0 (Dickson *et al.* 2007).

Oxygen (R , R_{sb} and fO_2 , in $\mu mol O_2 g^{-1} DW h^{-1}$) and ammonia fluxes (E , E_{sb} and fNH_4^+ in $\mu mol NH_4^+ g^{-1} DW h^{-1}$) were directly calculated from oxygen and ammonia concentrations, respectively. $CaCO_3$ fluxes (G_n , G_g and $fCaCO_3$, in $\mu mol CaCO_2 g^{-1} DW h^{-1}$) were estimated using the alkalinity anomaly technique (Smith & Key 1975) based on a decrease of A_T by 2 equivalents for each mole of $CaCO_3$ precipitated (Wolf-Gladrow *et al.*

2007). This method is usually used to examine the changes in calcification rate that may occur over time (Chisholm & Gattuso 1991; Gattuso *et al.* 1998). As ammonia production increases alkalinity in a mol per mol ratio (Wolf-Gladrow *et al.* 2007), the alkalinity variation was corrected by the ammonia flux to calculate CaCO₃ fluxes :

$$R / R_{sb} / fO_2 = \frac{\Delta O_2 \times V}{\Delta t \times DW}$$

$$E / E_{sb} / fNH_4^+ = \frac{\Delta NH_4^+ \times V}{\Delta t \times DW}$$

$$G_n / G_g / fCaCO_3 = - \frac{(\Delta A_T - \Delta NH_4^+) \times V}{2 \times \Delta t \times DW}$$

where ΔO_2 (in $\mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1}$) is the difference between initial and final O₂ concentrations; ΔNH_4^+ (in $\mu\text{mol NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$) is the difference between initial and final NH₄⁺ concentrations; ΔA_T is the difference between initial and final total alkalinity concentrations ($\mu\text{mol Eq L}^{-1}$); V (in L) is the volume of the chamber of the chamber minus individual *C. fornicata* volume; Δt (in h) is the incubation time and DW (in g) is the soft tissue dry weight of incubated living specimen or the shell dry weight for empty shell incubations.

Fluxes extrapolation

Physiological rates of whole organism were extrapolated to calculate annual fluxes of *C. fornicata* populations. Three densities were used: (i) low (21 individuals m⁻²), (ii) intermediate (200 individuals m⁻²) and (iii) high density (1700 individual m⁻²) characteristic of the densities found in the Bay of Morlaix (Dupont 2004), the Golfe Normano-Breton (Dupont 2004) and the Bay of Brest (Ragueneau *et al.* 2002) , respectively. We assumed that *C. fornicata* populations were composed of 44.5 % of small individuals (shell length < 30 mm) and 55.5 % of large one (shell length > 30 mm) (Martin *et al.* 2007c). The limit of 30 mm was defined as the value of the longest shell in our small individual pool.

First, a mean annual rate (in mol g⁻¹ DW y⁻¹) was determined for small and large individuals independently by calculating an average annual rate from seasonal individual rates. 13°C rate was doubled as it was related for both spring and autumn, two seasons which have the same mean temperature (SOMLIT data). Individual mean annual rates were then

combined with respect to small and large individual percentages to obtain the annual rate of the population (Ar in $\text{mol m}^{-2} \text{y}^{-1}$) following the formula:

$$Ar (\text{mol m}^{-2} \text{y}^{-1}) = [(r_{10^{\circ}\text{C}} + 2 \times r_{13^{\circ}\text{C}} + r_{16^{\circ}\text{C}})/4 \times 24 \times 365 \times DW_{\text{small}} \times \%_{\text{small}} \times d] \\ + [(r_{10^{\circ}\text{C}} + 2 \times r_{13^{\circ}\text{C}} + r_{16^{\circ}\text{C}})/4 \times 24 \times 365 \times DW_{\text{large}} \times \%_{\text{large}} \times d]$$

where Ar (in $\text{mol g}^{-1} \text{DW h}^{-1}$) is a respiration, excretion or calcification rate; DW (in g) is the mean dry weight of small (0.15 g) and large (0.37 g) of our *C. fornicata* data, % the percentage of small (44.5) and large (55.5) individuals in the population; d , the *C. fornicata* density in the population.

Respiration rates measured in terms of O_2 fluxes were converted in terms of CO_2 fluxes with a mean respiratory quotient of 0.75 (Martin *et al.* 2006b).

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using the free software R 2.15.0 version (R Core Team 2013). Normality of the data and homoscedasticity were checked by Kolmogorov-Smirnov's test and Levene's test, respectively, before each statistical test. To fulfill analyses of variance (ANOVA) assumptions, three-way ANOVA were performed separately for small and large individuals on the different physiological rates (respiration, excretion, calcification and filtration) with the GAD package (Sandrini-Neto & Camargo 2012). $p\text{CO}_2$ and temperature were considered as fixed factors whereas aquarium was a random factor to take in account spatial pseudoreplication. Especially for whole organism and empty shells rates, repeated 3-way ANOVA were used with repeated measurements on the same individual through the temperature levels. Any changes in respiration rate of individuals maintained at 10°C through time (temperature levels) were assessed using non-parametric Friedman test for repeated measurements, separately for small and large slipper limpets. Finally, the effects of size, $p\text{CO}_2$ and temperature on condition index (CI) were investigated by a 3-way ANOVA. Student-Newman-Keuls (SNK) post hoc tests were applied to establish differences among treatments with a confidence level of 95% when ANOVA showed significant results. All the results are presented as mean \pm standard error (SE).

Results

Seawater parameters

The mean temperature and parameter of the carbonate chemistry of seawater among the crossed $p\text{CO}_2$ and temperature conditions are presented in Table 1. Temperature was maintained stable at each time period with a variability lower than 0.5°C . The different $p\text{CO}_2$ levels were kept close to the selected values of 390, 750 and 1400 μatm except at 19°C where all the $p\text{CO}_2$ increased from the baseline (+ 100-200 μatm). A_T ranged from 2365 ± 2 to $2422 \pm 2 \mu\text{Eq kg}^{-1}$. The carbonate saturation state with respect to aragonite (Ω_{Ar}) decreased less than 1 only in the 1400 μatm $p\text{CO}_2$ condition. Salinity varied between 34.2 ± 0.1 and 35.1 ± 0.1 among the different $p\text{CO}_2$ and temperature levels.

Table 1: Mean seawater temperature and parameters of the carbonate system in each $p\text{CO}_2$ treatment (3 aquaria per treatment) and at each temperature level. The pH_T (pH on the total scale) and total alkalinity (A_T) were measured while other parameters were calculated. Mean A_T calculated for each “season” ($n = 3$ for controls and $19 < n < 30$ for other condition) per crossed $p\text{CO}_2$ and temperature condition was used for the calculations. $p\text{CO}_2$, CO_2 partial pressure; DIC, dissolved inorganic carbon and Ω_{Ar} , saturation state of seawater with respect to aragonite.

	n	Temperature ($^\circ\text{C}$)		pH_T		$p\text{CO}_2$ (μatm)		A_T ($\mu\text{Eq kg}^{-1}$)		DIC ($\mu\text{mol C kg}^{-1}$)		Ω_{Ar}	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Winter conditions (10°C)													
390 μatm	23	9.7	0.2	8.14	0.01	322	7	2365	2	2138	4	2.47	0.04
750 μatm	23	9.8	0.2	7.82	0.01	729	19	2368	2	2270	4	1.33	0.03
1400 μatm	23	9.5	0.2	7.55	0.03	1486	75	2376	2	2366	11	0.78	0.08
control 10°C	40	9.2	0.2	8.19	0.02	288	17	2370	3	2115	8	2.73	0.07
Spring conditions (13°C)													
390 μatm	27	12.9	0.2	8.12	0.02	356	25	2418	2	2167	8	2.76	0.07
750 μatm	27	13.0	0.1	7.81	0.01	781	20	2416	2	2304	3	1.48	0.03
1400 μatm	27	12.8	0.1	7.53	0.01	1557	43	2422	2	2405	4	0.82	0.02
control 10°C	41	11.0	0.1	8.18	0.01	297	12	2419	2	2152	5	2.88	0.05
Summer conditions (16°C)													
390 μatm	28	15.9	0.1	8.08	0.01	376	10	2379	5	2126	5	2.80	0.05
750 μatm	28	16.1	0.1	7.82	0.00	748	8	2369	5	2238	2	1.66	0.01
1400 μatm	28	16.0	0.1	7.55	0.01	1492	19	2380	5	2345	2	0.94	0.01
control 10°C	42	11.4	0.1	8.23	0.01	253	6	2376	4	2083	5	3.13	0.05

Future summer conditions (19°C)													
390 μ atm	23	18.4	0.5	8.02	0.01	450	10	2391	2	2152	5	2.70	0.05
750 μ atm	23	18.6	0.5	7.77	0.01	858	19	2395	3	2266	4	1.68	0.04
1400 μ atm	23	18.4	0.5	7.51	0.01	1652	41	2394	2	2359	4	0.96	0.03
control 10°C	23	12.4	0.1	8.20	0.01	280	12	2393	1	2107	8	3.07	0.08

Mortality and condition indices

8 % of *C. fornicata* individuals died during the experiment, among all $p\text{CO}_2$ and temperature. Large *C. fornicata* were more sensitive than small ones with 80 % and 20 % dead individuals respectively. Mortality occurred indiscriminately among $p\text{CO}_2$ treatments with a total of 6, 5 and 9 dead individuals at the end of the experiment at 390, 750 and 1400 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$, respectively.

Condition indices (CI) were not significantly affected by $p\text{CO}_2$ (ANOVA, $df = 2$, $F = 0.369$, $p = 0.692$). CI grouped among $p\text{CO}_2$ treatments were presented in Table 2 (mean \pm SE) separately for small and large individuals as size affected the indices (ANOVA, $df = 1$, $F = 9.846$, $p = 0.002$). They progressively and slowly decreased (ANOVA, $df = 3$, $F = 4.518$, $p = 0.005$) with the increase in temperature with the highest indices at 10°C (5.6 and 4.9 for small and large, respectively) and the lowest at 19°C (4.3 and 3.3 for small and large, respectively).

Table 2: Mean condition index values calculated for *C. fornicata* small and large individuals at each temperature level (all $p\text{CO}_2$ considered together).

Period	Small individuals			Large individuals		
	n	mean	SE	n	mean	SE
Winter	12	5.62	0.42	7	4.89	0.50
Spring	27	4.90	0.54	19	4.30	0.37
Summer	26	4.28	0.20	19	3.89	0.33
Future	22	4.31	0.28	31	3.30	0.18

Respiration

Respiration rates of whole organisms changed with temperature but not with $p\text{CO}_2$ both in small and large individuals (Figure 1, Table 3). All $p\text{CO}_2$ mixed, mean respiration rates in small *C. fornicata* increased from $3.78 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$ at 10°C to $11.76 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$ at 19°C . In large organisms, the lowest mean respiration rate was recorded at 10°C ($4.82 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$) while rates did not differ from 13 to 19°C with a mean value of $11.50 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$.

The increase in $p\text{CO}_2$ did not impact respiration rates of soft body tissues in both small and large individuals. All $p\text{CO}_2$ included, mean soft body tissues respiration differed among temperature in small individuals (Figure 2, Table 3) increasing from $3.36 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$ at 13°C to $14.33 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$ at 19°C . Conversely, mean respiration rates did not differ among temperature in large individuals.

Oxygen fluxes measured on empty shells was affected by temperature (Figure 3, Table 3) with a slight decrease ($p = 0.048$) from 10°C ($0.05 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$) to 19°C ($0.02 \mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$) but was not impacted by $p\text{CO}_2$.

In the control condition aquaria, temperature was maintained stable at 10°C over the first weeks of the experiment and slowly increased from April, 8th to the end of the experiment until reaching a mean of 12.4°C between April, 21st and June, 15th (Table 1). Respiration in small individuals of the control showed high variation over the time (Figure 4, white bars) but no time effect was detected (Friedman test, $df = 3$, $\text{chi-squared} = 6.6$, $p = 0.086$, $n = 6$). Conversely, respiration rates of the large individuals of the control increased over throughout the experiment (Figure 4, grey bars) with a significant time effect (Friedman test, $df = 3$, $\text{chi-squared} = 9.4$, $p = 0.024$, $n = 6$).

Excretion

Whole organism excretion rates varied with temperature but not with $p\text{CO}_2$ both in small and large individuals (Figure 1, Table 3). Mean excretion rates calculated among $p\text{CO}_2$ for small *C. fornicata* gradually increased from $0.15 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$ at 10°C to $1.47 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$ at 19°C . Excretion rates of large individuals showed a parabolic trend with an increase from 10°C ($0.16 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$) to 16°C ($1.34 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$) followed by a decrease at 19°C ($0.74 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$).

Temperature significantly affected the excretion rates of soft body tissues in both class sizes (Figure 2, Table 3). They followed the same trend as excretion rates of whole organisms: they increased gradually from 13 to 19°C in small individuals and drew a parabolic curve in large organisms with the highest rate at 16°C ($0.92 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{g}^{-1} \text{DW h}^{-1}$). $p\text{CO}_2$ had no effect on excretion rates in small individuals but significantly affected excretion rate of soft tissues of the large individuals (Table 3). Higher excretion rates were recorded at a $p\text{CO}_2$ of 1400 μatm ($1.03 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{g}^{-1} \text{DW h}^{-1}$) than at 390 and 750 μatm $p\text{CO}_2$ ($0.4 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{g}^{-1} \text{DW h}^{-1}$) for large individuals.

The ammoniacal fluxes in empty shells were only affected by temperature (Figure 3, Table 3) with higher rates at 10°C ($0.005 \mu\text{mol NH}_4^+ \text{g}^{-1} \text{DW h}^{-1}$) than at the other temperatures levels where rates were close to 0.

Filtration

$p\text{CO}_2$ did not impact filtration rates both in small and large individuals (Figure 1, Table 3). In small *C. fornicata*, filtration rates were similar between 10 and 16°C ($25.50 \text{ mL g}^{-1} \text{DW min}^{-1}$) and increased at 19°C ($54.30 \text{ mL g}^{-1} \text{DW min}^{-1}$). Conversely, filtration rates in large individuals increased gradually from 10°C ($5.43 \text{ mL g}^{-1} \text{DW min}^{-1}$) to 19°C ($25.78 \text{ mL g}^{-1} \text{DW min}^{-1}$).

Calcification

Net calcification rates of the whole organisms were affected by $p\text{CO}_2$ increase both in small and large individuals but not by temperature (Figure 1, Table 3). Mean net calcification rates calculated among temperature were similar at $p\text{CO}_2$ of 390 (1.88 and $1.63 \mu\text{mol CaCO}_3 \text{g}^{-1} \text{DW h}^{-1}$ in small and large individuals, respectively) and 750 μatm (1.02 and $0.60 \mu\text{mol CaCO}_3 \text{g}^{-1} \text{DW h}^{-1}$ in small and large, respectively) but significantly lower at 1400 μatm $p\text{CO}_2$ (-2.53 and $-1.77 \mu\text{mol CaCO}_3 \text{g}^{-1} \text{DW h}^{-1}$ in small and large, respectively). In the former treatment, net calcification rates were negative corresponding to dissolution. In small individuals, $p\text{CO}_2$ response varied as a function of temperature, in particular at 1400 μatm $p\text{CO}_2$ where organisms dissolved at 10, 13 and 16 °C and calcified at 19°C.

Gross calcification measured by the difference between net calcification of the whole organism and external dissolution of the shell did not vary among temperature levels both in small and large individuals (Figure 2, Table 3). ANOVA revealed that calcification rate in

small individuals was significantly affected by $p\text{CO}_2$ ($p = 0.045$). Although post-hoc tests did not show any significant difference between the different $p\text{CO}_2$ treatments, a general negative trend was observed with increasing $p\text{CO}_2$. All temperature pooled, mean gross calcification rate of small *C. fornicata* decreased from 390 ($4.71 \text{ CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$) to 1400 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$ ($-0.33 \text{ } \mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$). Conversely, no particular trend of gross calcification was observed in large individuals ($p = 0.094$).

CaCO_3 fluxes measured in empty shells were negative, corresponding to dissolution (Figure 3). This dissolution process was affected by $p\text{CO}_2$ and temperature but not by their interaction (Table 3). Mean dissolution rates among temperature increased gradually from 390 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$ ($-0.01 \text{ } \mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$) to 1400 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$ ($-0.06 \text{ } \mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$). The lowest mean rate among $p\text{CO}_2$ was recorded at 19°C ($-0.02 \text{ } \mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$) and the highest at 10°C ($-0.05 \text{ } \mu\text{mol CaCO}_3 \text{ g}^{-1} \text{ DW h}^{-1}$).

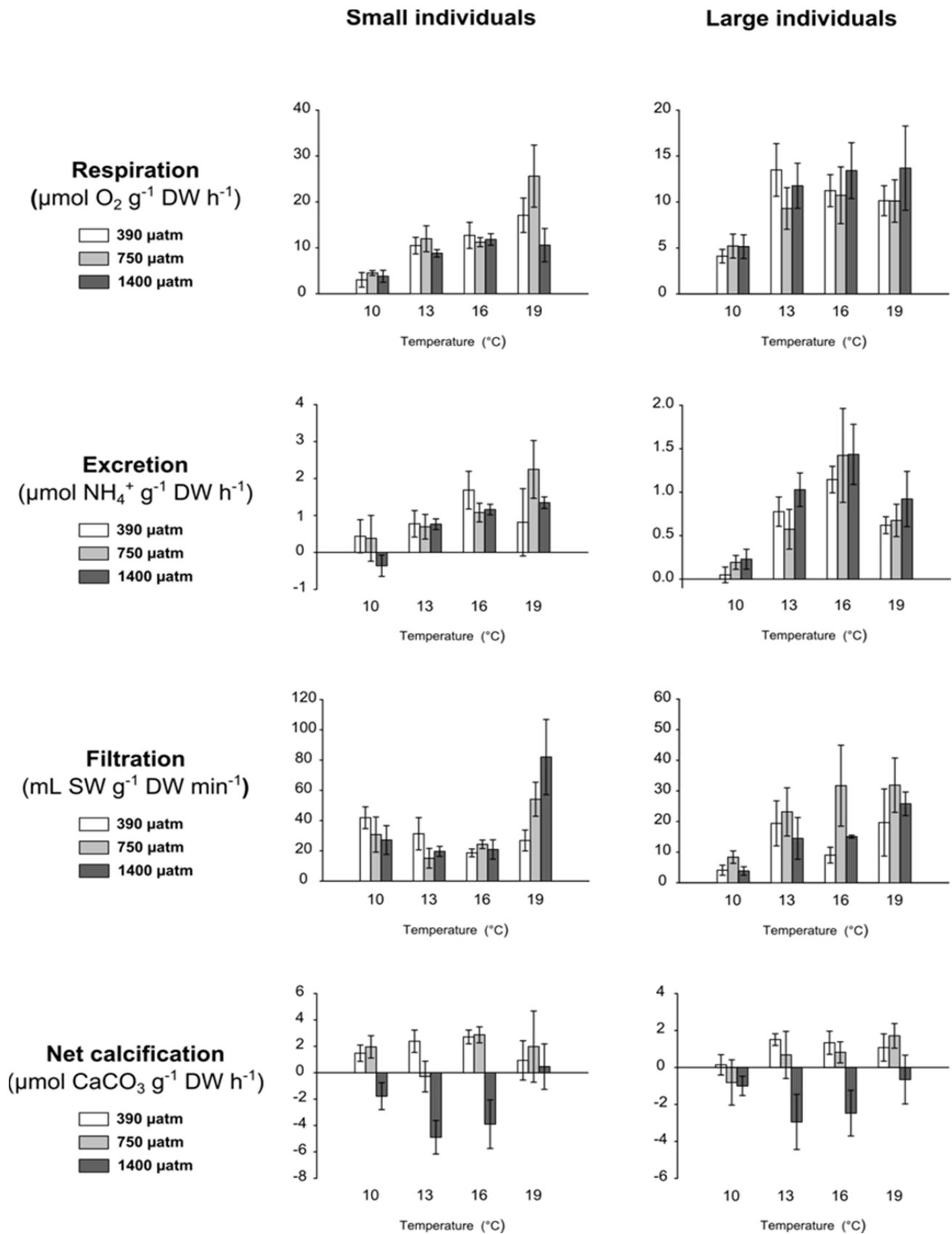


Figure 1: Whole organism respiration, NH_4^+ excretion, net calcification and filtration rates of in the three $p\text{CO}_2$ treatments (grey scale) at 10, 13, 16 and 19 $^{\circ}\text{C}$ for single small and large *C. fornicata* individuals. Results are expressed as mean \pm standard error, n = 6.

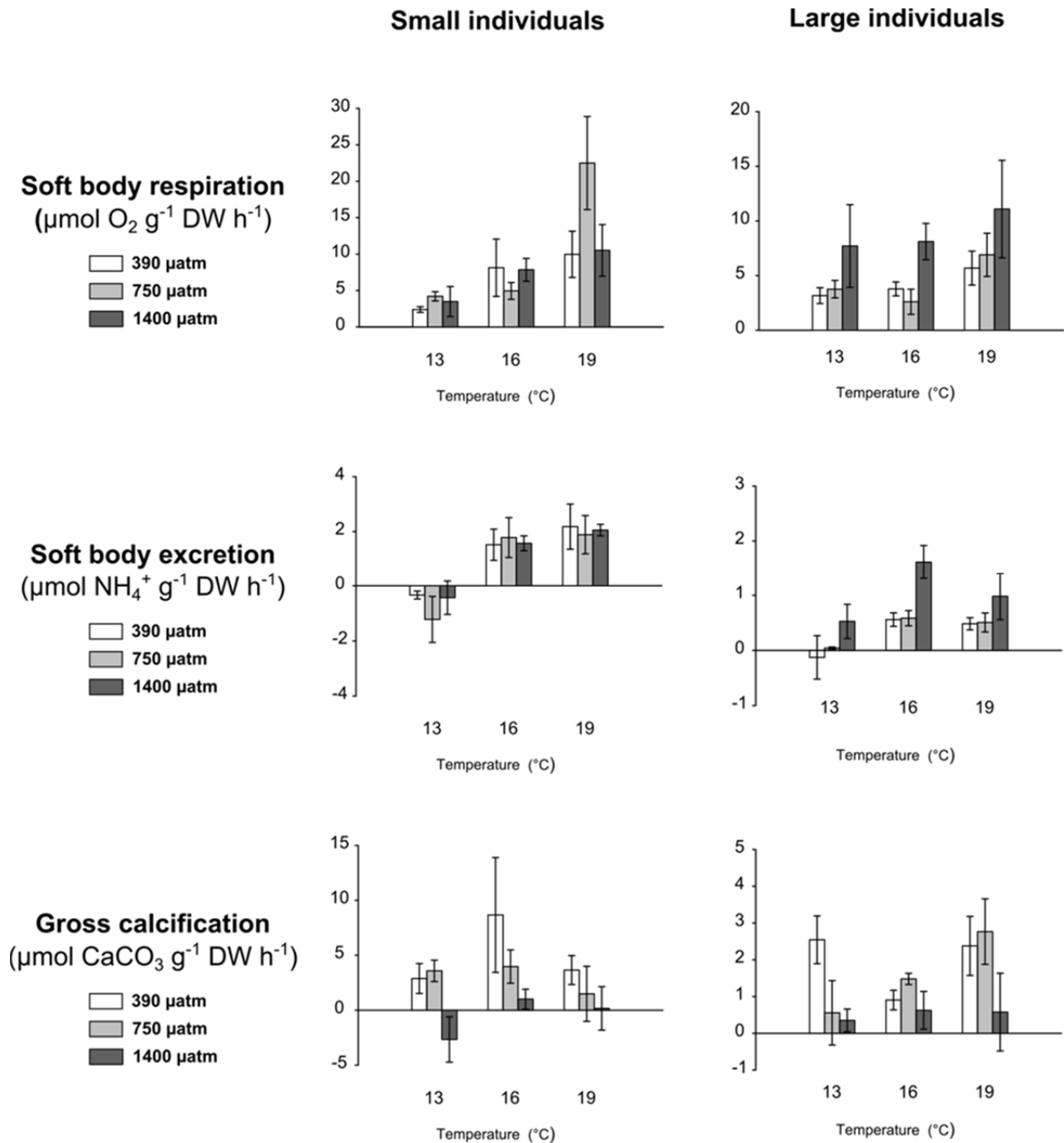


Figure 2: Soft body tissue respiration, NH_4^+ excretion and gross calcification rates in the three $p\text{CO}_2$ treatments (grey scale) at 13, 16 and 19°C for small and large *C. fornicata* organisms without shell contribution. Results are expressed as mean \pm standard error, $n = 3$ at 13 and 16°C and $n = 6$ at 19°C.

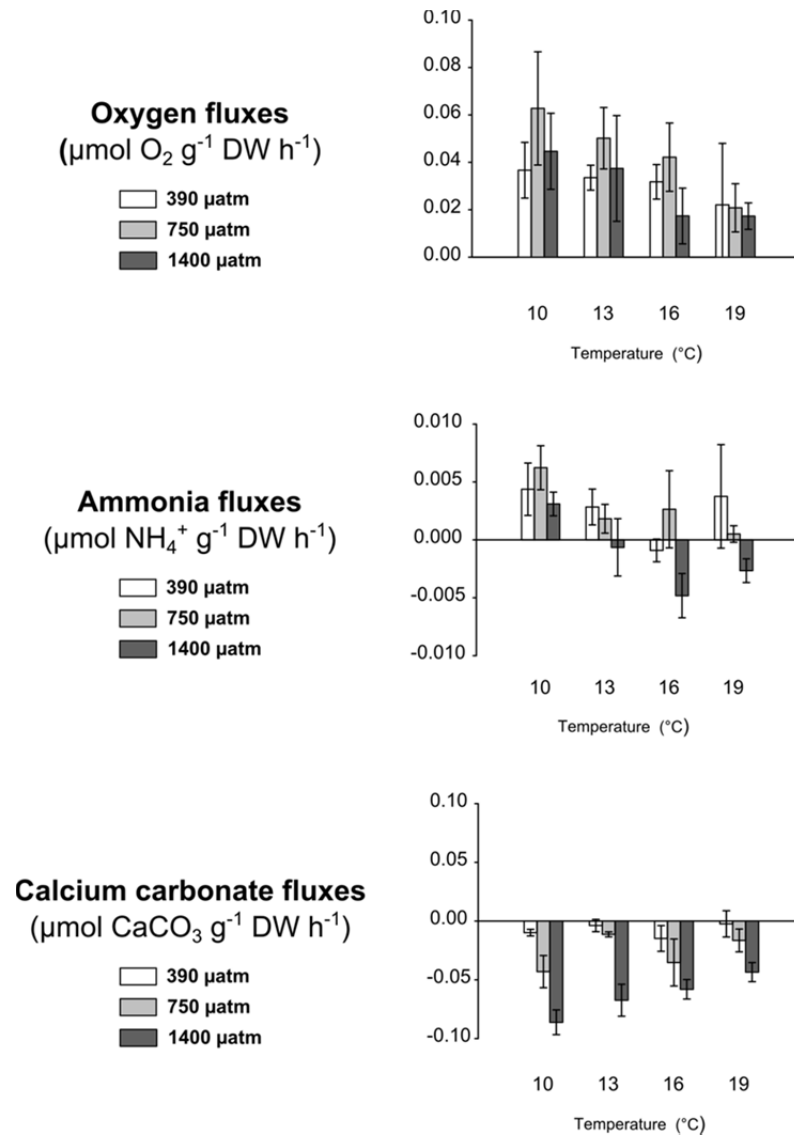


Figure 3: Oxygen, ammonia and calcium carbonate fluxes in empty shells in the three $p\text{CO}_2$ treatments (grey scale) at 10, 13, 16 and 19 $^{\circ}\text{C}$ for empty shells of *C. fornicata*. Results are expressed by mean \pm standard error, $n = 6$.

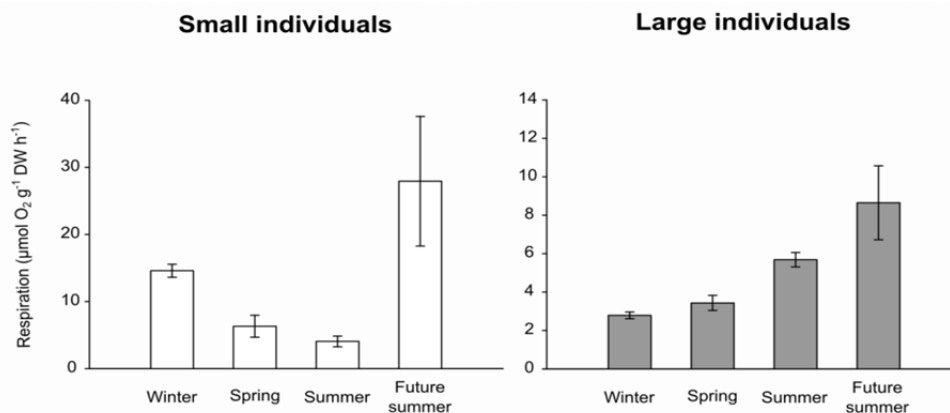


Figure 4: Respiration rates in the control condition 10 $^{\circ}\text{C}$ at the different period for single small (white bars) and large (polka-dotted bars) *C. fornicata* individuals kept at 10 $^{\circ}\text{C}$ during all the experiment. Results are expressed by mean \pm standard error, $n = 6$.

Table 3: Summary of 3 way repeated and non-repeated ANOVAs followed by Student-Newman-Keuls post hoc tests testing the effect of $p\text{CO}_2$, temperature and aquarium on *Crepidula fornicata* metabolism. Bold characters indicate significant p values and different letters indicates significant differences with $p > 0.05$.

Factors	3-way repeated (whole organism) and non-repeated (soft tissues) ANOVAs										Post hoc SNK tests								
	$p\text{CO}_2$			Temperature			$p\text{CO}_2 \times \text{Temperature}$		Aquarium		$p\text{CO}_2$ (μatm)			Temperature ($^{\circ}\text{C}$)					
	df	F	p	df	F	p	df	F	p	df	F	p	390	750	1400	10	13	16	19
Small individuals																			
Whole organism respiration	2	1.312	0.337	3	15.477	< 0.001	6	2.054	0.078	6	1.255	0.364				a	b	b	c
Whole organism excretion	2	0.464	0.649	3	6.340	0.001	6	1.365	0.249	6	0.634	0.702				a	b	c	c
Filtration	2	0.806	0.490	3	6.176	0.005	6	2.398	0.070	6	0.736	0.628				a	a	a	b
Net calcification	2	11.325	0.009	3	1.871	0.148	6	2.335	0.048	6	0.458	0.823	a	a	b				
Soft body tissues respiration	2	1.673	0.208	2	5.235	0.013	4	1.175	0.346	6	0.661	0.525				a	a,b	b	
Soft body tissue excretion	2	0.160	0.853	2	12.290	< 0.001	4	0.160	0.956	6	0.523	0.599				a	b	b	
Gross calcification	2	3.529	0.045	2	1.374	0.271	4	0.488	0.745	6	0.839	0.444	a	a	a				
Large individuals																			
Whole organism respiration	2	0.225	0.805	3	13.896	< 0.001	6	0.865	0.528	6	1.416	0.306				a	b	b	b
Whole organism excretion	2	0.282	0.764	3	24.430	< 0.001	6	0.508	0.799	6	2.635	0.093				a	b	c	b
Filtration	2	1.265	0.348	3	7.724	0.002	0	0.088	0.577	6	3.725	0.014				a	b	b,c	c
Net calcification	2	7.674	0.022	3	1.302	0.285	6	1.350	0.255	6	0.602	0.724	a	a	b				
Soft body tissues respiration	2	2.602	0.094	2	1.221	0.312	4	0.046	0.996	6	0.818	0.453							
Soft body tissue excretion	2	4.756	0.018	2	3.996	0.031	4	0.321	0.861	6	0.081	0.922	a	a	b	a	b	a,b	
Gross calcification	2	2.599	0.094	2	0.980	0.389	4	0.746	0.057	6	0.988	0.386							
Empty shell																			
O ₂ fluxes	2	0.491	0.635	3	2.839	0.048	6	0.327	0.919	6	1.147	0.409				a	a,b	b,c	c
NH ₄ ⁺ fluxes	2	4.120	0.075	3	4.187	0.011	6	0.700	0.652	6	0.632	0.703				a	b	b	b
CaCO ₃ fluxes	2	23.350	0.001	3	7.000	< 0.001	6	2.046	0.079	6	0.330	0.905	a	b	c	a	b	c	b

Fluxes extrapolation

Extrapolation for respiration, excretion and calcification are given for three different population densities under three $p\text{CO}_2$ level tested (Table 4). Respiration fluxes at the population level decreased by 12% and 2% at 750 and 1400 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$, respectively, relative to the current $p\text{CO}_2$ condition. Trends were different for excretion among the $p\text{CO}_2$ conditions: population rates decreased by 6 % at 750 μatm and increased by 13 % at 1400 μatm relative to 390 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$. Calcification suffered the most dramatic reduction by decreasing from 390 μatm to 750 μatm (-63%) and to 1400 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$ (-294 %) leading to dissolution in the former $p\text{CO}_2$ condition at the population level.

Table 4: Extrapolation to community fluxes. Annual rates are given in $\text{mol m}^{-2} \text{y}^{-1}$ or $\text{g m}^{-2} \text{y}^{-1}$ of CO_2 , NH_4^+ and CaCO_3 for respiration, excretion and calcification fluxes, respectively, in the different $p\text{CO}_2$ conditions.

		$p\text{CO}_2$ condition (μatm)			$p\text{CO}_2$ condition (μatm)			
		390	750	1400	390	750	1400	
Low density (21 ind m ⁻²)	Flux ($\text{mol m}^{-2} \text{y}^{-1}$)				Flux ($\text{g m}^{-2} \text{y}^{-1}$)			
	R _{CO₂}	0.39	0.34	0.38	R _{CO₂}	4.66	4.10	4.56
	E _{NH₄⁺}	0.04	0.04	0.04	E _{NH₄⁺}	0.53	0.50	0.60
	G _{CaCO₃}	0.07	0.03	-0.14	G _{CaCO₃}	7.13	2.65	-13.83
Intermediate density (200 ind m ⁻²)	R _{CO₂}	3.70	3.25	3.62	R _{CO₂}	44.38	39.00	43.43
	E _{NH₄⁺}	0.36	0.34	0.41	E _{NH₄⁺}	5.04	4.72	5.71
	G _{CaCO₃}	0.68	0.25	-1.32	G _{CaCO₃}	67.91	25.23	-131.72
High density (1400 ind m ⁻²)	R _{CO₂}	25.89	22.75	25.34	R _{CO₂}	310.66	273.02	304.03
	E _{NH₄⁺}	2.52	2.36	2.86	E _{NH₄⁺}	35.29	33.01	39.99
	G _{CaCO₃}	4.75	1.76	-9.21	G _{CaCO₃}	475.38	176.59	-922.05

Discussion*Respiration*

Respiration rates measured at 390 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$ in *C. fornicata* small and large individuals were lower than the ones previously measured on the same species in laboratory experiments (13 to 44 $\mu\text{mol O}_2 \text{g}^{-1} \text{DW h}^{-1}$; Newell & Kofoed 1977a) but ranged respiration rates recorded *in situ* in the Bay of Brest in Northwestern France (4 to 45 $\mu\text{mol O}_2 \text{g}^{-1} \text{DW h}^{-1}$;

Martin *et al.* 2006b). Temperature increased respiration rates of both whole organisms and soft body tissues alone in both small and large individuals regardless of the $p\text{CO}_2$. While respiration rates gradually increased with temperature in small *C. fornicata*, it only increased from 10°C to the other temperature levels in large *C. fornicata*. This increase is a common response due to rate-enhancing effects of temperature on physiological and biochemical reactions in ectotherms (Cossins & Bowler 1987; Pörtner 2008; Pörtner 2012). The respiration rates of small individuals were higher than those of the larger ones because metabolic rate (normalized to the biomass) decreases with increasing organisms size (von Bertalanffy 1951; Parsons *et al.* 1984). Small individuals have higher energy consumption as they grow faster than the large ones (von Bertalanffy 1964).

Conversely to temperature, $p\text{CO}_2$ did not affect respiration. Metabolic depression is a common response against hypercapnic seawater conditions (Guppy & Withers 1999) and has been shown in most species of mussels, oyster and clam previously studied (Michaelidis *et al.* 2005; Bibby *et al.* 2007; Thomsen & Melzner 2010; Melatunan *et al.* 2011; Liu & He 2012; Navarro *et al.* 2013). In all these cases, a decrease in oxygen uptake was reported at low pH induced by hypercapnia. However, other studies underlined a lack of any $p\text{CO}_2$ effect on bivalves and limpet respiration (Gazeau *et al.* 2007; Marchant *et al.* 2010; Dickinson *et al.* 2012; Fernandez-Reiriz *et al.* 2012; Liu & He 2012) as reported in our study. This resistance aptitude is likely due to an effective acidosis buffering system (Melzner *et al.* 2009) though the increase in HCO_3^- internal concentrations (Michaelidis *et al.* 2005; Gutowska *et al.* 2010b), higher H^+ excretion (Pörtner *et al.* 2005; Melzner *et al.* 2009) or by avoiding the use of pH-sensitive oxygen-binding pigments (Thomsen *et al.* 2010; Hiebenthal *et al.* 2012). Resistance can also come from acclimation or adaptation to fluctuations in the environment where species inhabit (Burnett 1997; Clark *et al.* 2013). Species living in environments with large abiotic variation may have a high phenotypic plasticity which can allow them to survive in stressful conditions (Somero 2010). Therefore, *C. fornicata* living in coastal and intertidal variable habitats may possess greater physiological capacity to respond to CO_2 -induced acidification.

In the range of $p\text{CO}_2$ and temperature tested, *C. fornicata* respiration rates were not impacted by the interaction of both stressors. As an eurytherm species, *C. fornicata* optimal temperature should be higher than 19°C (Diederich & Pechenik 2013), a temperature frequently occurring during summer in some of the bay where *C. fornicata* is present (e.g. Bassin d'Arcachon in South of France; De Montaudouin *et al.* 1999) which did not constitute a real thermal stress. Increase in temperature in the thermal tolerance window could improve

performances and resistance to high CO₂ concentrations (Pörtner & Farrell 2008) and so the increase in temperature might allow *C. fornicata* to tolerate pCO₂ increase.

In empty shells, oxygen fluxes decreased with temperature increase but did not change among pCO₂. The shell of *C. fornicata* is usually colonized by the boring sponge *Cliona celata* (Le Cam & Viard 2011). Even if the selected individuals were not or poorly colonized by *C. celata*, the microscopic stage of this sponge was likely to be present and partly responsible of oxygen consumption measured in shell. In addition, some biofilm may have developed on the shell despite careful cleaning before metabolic measurement and may also have contributed to shell respiration. Nevertheless, respiration in empty shell was really low, representing less than 4 % of the oxygen fluxes measured on whole organism. Thus its contribution to the whole organism respiration can be overlooked.

Mesocosm cannot perfectly reproduce *in situ* conditions such as natural diet or tidal cycles. This may lead to an increased stress for the organisms grown in these systems (Bibby *et al.* 2008). The effect of culture in mesocosm on organisms was tested through measurements of the respiration of individuals kept at 10°C throughout the experiment. The respiration rates were not affected over time in small individuals while the respiration of the large ones slightly increased in correlation with a +2°C increase in temperature from the beginning to the end of the experiment. This lack of metabolic depletion (decrease in respiration rates) suggested the absence of any mesocosm effect on the metabolism of *C. fornicata*.

Excretion

The main excretion product in filter feeder molluscs is ammonia (Bishop *et al.* 1983; Arnott & Vanni 1996) which is waste of the amino acid catabolism (Bishop *et al.* 1983). Excretion rates measured here at 390 µatm pCO₂ in *C. fornicata* were in the range of those measured *in situ* in the Bay of Brest (0.5 to 2.3 µmol NH₄⁺ g⁻¹ DW h⁻¹; Martin *et al.* 2006b). Excretion rates of whole organisms and soft body tissues alone were enhanced by the increase in temperature regardless the size of the organisms. As respiration, excretion was higher in small than in large individuals due to the size effect on metabolism (von Bertalanffy 1951; Parsons *et al.* 1984). Respiratory and excretory processes respond similarly to changes in temperature and body size (Parsons *et al.* 1984). Accordingly, ammonia excretion cannot be seen independently of the rates of oxygen consumption and energy turnover (Langenbuch & Pörtner 2002).

C. fornicata excretion rate was not affected by $p\text{CO}_2$ when considering the whole organism but significantly increased with $p\text{CO}_2$ when considering only the soft body tissues of large individuals. NH_4^+ excretion in molluscs has previously been reported to increase under elevated $p\text{CO}_2$ (Langenbuch & Pörtner 2002; Michaelidis *et al.* 2005; Thomsen & Melzner 2010; Fernandez-Reiriz *et al.* 2011; Hammer *et al.* 2011; Fernandez-Reiriz *et al.* 2012; Range *et al.* 2013) except in the three bivalve species studied by Liu and He (2012) and in *Mytilus chilensis* (Navarro *et al.* 2013). This increase in NH_4^+ excretion under reduced pH conditions can be interpreted as an internal pH regulatory mechanism (Thomsen & Melzner 2010; Fernandez-Reiriz *et al.* 2012). The higher excretion rates likely indicate an enhancement of the protein metabolism which contributes to intracellular pH regulation (Fernandez-Reiriz *et al.* 2012). This may have the added benefit that protein degradation implies a higher HCO_3^- production and consequently promote internal pH regulation (Langenbuch & Pörtner 2002; Boron 2004; Michaelidis *et al.* 2005) to avoid metabolic depression.

Ammonia released by empty shell represented an insignificant part of the rates measured on the whole organisms (less than 1 %). Accordingly, shell did not influence the excretion responses when considering the whole organism.

Filtration

Numerous environmental variables can influence the feeding process in suspension-filter organisms (Chaparro *et al.* 2008). Filtration rates measured in small and large *C. fornicata* ranged maximum feeding rate calculated by Newell and Kofoed (1977b) in *C. fornicata* between 11 and 20°C (18 to 41 $\text{mL g}^{-1} \text{min}^{-1}$; 15°C acclimated individuals). Rates were higher in small than in large individuals as small organisms feed more actively when normalized to the body mass (Sylvester *et al.* 2005). Filtration rates in small individuals were constant between 10 and 16°C and increased only at 19°C. In the large ones they increased regularly with the temperature. This positive response to temperature has already been observed in *C. fornicata* (Newell & Kofoed 1977b) and other mollusc species (Schulte 1975; Sylvester *et al.* 2005). In Calyptraeidae, small individuals which are males slightly mobile are dependent on both feeding strategies, grazing with radula and filtration with gills (Navarro & Chaparro 2002). Small individuals may have supplemented their diet between 10 and 16°C by relying on grazing mechanism. When energetics requirements increased with the temperature at 19°C, they might increase their filtration rate to fulfill them. In large sedentary individuals

(usually females), filtration is the only feeding mechanism (Navarro & Chaparro 2002) and increased with temperature likely to cover increasing needs of energetic inputs.

Conversely to temperature, $p\text{CO}_2$ did not impact the filtration rates of both small and large *C. fornicata*. The lack of $p\text{CO}_2$ effect on filtration rate has ever been shown in juvenile *Mytilus galloprovincialis* (Fernandez-Reiriz *et al.* 2012) but is not a generality. For example, filtration process was slightly increased in the pearl oyster *Pinctada fucata* (Liu & He 2012) but in most of the species studied so far, filtration process was reduced under elevated $p\text{CO}_2$ due to general metabolic depression (Fernandez-Reiriz *et al.* 2011; Liu & He 2012; Navarro *et al.* 2013). There was no interactive effect of temperature and $p\text{CO}_2$ on the feeding rate of *C. fornicata* study and to our knowledge, such interaction has never been investigated for feeding rates in adults of marine molluscs.

As filtration rates did not change with $p\text{CO}_2$, food quantity ingested by *C. fornicata* organisms did not vary among the different pH conditions. However, food quality is known to interact with other stressors such as $p\text{CO}_2$ to significantly influence metabolic responses (Melzner *et al.* 2011). Changes in diet have been shown to worsen the condition of invertebrates (Berge *et al.* 2006; Vargas *et al.* 2013) and our algal mix did not correspond to the natural diversified diet of *C. fornicata* (Barille *et al.* 2006; Decottignies *et al.* 2007b). This suboptimal diet may have decreased conditions indices along the experiment at the expense of lipid and glycogen store (Dickinson *et al.* 2012). However, these changes did not impact *C. fornicata* metabolism as control respiration where stable over time. Moreover, *C. fornicata* respiration and excretion rates measured here were within the range of those measured *in situ* (Martin *et al.* 2006b) indicating that experimental specimens had metabolic rates close to those of wild specimens. This suggests that *C. fornicata* were in good health and that metabolic responses were not biased by a food or a mesocosm culture effect.

Calcification

The shell production of molluscs is an important process as calcified structures permit to support their living tissues and protect themselves against predators. Net calcification was mostly impacted by high $p\text{CO}_2$ relative to other processes which were more affected by temperature. In our study, net calcification of whole organisms was similar between 390 and 750 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$ and strongly decreased at 1400 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$ in both sizes. Interestingly, the study of Ries *et al.* (2009) showed a parabolic response in *C. fornicata* calcification with the highest rates observed at 600 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$. Decrease in net calcification under high $p\text{CO}_2$ is

however a common response in molluscs (Gazeau *et al.* 2007; Ries *et al.* 2009; Beniash *et al.* 2010; Nienhuis *et al.* 2010; Range *et al.* 2011; Waldbusser *et al.* 2011; Melatunan *et al.* 2013). The lack of change in calcification at 750 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$ may be due to a biological control of the calcification process and/or the presence of the periostracum, an organic layer covering the crystalline layers of the shell. It has been predicted to have a great role in maintaining the shell integrity of mollusc in elevated $p\text{CO}_2$ conditions (Ries *et al.* 2009) and prevent shell from dissolution in unsaturated waters (Huning *et al.* 2013). At 1400 μatm calcification rates dropped maybe because of physiological changes to internal acid-base balance affecting shell deposition (Waldbusser *et al.* 2011) or eroded and damaged periostracum (pers. obs.). Degradation of this protective layer may have led to a higher vulnerability of the shell to external dissolution process (Ries *et al.* 2009; Range *et al.* 2012) which need to be quantified to understand the real effects of elevated $p\text{CO}_2$ on calcification (Findlay *et al.* 2009; Nienhuis *et al.* 2010; Andersson & Mackenzie 2011).

In *C. fornicata* empty shell, dissolution was recorded in all the crossed condition of temperature and $p\text{CO}_2$. It increased with the increase in $p\text{CO}_2$ and the correlated decrease in Ω . From a purely physico-chemical standpoint, CaCO_3 starts to dissolve spontaneously when saturation state of seawater (Ω) is lower than 1 (Millero 2007). At a constant $p\text{CO}_2$, elevated temperature increased Ω , which is likely to lower dissolution under 19°C. However, dissolution is not only a pure chemical phenomenon and biotic erosion of microborers shown in *C. fornicata* shells (pers. obs.) may have actively influenced the recorded rates by worsening the dissolution rate of shells. Indeed, activity of *C. celata* and euendoliths organisms (Golubic *et al.* 1981; Tribollet 2008), which dissolve carbonates by active erosion has been shown to increase under elevated $p\text{CO}_2$ (Tribollet *et al.* 2009; Duckworth & Peterson 2013). Harper (2000) pointed out that dissolution was not the fact of dead shells only but shell losses also occurred in living animals. Nevertheless, comparisons between shell deposition of living animals (gross calcification) and shell dissolution of empty dead shells are unable to infer the relative contribution of these two processes as low-pH waters induce dissolution in the inner and outer part of the shells (Nienhuis *et al.* 2010; Melzner *et al.* 2011).

We compared here net and gross calcification rates to investigate the ability of *C. fornicata* to precipitate CaCO_3 under elevated $p\text{CO}_2$. Interestingly, gross calcification of small *C. fornicata* followed a negative trend reaching net dissolution at 1400 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$ and 13°C. Calcification is a costly phenomenon and resource reallocation in small individuals which have high growth rate might head energy towards somatic growth at the expense of calcification process and its regulative mechanisms (Dickinson *et al.* 2012). In large

individuals, $p\text{CO}_2$ did not impact gross calcification which was positive regardless of the $p\text{CO}_2$ and temperature conditions. This suggested that large individuals were able to calcify under all $p\text{CO}_2$ treatment, even in unsaturated waters. Mollusc may be able to maintain extrapallial fluid in chemical conditions favoring CaCO_3 precipitation at the calcification site even if external $p\text{CO}_2$ seawater is high (Hiebenthal *et al.* 2012). Furthermore, regulation of the enzymes production involved in calcification process as chitinase (Cummings *et al.* 2011) or carbonic anhydrase (Ivanina *et al.* 2013) likely permitted to maintain calcification under elevated $p\text{CO}_2$ conditions. Nevertheless gross calcification rates were lower at 1400 μatm than in the other $p\text{CO}_2$ conditions even if it was non-significant. This calcification decrease was correlated with the increase in respiration and excretion of soft body tissues, reflecting higher cost of basal maintenance. This metabolism increase may supply more energy to carry on calcification in unfavorable acido-basic conditions but may also be an acid-base regulating mechanism to lower the impacts of internal acidosis by contributing to proton removal (Boron 2004; Thomsen & Melzner 2010).

According to our results, the net dissolution and decreased calcification rates observed on both small and large *C. fornicata* individuals could mainly be due to external shell dissolution induced by decreased Ω_{Ar} rather than reduced production of new shell material. These results lead to reappraise the general sensitivity of mollusc to high $p\text{CO}_2$ and highlight the need to investigate net versus gross calcification and dissolution in a context of ocean acidification (Andersson & Mackenzie 2011).

Extrapolation to C. fornicata populations

Metabolic fluxes extrapolated at the population level under current $p\text{CO}_2$ (390 μatm) ranged within those measured *in situ* in the Bay of Brest by Martin *et al.* (2006b) for carbon (289 $\text{g C m}^{-2} \text{y}^{-1}$), nitrogen (26 $\text{g N m}^{-2} \text{y}^{-1}$) and CaCO_3 (515 $\text{g CaCO}_3 \text{m}^{-2} \text{y}^{-1}$) fluxes. As a key engineer species, dense *C. fornicata* populations structure the benthic communities of some bays where it is established (e.g. Bay of Brest; (Hily 1991; Blanchard 1995). Therefore, individual changes in respiration, excretion and calcification rates in *C. fornicata* in a context of high $p\text{CO}_2$ may affect the carbon, carbonate and nutrient fluxes of the ecosystems by changing the impact of the benthic community on the whole system.

Under 750 μatm , the most realistic scenario for the end of the century, respiration and calcification may be reduced by 12 and 63 %, respectively, from current $p\text{CO}_2$. These drops correspond to a global 18 % decrease of CO_2 emission, considering the ratio of CO_2 released

to CaCO₃ precipitated during calcification equal to 0.7 under our latitudes (Frankignoulle & Canon 1994; Davoult *et al.* 2009). Thus, a significant part of the carbon released by respiration and calcification of *C. fornicata* populations in the water column and consequently to the atmosphere is likely to decrease under future high pCO₂ condition leading to a less heterotrophic system.

As CO₂ emissions are rising quicker than expected, the 1400 µatm pCO₂ level predicted for 2300 (Caldeira & Wickett 2003) may occur earlier (Raupach *et al.* 2007) and is even relevant into the present and future of estuaries and coastal zones (Beniash *et al.* 2010). In this climate conditions, respiration at the population level may only decrease for 2 % compared to current condition while carbonate production is expected to drop by 300 %, reaching a net dissolution balance of -900 g CaCO₃ m⁻² y⁻¹ for a density of 1700 individuals m⁻². These processes might lead to a 21 % decrease of CO₂ fluxes impacting the ecosystem carbon production. In another way, the 13 % increase in excretion fluxes may enhance the nutrient concentration and the subsequent productivity of phytoplankton. Respiration and excretion by *C. fornicata* may be considered as the major factors that can divert carbon and nitrogen primary production from planktonic to benthic food webs. As ammonium regeneration in coastal zones is an important mechanism that may regulate primary production and secondary productivity, enhanced nitrogen excretion could potentially increase eutrophication and promote phytoplankton growth, organic matter sedimentation, microbial decomposition, and hypoxic events. The potential net dissolution balance of *C. fornicata* reefs may act in the future as a carbonate pump which would regenerate alkalinity (Andersson *et al.* 2009) and potentially elevate the CaCO₃ saturation state of the site, providing better local chemical condition in a context of ocean acidification as shown on oyster reefs in Chesapeake Bay (Waldbusser *et al.* 2013a; Waldbusser & Salisbury 2013).

Conclusions

Tolerance of invasive species to environmental stress is often greater than the one of native species which makes them strong competitors in the ecosystem where they are introduced (Lenz *et al.* 2011). On the Northwestern French coast, the invasive species *C. fornicata* is mainly in spatial competition with the maerl (*Lithothamnion corallioides*) a coralline alga forming large beds (Grall & Hall-Spencer 2003) and the scallop *Pecten maximus* (Thouzeau *et al.* 2000). Calcification rates of *L. corallioides* have been shown to be strongly affected by increasing pCO₂ (Noisette *et al.* 2013b) and *P. maximus* performances

capacity are reduced in low pH (Schalkhauser *et al.* 2012; Andersen *et al.* 2013) in comparison to *C. fornicata*, likely making the previous invasive species a better competitor than the two other native species. A growing body of evidence showed that invasive species are more resistant to change than their native competitors and future climate change could thus favor them as “winners” of coastal ecosystems (Somero 2010).

Monospecific studies give valuable insights to explore the physiology and specific responses of species of interest such as ecosystem engineer (Clark *et al.* 2013). The physiological responses measured at the organism’s level can show resistance mechanism which can be masked at a community level. The capacity of *C. fornicata* to calcify even under unsaturated conditions is not obvious when fluxes extrapolated to the population showed a 300 % carbonate production decrease. The benthic communities dominated by this high competitive species are likely to influence the biogeochemical fluxes of the ecosystems in a future context of ocean acidification by favoring CO₂ fixation in coastal zone. Especially in coastal zones, numerous factors as hypoxia, salinity changes, nutrients inputs or thermic events occur simultaneously (Waldbusser & Salisbury 2013). Trade-off between other stressors may affect responses of organisms in an unexpected way and impact all the life history of the animal. Nowadays, studies investigating the effects of multistressors to understand the future of coastal ecosystems are needed, particularly at a community level where interactions between abiotic and biotic factors can define the future “winners” and “losers” of the future ocean.

4. Mesures de pH extracellulaire à différentes $p\text{CO}_2$

Compte tenu des capacités de tolérance des crépidules adultes face à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$, des mesures de pH extracellulaire dans l'hémolymphe et dans le fluide extrapalléal ont été réalisées afin d'avoir une idée des capacités de régulation de l'équilibre acide-base chez cette espèce.

Les premières mesures ont été faites fin juin 2012 sur des individus acclimatés depuis 6 mois à différentes conditions de $p\text{CO}_2$, 390, 750 et 1400 μatm , à une température de 19°C (cf article n°4). La deuxième série de mesures (avril 2013) a été faite sur des crépidules adultes maintenues deux jours dans des conditions de $p\text{CO}_2$ similaires au premier jeu de données, à une température de 18,5°C. Après séchage des crépidules avec du papier absorbant, l'hémolymphe a été prélevée directement dans le pied et le fluide extrapalléal dans l'espace entre le manteau et la coquille de la crépidule, tous deux avec des seringues de 1 mL. Les mesures de pH_{NBS} ont été réalisées avec un pH-mètre (826 pH mobile, Metrohm AG, Herisau, Switzerland) sur des échantillons regroupant les fluides de 5 à 6 individus par condition de $p\text{CO}_2$.

Les différentes mesures de pH extracellulaire en fonction du pH de l'eau de mer sont présentées sur la figure II2-5. Chez les crépidules ayant passé seulement deux jours dans des conditions de $p\text{CO}_2$ élevées, aucune relation entre le pH de l'hémolymphe ou extrapalléal et le pH de l'eau de mer n'est significative. Quelle que soit la condition de $p\text{CO}_2$, le pH_{NBS} de l'hémolymphe est en moyenne égal à $8,60 \pm 0,03$ (SE) et le pH extrapalléal est de $8,28 \pm 0,02$, soit des valeurs plus élevées que celles de l'eau de mer environnante. Chez les crépidules ayant été acclimatées 6 mois aux différentes conditions de $p\text{CO}_2$, seul le pH de l'hémolymphe a été mesuré. Ce pH diminue avec la diminution du pH de l'eau de mer selon une relation linéaire significative ($p = 0,024$). Les pH_{NBS} mesurés dans l'hémolymphe ont des valeurs égales à 8,58, 8,45 et 8,35 dans des conditions de pH_{NBS} d'eau de mer respectives de 8,18, 7,88 et 7,37.

Ces mesures montrent que, quelle que soit la condition de pH de l'eau de mer environnante, les crépidules sont capables de maintenir le pH de leur hémolymphe à des valeurs bien supérieures. C'est aussi le cas pour le pH du fluide extrapalléal même si celui-ci n'est pas régulé de manière aussi importante. Ces valeurs de pH élevées, potentiellement maintenues grâce à des mécanismes de régulation acido-basique très efficaces, permettraient

de maintenir les taux physiologiques optimaux quelle que soit la $p\text{CO}_2$ externe et d'avoir une calcification active même sous conditions de $\Omega < 1$.

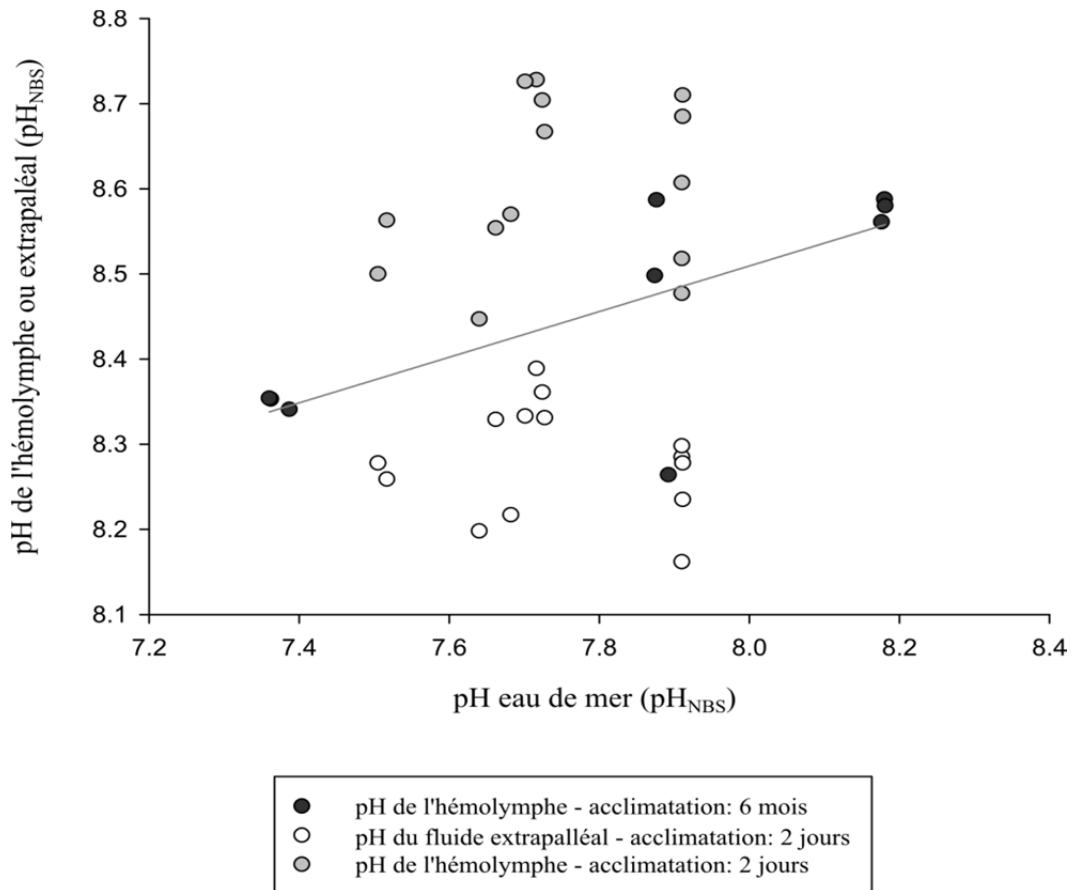


Figure II2-5: Mesures de pH_{NBS} dans l'hémolymphe et le fluide extrapalléal de crépidules acclimatées à différentes conditions de $p\text{CO}_2$ sur 6 mois (points noirs) ou 2 jours (points gris et blancs).

La durée d'exposition des organismes semble jouer un rôle important dans la régulation de l'équilibre acide-base. En effet, les crépidules exposées seulement deux jours à des conditions de $p\text{CO}_2$ élevées ne présentent pas de difficultés à maintenir un pH constant quelle que soit le pH de l'eau de mer (aucune relation significative d'augmentation ou de diminution). En revanche, les crépidules exposées six mois montrent une diminution significative du pH interne avec la diminution du pH de l'eau de mer (droite de régression, $R^2 = 0,54$, $p = 0,023$). Cette réponse mettrait en évidence que la régulation acide-base est un processus coûteux en énergie et que, plus les conditions de stress augmentent, plus il est

difficile de réguler le pH interne sur du long terme. Il faut cependant prendre ces résultats avec précautions car la gamme de pH de l'eau de mer appliquée durant les deux jours d'acclimatation (7,51 – 7,91) est plus réduite que celle dans laquelle ont été maintenues les crépidules six mois (7,36 – 8,18), ce qui peut biaiser les réponses mesurées. Une étude plus approfondie du pH interne des crépidules dans des conditions de $p\text{CO}_2$ élevées permettraient de mieux comprendre leurs capacités de régulation acide-base et leur résistance dans un contexte d'AO.

Chapitre 3 : Impact de l'acidification des océans sur les jeunes stades de vie de la crépidule

1. Etat de l'art sur l'impact de l'AO sur les jeunes stades de vie des mollusques

Les jeunes stades de vie (embryons, larves, juvéniles), et notamment les larves planctoniques, sont considérés comme très importants dans la dynamique de population d'une espèce. En effet, la phase larvaire représente une phase dispersive importante permettant de coloniser de nouveaux milieux et d'assurer le renouvellement de l'espèce (Pechenik 1999). Or, les jeunes stades de vie sont souvent considérés comme plus sensibles aux variations des paramètres physico-chimiques que les adultes et particulièrement dans le contexte d'acidification des océans (Kurihara 2008; Ross *et al.* 2011). La plupart des mollusques (principalement chez les bivalves et gastéropodes) ont des cycles de vie benthopélagiques avec une phase adulte benthique et un ou plusieurs jeunes stades pélagiques. Deux revues récentes ont recensé les différentes études effectuées sur les phases les plus précoces des cycles de vie des mollusques (Gazeau *et al.* 2013; Parker *et al.* 2013), soulignant que la diminution de pH affecte fortement la survie, la croissance et le développement de nombreuses larves de mollusques (Figure II3-1) alors que la fécondation est un phénomène peu impacté par l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ (Byrne 2011). Ces effets négatifs de l'AO sur les jeunes stades de vie des mollusques modifieraient la dynamique de population de ces espèces.

L'exposition à une $p\text{CO}_2$ élevée de certains stades de vie comme les larves peut avoir un "effet mémoire" sur les phases suivantes du cycle de vie, impactant le recrutement et la survie des juvéniles puis des adultes, pouvant créer des goulets d'étranglement des populations et fortement impacter la dynamique de population d'une espèce (Dupont *et al.* 2010a; Ross *et al.* 2011). Dans de nombreuses études testant l'effet de l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ sur les phases larvaires, les géniteurs ne sont pas acclimatés aux différentes conditions de $p\text{CO}_2$ et la fécondation des embryons a lieu dans des conditions différentes de celles de leur développement. De telles études ne prennent donc pas en compte les effets positifs ou négatifs de transmission de caractères que peuvent avoir les stades de développement les uns sur les autres. Pourtant, plusieurs auteurs ont mis en évidence une modulation de la réponse à

la $p\text{CO}_2$ suivant l'impact de ces transmissions, qu'il y ait eu ou non une acclimatation préalable des géniteurs (Parker *et al.* 2010; Dupont *et al.* 2012; Vehmaa *et al.* 2012). Ils soulignent l'importance d'étudier le développement de plusieurs stades de vie successifs et si possible de générations d'une même espèce pour déterminer la réponse des organismes face à la $p\text{CO}_2$ dans un contexte futur d'acidification des océans.

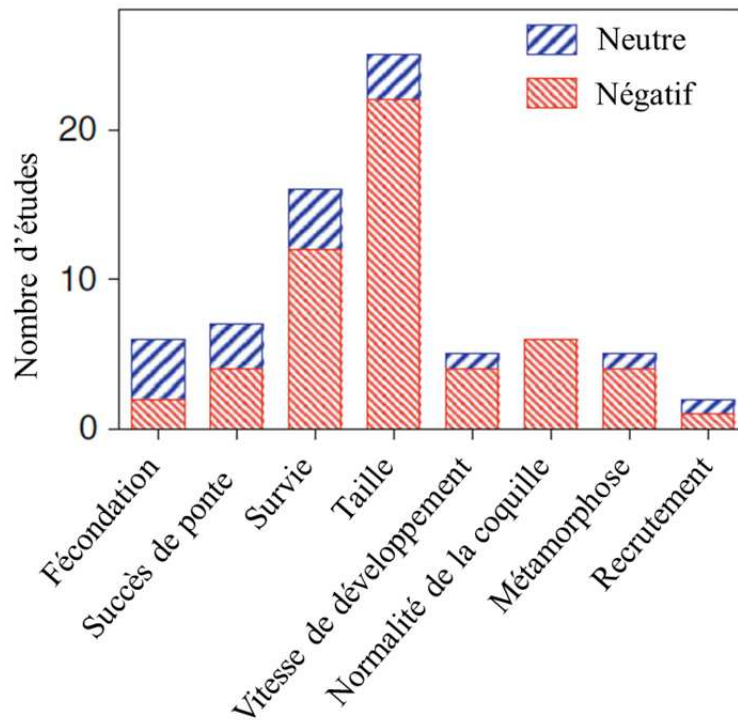


Figure II3-1: Résumé des impacts de l'AO sur la fécondation et le développement larvaire des bivalves et gastéropodes dans les études considérant une diminution de pH inférieure ou égale à 0,4 unités. D'après Gazeau *et al.* (2013).

2. Impact de l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ sur la coquille durant le développement embryonnaire de la crépidule

2.1 Contexte général

Il existe chez les invertébrés marins différentes stratégies quant au développement des jeunes stades de vie. Alors que la majorité des espèces émettent leurs gamètes dans la colonne d'eau où a lieu la fécondation et la vie larvaire par la suite, d'autres espèces choisissent de protéger les premiers stades de développement de leur descendants. La protection peut être réalisée par différents moyens : les embryons sont couvés par les parents (mère, père ou les deux), ils peuvent être encapsulés dans un cocon protecteur (capsules ou masse) puis déposés dans le milieu environnant ou encore les capsules protégeant les embryons peuvent être incubées par les géniteurs (Figure II3-2) (Pechenik 1986). Les capsules sont particulièrement reconnues pour leur rôle très protecteur face aux stress environnementaux (Przeslawski 2004) mais peu de choses sont encore connues quant aux variations physico-chimiques qui peuvent se passer à l'intérieur (Pechenik 1983; Brante *et al.* 2008; Maeda-Martinez 2008). Différents auteurs ont émis l'hypothèse que le milieu intracapsulaire pourrait tamponner les effets de l'acidification des océans et préserver les embryons de la diminution du pH de l'eau de mer (Allen 2012; Fernandes & Podolsky 2012). Les embryons encapsulés seraient donc moins impactés par l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ donnant des larves moins affectés que celles issues de la fécondation dans la colonne d'eau.

La crépidule présente l'originalité d'encapsuler et de couvrir ses embryons jusqu'à ce qu'ils deviennent des larves véligères (Figure II3-2), stade auxquelles les larves sont émises dans la masse d'eau (voir chapitre 1 de cette partie). L'exposition de ces deux stades aux stress abiotiques est très différente puisque la capsule est censée conférer une protection à l'embryon (Przeslawski 2004) alors que la larve est directement soumise aux facteurs environnementaux (Pechenik 1999).

Les effets de l'acidification des océans ont été étudiés dans un premier temps sur des larves véligères juste émises dans le milieu, provenant de parents acclimatés depuis plusieurs semaines à différents scénarios d'augmentation de la $p\text{CO}_2$. Des paramètres biométriques ainsi que l'étude du niveau de calcification de la coquille ont permis d'observer les effets de

l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ intégrés sur tout le développement embryonnaire intracapsulaire afin de voir si la capsule a un rôle protecteur dans un contexte d'acidification des océans.

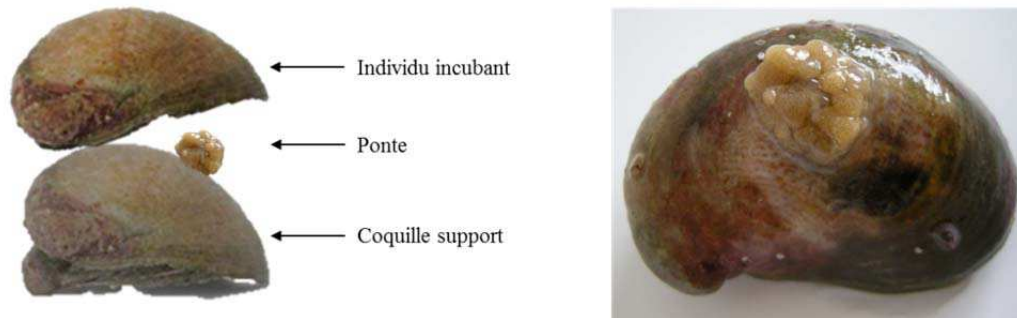


Figure II3-2: Localisation des pontes de crépidules composées de plusieurs capsules contenant les embryons et attachées sur la coquille de l'individu sous la femelle.

2.2 Résumé de l'article n°5

Durant l'expérimentation relatée dans l'article n°4, les adultes maintenus en mésocosme ont produit des larves dès que l'eau a été augmentée au-dessus de 10°C comme c'est le cas *in situ* (Rigal 2009). Ces larves ont été récupérées dès leur émission dans les aquariums dans lesquels elles ont été produites aux différentes conditions de $p\text{CO}_2$ et température puis fixées à l'alcool à 96 %. Après tri des échantillons, seules 12 pontes ont pu être analysées, les autres présentant trop peu de larves avec une coquille intacte (Tableau II3-1). Aucune ponte n'a été gardée à 16°C.

Chaque ponte a été sous échantillonnée afin d'obtenir pour chacune d'entre elle un effectif de larves à coquille intacte compris entre 20 et 40 individus. Différents paramètres biométriques tels que la longueur de la coquille, sa hauteur ou encore l'aire de la surface gauche ont ensuite été mesurés sur chaque larve par traitement d'image, sur des photos prises sous loupe binoculaire. Les anomalies de formation de la coquille ont aussi été recensées et leur intensité a été évaluée à partir de la création d'un indice de difformité. Enfin, les degrés de calcification de la coquille dans les deux conditions de $p\text{CO}_2$ ont été estimés à partir de l'intensité de la biréfringence observée sur les coquilles sous lumière polarisée.

Table II3-1: Récapitulatif des pontes analysées dans l'article 5 sur l'impact de l'AO sur les embryons encapsulés de *C. fornicata*

	390 μatm	750 μatm	1400 μatm
13°C	Ech n°12	Ech n°13	Ech n°10
	Ech n°15		Ech n°11
	Ech n°16		
19°C	Ech n°36	Ech n°38	Ech n°39
	Ech n°44	Ech n°45	Ech n°46

Alors qu'aucune différence significative des paramètres biométriques n'a pu être observée entre les conditions 390 et 750 μatm (toutes températures confondues), la longueur et l'aire des coquilles larvaires ont diminué de 8 et 16 %, respectivement, dans la condition de $p\text{CO}_2$ la plus élevée (1400 μatm). Le taux d'anomalies a en revanche été multiplié par 2 dans la condition 750 μatm et par 5 à 1400 μatm par rapport à la condition témoin. Enfin l'intensité de biréfringence, utilisée comme proxy de calcification, a fortement diminué avec l'augmentation de la $p\text{CO}_2$. Ces effets négatifs montrent que la capsule ne permet pas de protéger les embryons de l'acidification des océans. Les larves pourraient être affectées par une acidose du fluide intracapsulaire induit par l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ du milieu environnant. Cependant, les larves de crépidules semblent être moins impactées par la diminution du pH que les autres larves de mollusques étudiées peut-être grâce à de grandes capacités de régulation renforçant la résistance de cette espèce.

Article n° 5

Does encapsulation protect embryos from the effects of ocean acidification? The exemple of *Crepidula fornicata*

Fanny Noisette, Thierry Comtet, Erwann Legrand, François Bordeyne, Dominique Davoult,
Sophie Martin

CNRS, UMR 7144

Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29688 Roscoff Cedex, France

UPMC Univ. Paris 6, UMR 7144

Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29688 Roscoff Cedex, France

Soumis dans *Plos One*

Abstract

Early life history stages of marine organisms are generally considered more sensitive to environmental stress than adults. Although most marine invertebrates are broadcast spawners, some species brood and protect their embryos in egg capsules. This strategy is typically assumed to confer greater safety and protection of embryos even if little is known on the physico-chemical conditions occurring within egg capsules. In the context of ocean acidification, the protective role of encapsulation remains to be investigated. To answer this question, we conducted experiments on the gastropod *Crepidula fornicata*. This species broods its embryos within capsules located under the female, before releasing veliger larvae in the water column. *C. fornicata* adults were conditioned in current (390 μatm) and elevated (750 and 1400 μatm) $p\text{CO}_2$ treatments so that released larvae achieved the whole development at a given $p\text{CO}_2$ from fertilization. The $p\text{CO}_2$ effects on the shell

morphology, the frequency of abnormalities and the calcification level were investigated on released larvae. The shell length decreased by 8% and the shell area by 16% at elevated $p\text{CO}_2$ (1400 μatm). In comparison to 390 μatm $p\text{CO}_2$, the percentage of abnormalities was 2- to 5-fold higher at 750 μatm and 1400 μatm $p\text{CO}_2$, respectively. The intensity of birefringence, used as a proxy of calcification of the larval shell, also decreased with increasing $p\text{CO}_2$. These negative results are likely explained by the enhancement of the intracapsular acidosis due to elevated $p\text{CO}_2$ of extracapsular seawater. The encapsulation of *C. fornicata* embryos did not protect them against the deleterious effects of predicted $p\text{CO}_2$ increase. Nevertheless, *C. fornicata* larvae seemed less affected than other mollusc species. Further studies are needed to identify the potential tipping points of the life cycle of this species in an ocean acidification context.

Keywords: abnormalities, brooding, development, calcification, hypercapnia, $p\text{CO}_2$, shell morphology

Acknowledgments

The authors thank the “Marine Operations and Services Department” from the Station Biologique de Roscoff for the diving sampling. We also thank the “Multicellular Marine Models” team for microalgae provision and their help for building the rearing system. We are grateful to Stéphanie Auzoux-Bordenave and Nathalie Wessel for welcoming us at the Station de Biologie Marine de Concarneau and for their help in picture acquisition under polarized light. We finally thank Frédérique Viard and Thomas Broquet for the discussions at the different stages of this work. This work was supported by the CALCAO project, which received funding from the Region Bretagne, and contributed to the “European Project on Ocean Acidification” (EPOCA) funded by the European Community’s Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 211384. It was also supported by the Interreg IV a France (Channel) – England Marinexus project n°4073 funded by the FEDER programme.

Introduction

Early life history stages of marine species including embryos and larvae are of crucial importance in population dynamics as they ensure dispersion, colonization of new areas and sustainability of populations (Pechenik 1999). Their success in development and final recruitment are essential for the persistence of viable populations. Early stages of marine invertebrates are in general morphologically and ecologically distinct from the adults and considered more sensitive to environmental stress (Pechenik 1999), particularly to abiotic factors as temperature and salinity which are highly variable in near-shore waters (Deschaseaux *et al.* 2010). Currently, among factors which may affect early development, ocean acidification is of major importance. The CO₂ partial pressure ($p\text{CO}_2$) and calcium carbonate saturation state (Ω) are key abiotic factors controlling the physiology, the behavior and ultimately the distribution of marine invertebrates (Pörtner 2008; Widdicombe & Spicer 2008; Doney *et al.* 2009). Because of the increase in $p\text{CO}_2$ /decrease in pH and the drop in carbonate ion (CO_3^{2-}) concentration, ocean acidification is considered as a major threat to calcifying species by affecting physiological pathways and impairing their ability to build calcium carbonate shells and skeletons (Feely *et al.* 2004; Hoegh-Guldberg 2009; Kroeker *et al.* 2010; Byrne 2011). Early life stages (embryos, larvae and juveniles) of calcifying species are thus expected to be highly affected by ocean acidification (Kurihara 2008; Dupont & Thorndyke 2009) because of their fragile skeletons (Byrne 2011) and their high ratio of surface exposed to body mass as compared to adults (Bechmann *et al.* 2011). Identifying life history stages that are the most vulnerable to global change is needed to determine bottlenecks for species persistence and addressing questions of their sensitivities is a major issue in a changing ocean (Byrne 2011).

Responses to near-future levels of $p\text{CO}_2$ depend on species, populations, habitats and developmental stages (Ries *et al.* 2009; Dupont *et al.* 2010a; Byrne 2011; Range *et al.* 2012) and understanding these effects on the early life stages requires taking into account the complete developmental cycle from egg to juveniles (Dupont & Thorndyke 2009). In particular, the impacts of elevated $p\text{CO}_2$ /decreased pH on early life stages have been investigated in a broad range of species among various taxa, including corals (Chua *et al.* 2013; Putnam *et al.* 2013), echinoderms (Dupont *et al.* 2008; Martin *et al.* 2011; Padilla-Gamino *et al.* 2013), crustaceans (Egilsdottir *et al.* 2009; Bechmann *et al.* 2011; Pansch *et al.* 2013), molluscs (Gutowska & Melzner 2009; Gazeau *et al.* 2013), and fishes (Moran &

Stottrup 2011; Munday *et al.* 2011) with various responses. For example in molluscs, which have been studied intensively (Gazeau *et al.* 2013; Parker *et al.* 2013) for a review), deleterious effects of increased $p\text{CO}_2$ were evidenced on fertilization success (Parker *et al.* 2009; Barros *et al.* 2013), hatching success (Kimura *et al.* 2011; Li *et al.* 2013), larval survival (Crim *et al.* 2011; Davis *et al.* 2013) and growth (Talmage & Gobler 2009; Gaylord *et al.* 2011), shell formation (Kurihara *et al.* 2007; Gazeau *et al.* 2010), development duration (Ellis *et al.* 2009; Van Colen *et al.* 2012) and settlement (Byrne *et al.* 2010; Talmage & Gobler 2010).

Most of the species studied were broadcast spawners which may be considered particularly vulnerable to ocean acidification because fertilization and complete pelagic larval life occur in the water column (Byrne 2011; Ross *et al.* 2011). Whether alternative reproductive modes are affected in a changing ocean is still poorly documented. Brooding and/or egg laying in egg masses or capsules are typically assumed to confer protection to the developing embryos (Przeslawski 2004; Chaparro *et al.* 2009b). For example, it has been shown that encapsulated embryos of some gastropod species survived better to salinity stress than embryos removed from their capsule (Pechenik 1982; Pechenik 1983). Very few studies explored the effects of decreased pH on benthic egg masses or brooded larvae in molluscs (Chaparro *et al.* 2009a), in particular in gastropods (Ellis *et al.* 2009; Montory *et al.* 2009; Allen 2012; Davis *et al.* 2013). Encapsulation has been hypothesized to protect embryos against ocean acidification by Ellis *et al.* (2009) and Fernandes and Podolsky (2012) who proposed that the buffer capacity of intracapsular fluids may reduce the potential effect of extracapsular elevated $p\text{CO}_2$ seawater.

Native from the Northeast American coast, the slipper limpet *Crepidula fornicata*, Linné 1758 (Gastropoda) has been introduced in Europe at the end of the 19th century, mostly through oyster farming (Blanchard 1995), and has now become invasive in bays and estuaries where it reaches very high densities of up to several thousands of individuals per m^2 (Blanchard 1997). It has a benthic-pelagic life cycle, original by some points. Benthic adults form stacks with males at the top and females at the bottom. After internal fertilization, females brood their embryos in egg capsules during 3 to 4 weeks (Orton 1912; Brante *et al.* 2009). Capsules are protected between the neck and the propodium of the mother and attached to the substratum to which the female is fixed (Orton 1912). Each female spawns between 28 and 64 capsules, each of them containing 300 to 500 embryos (Brante *et al.* 2009). At the end of the capsular development, veliger larvae are released at a size of about 400 μm in length in the water column where they spend between 2 and 7 weeks (Pechenik 1984; Rigal 2009).

After reaching competence (800-1000 μm in length), larvae are able to metamorphose and settle on hard substrata (Pechenik 1984; Rigal 2009).

The objective of this work was to investigate the effects of near-future levels of $p\text{CO}_2$ on the development of *C. fornicata* embryos by studying the shell morphology and calcification level of released larvae. To ensure that the complete development from the egg to the released larvae occurred under high $p\text{CO}_2$, parents were previously conditioned to the different $p\text{CO}_2$ levels.

Methods

Crepidula fornicata adult collection and culture

C. fornicata stacks were collected by SCUBA divers on November, 30th 2011, after the end of the reproductive period (Richard *et al.* 2006) in the Morlaix Bay (Northwestern Brittany, France), at the “Barre des Flots” site (3°53.015'W; 48°40.015'N). They were transferred directly to the laboratory where they were kept in natural unfiltered seawater during 6 weeks at ambient temperature which decreased from 13.5 to 10°C over this period. Then, *C. fornicata* adults were distributed randomly into eighteen 10 L aquaria making up the experimental set up (adapted from Noisette *et al.* 2013b) and reared for 24 weeks (January, 12th 2012 to June, 28th 2012) in three $p\text{CO}_2$ treatments selected according to the recommendations of Barry *et al.* (2010): (i) 390 μatm ($\text{pH}_T = 8.07$) as the current $p\text{CO}_2$ (control), (ii) 750 μatm ($\text{pH}_T = 7.82$) as a $p\text{CO}_2$ predicted for the end of the century by the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (Solomon *et al.* 2007), and (iii) 1400 μatm ($\text{pH}_T = 7.56$) as a $p\text{CO}_2$ 5-fold higher than preindustrial $p\text{CO}_2$ (280 μatm) and predicted for 2300 (Caldeira & Wickett 2003). The $p\text{CO}_2$ was adjusted by bubbling CO_2 -free air (current control $p\text{CO}_2$) or pure CO_2 (elevated $p\text{CO}_2$ treatments) in three 100 L header tanks supplied with unfiltered seawater pumped in front of the Station Biologique de Roscoff. Each of the three $p\text{CO}_2$ treatments had six 10 L replicate aquaria. They continuously received CO_2 -treated seawater at a rate of 9 L h^{-1} (i.e. a renewal rate of 90% h^{-1}) from the mixing header tanks. The 18 aquaria were placed in thermostatic baths where temperature was controlled to within ± 0.2 °C using 150 to 250 W submersible heaters. *C. fornicata* adults were grown at four successive temperature levels: 10, 13, 16 and 19°C, which corresponded to the range of *in situ* temperatures typically encountered in our study area (Service d'Observation de la Mer

et du LITtoral data). Adults were reared for four weeks at each temperature level. Between two levels, temperature was increased slowly during two weeks by $0.2^{\circ}\text{C day}^{-1}$.

$p\text{CO}_2$ and temperature were monitored and controlled by an off-line feedback system (IKS Aquastar, Karlsbad, Germany) that regulated the addition of gas in the header tanks and the on/off heater switch in thermostatic bath. The pH values of the system were adjusted from daily measurements of pH on the total scale (pH_T) in the 18 aquaria using a pH meter (826 pH mobile, Metrohm AG, Herisau, Switzerland) calibrated using Tris/HCl and 2-aminopyridine/HCl buffers (Dickson *et al.* 2007). Slipper limpets were fed three times a week with a mix composed of stock solution of *Chaetoceros gracilis* ($\sim 15 \times 10^6$ cells mL^{-1}) and *Isochrysis affinis galbana* ($\sim 26 \times 10^6$ cells mL^{-1}). 400 mL of this algal mix were distributed in batch in each aquarium. Seawater flow was stopped for two hours for allow organism to feed.

Seawater parameters were monitored throughout the experiment. pH_T and temperature were recorded daily. Total alkalinity was measured every four weeks, by HCl 0.01N potentiometric titration on an automatic titrator (Titroline alpha, Schott SI Analytics, Mainz, Germany) on 20 mL seawater sampled in the different aquaria. Salinity was also measured every four weeks, at each temperature, with a conductimeter (LF 330/ SET, WTW, Weilheim, Germany) and varied between 34.2 ± 0.1 and 35.1 ± 0.1 over the course of the experiment. The carbonate chemistry of seawater, i.e. dissolved inorganic carbon (DIC), exact $p\text{CO}_2$ and saturation state of aragonite (Ω_{Ar}) were calculated at each $p\text{CO}_2$ and temperature treatment using the CO_2SYS software (Lewis & Wallace 1998) with constants of Mehrbach *et al.* (1973) refitted by Dickson and Millero (1987). Mean values of these parameters are presented in Table 1.

Larvae collection

In *C. fornicata*, at the end of the embryonic development, the capsule membrane split and veliger larvae are released in seawater. To prevent larvae released in different $p\text{CO}_2$ treatments from mixing, 200 μm mesh size nets closed the overflow outlet of each aquarium. Offspring presence was checked visually every day to collect larvae within up to 24 hours post-hatching. When present, larvae were collected by pouring aquarium seawater on a 200 μm mesh sieve, rinsed with seawater and preserved in 96 % ethanol.

Pools of larvae were collected in different crossed $p\text{CO}_2$ and temperature conditions between March, 19th and June, 24th 2011. Only samples with enough and unbroken larvae were used. No larvae were emitted at 10°C and the larvae collected at 16°C were not used

because of low number of unbroken larvae. At 13 and 19°C, a total of 12 samples were analyzed among the three $p\text{CO}_2$ treatments: 3, 1 and 2 samples at 390, 750, and 1400 μatm $p\text{CO}_2$, respectively at 13°C and 2 samples at each $p\text{CO}_2$ level at 19°C.

Table 1: Seawater parameters. Legend: Mean parameters of the carbonate chemistry in each $p\text{CO}_2$ treatment at each temperature level. The pH_T (pH on the total scale) was measured daily and total alkalinity (A_T) was measured every 4 weeks. Other parameters were calculated with the CO_2SYS software (Lewis & Wallace 1998). $p\text{CO}_2$: CO_2 partial pressure; DIC: Dissolved Inorganic Carbon; Ω_{Ar} : saturation state of aragonite

		Temperature		pH_T		$p\text{CO}_2$		A_T		DIC		Ω_{Ar}	
		(°C)				(μatm)		($\mu\text{Eq kg}^{-1}$)		($\mu\text{mol C kg}^{-1}$)			
	n (except A_T)	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
		10°C											
390 μatm	23	9.7	0.2	8.14	0.01	323	7	2365	2	2138	4	2.47	0.04
750 μatm	23	9.8	0.2	7.82	0.01	729	19	2369	2	2270	4	1.33	0.03
1400 μatm	23	9.5	0.2	7.55	0.03	1487	75	2377	3	2366	11	0.78	0.08
13°C													
390 μatm	27	12.9	0.2	8.12	0.02	356	25	2418	2	2167	8	2.76	0.07
750 μatm	27	13.0	0.1	7.81	0.01	781	20	2416	2	2304	3	1.48	0.03
1400 μatm	27	12.8	0.1	7.53	0.01	1557	43	2422	2	2405	4	0.82	0.02
16°C													
390 μatm	28	15.9	0.1	8.08	0.01	376	11	2379	5	2127	5	2.80	0.05
750 μatm	28	16.1	0.1	7.82	0.00	748	8	2369	5	2238	2	1.66	0.01
1400 μatm	28	16.0	0.1	7.55	0.01	1492	19	2380	5	2345	2	0.94	0.01
19°C													
390 μatm	23	18.4	0.5	8.02	0.01	550	10	2391	2	2152	5	2.70	0.05
750 μatm	23	18.6	0.5	7.77	0.01	858	19	2395	3	2266	4	1.68	0.04
1400 μatm	23	18.4	0.5	7.51	0.01	1652	41	2394	3	2359	4	0.96	0.03

Morphological measurements

Morphological measurements were performed on a random subsample of 40 larvae when possible or at least 20 larvae of each of the 12 larval pools. Larvae with unbroken shell were isolated in sterile flat bottom 96-well plates and preserved in pure glycerol following Auzoux-Bordenave *et al.* (2010). Each larva was placed on its right side and photographed under light microscopy using an Olympus Camedia C-7070 camera attached to an Olympus SZX 12 binocular microscope. Pictures were acquired without autofocus at a $\times 90$ magnification. Maximum length, height and projected area of the left side (Figure 1A, B, C, respectively) were measured by analyzing images with the ImageJ software (Rasband 2012), after calibration with a stage micrometer.

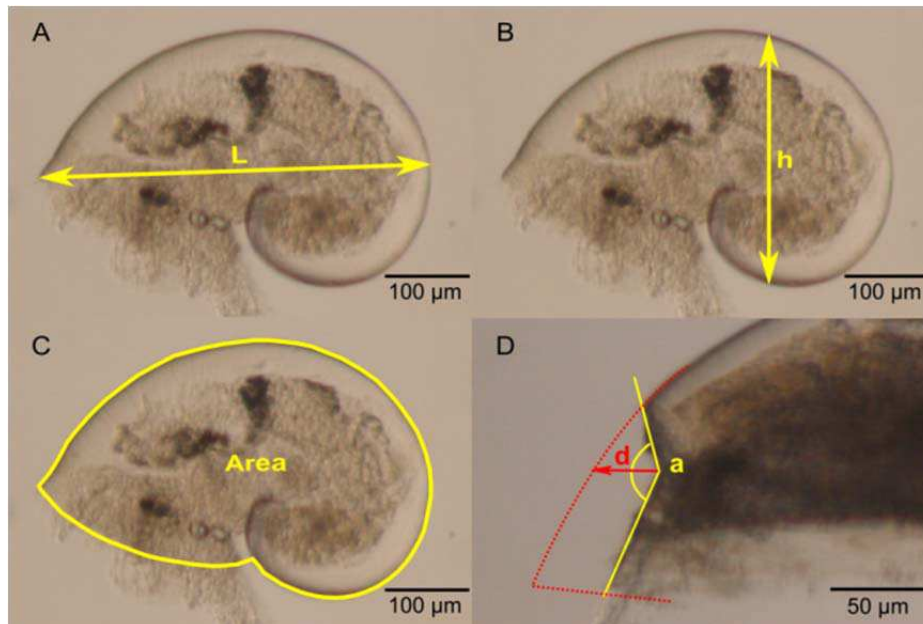


Figure 9: Morphological parameters. All the measurements were made on larvae lying on their right side. A: maximal length (L) of the shell (in μm); B: maximal height (h) of the shell (in μm); C: projected area of the left side (in mm^2); D: deformity index, a is the angle of the abnormality (in degree) and d, the depth of the abnormality (in μm).

Abnormalities

In each subsample (see above), veliger larvae with abnormal shell were counted. Percentage of abnormal larvae was estimated per $p\text{CO}_2$ treatment by grouping subsamples from the two temperatures levels due to the few number of samples. A “deformity index” was

calculated to quantify the intensity of the shell deformity. It was defined as the ratio between the angle formed by the abnormality and its “depth”, which is the distance between the theoretical curve of the shell and the forest point of the deformity (Figure 1D).

Shell calcification

8 to 12 larvae per $p\text{CO}_2$ treatment, randomly chosen among the previous subsamples, were observed under polarized light microscopy to ascertain birefringence patterns using an Olympus binocular microscope equipped with polarizing filters. All polarized images were acquired with an Olympus camera at $\times 100$ magnification with 40 ms light exposition. Birefringence under polarized light is due to the mineral phase composing the shell (Weiss *et al.* 2002; Kurihara *et al.* 2007; Auzoux-Bordenave *et al.* 2010). In the absence of mineralized structure, there is no birefringence and the picture looks totally black. Under identical light conditions, areas appearing more birefringent are expected to contain a much larger proportion of crystalline calcium carbonate (Weiss *et al.* 2002). The intensity of birefringence of each shell was used as a calcification level proxy in the different $p\text{CO}_2$ treatments. It was quantified from pictures by using the ImageJ software (Rasband 2012). Pictures of polarized shells were first transformed in images in greyscale. A mean grey value (in pixel) was determined for each birefringent zone. All the birefringent zones of the shell were compiled to obtain a global mean grey value giving the intensity of the birefringence of the whole shell.

Statistics

All statistical analyses were performed using the free software R 2.15.0 version (R Core Team 2013). Normality and homoscedasticity of the data were first checked using the Shapiro and Levene tests, respectively. Because of the non-normality, variance heterogeneity and unbalanced design, morphological parameters were analyzed for each temperature separately (at 13 and 19°C), using the non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test (Zar 1974). Because of the low number of replicates, samples for deformity index and birefringence intensity were pooled among temperature levels for each $p\text{CO}_2$ treatment. The effect of $p\text{CO}_2$ on these parameters was then analyzed using the Kruskal-Wallis test and the Dunn's post hoc test.

Results

Morphological parameters

$p\text{CO}_2$ significantly impacted length, height and area of the hatched larvae at both temperature levels (Figure 2, Table 2). These morphological parameters are related to each other and were generally affected in the same way by $p\text{CO}_2$. At 13°C, length, height and area were all higher at 750 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$ than at 390 and 1400 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$. Larvae collected at 1400 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$ showed a decrease of 11 %, in length, 13 % in height and 20 % in area as compared to control larvae (390 μatm). At 19°C, trends were different. Length and height were the highest at 390 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$ and showed a similar decrease of ca. 5 % at both 750 and 1400 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$. The highest value of shell area was observed at 390 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$, and then decreased by 6 and 11% at 750 and 1400 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$, respectively.

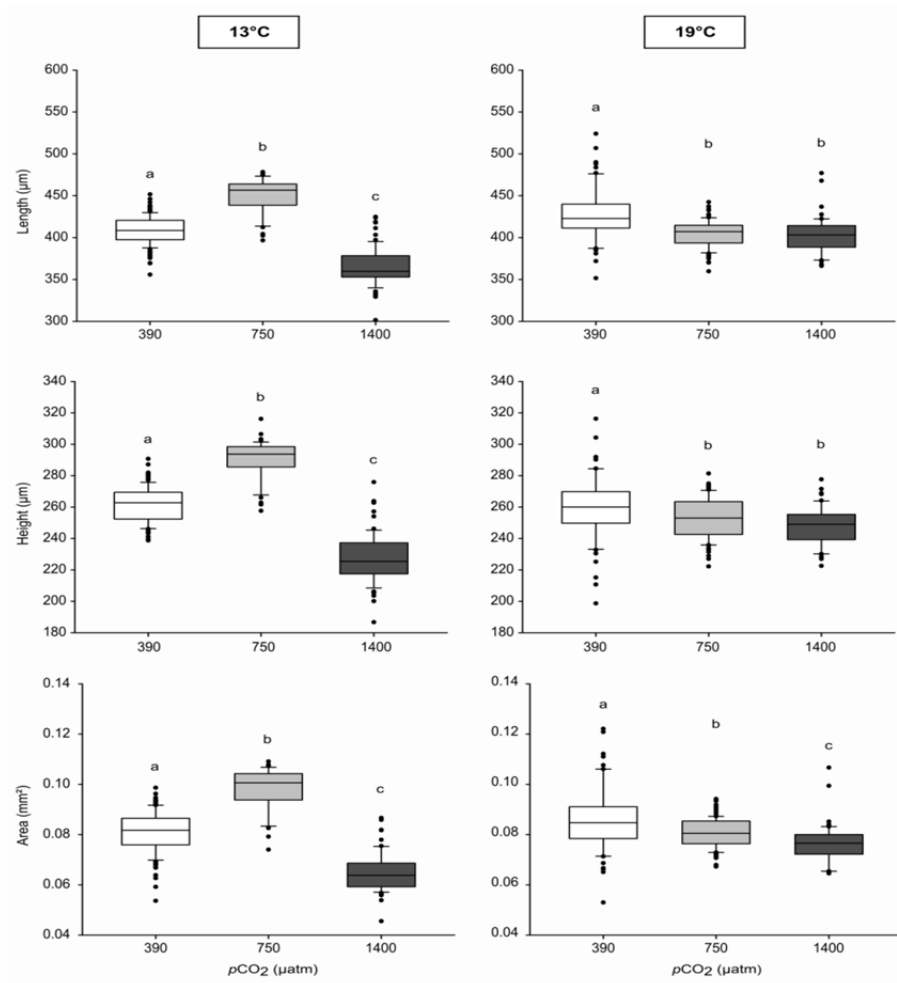


Figure 2: Morphological parameters. Boxplots of length, height and left area in the different $p\text{CO}_2$ treatments. Unshared letters above bars indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$, Dunn's post hoc test), $n = 46$ to 139.

Table 2: $p\text{CO}_2$ effect on morphological parameters. Summary of the Kruskal-Wallis tests testing the effect of $p\text{CO}_2$ on each morphological parameter, at each temperature separately.

	13°C			19°C	
	df	H	p	H	p
Length	2	171.25	<0.001	37.35	<0.001
Height	2	184.88	<0.001	16.36	<0.001
Area	2	168.48	<0.001	30.11	<0.001

Abnormalities

Abnormalities were observed in larvae in the form of notches located close to the shell aperture (Figure 3). The percentage of abnormal larvae increased with the $p\text{CO}_2$ ranging from 3 to 16 % (Table 3). Abnormalities were 2- and 5-fold more abundant at $p\text{CO}_2$ of 750 and 1400 μatm , respectively, than at 390 μatm . Furthermore, different intensities of shell abnormalities were observed with notches being more or less sharp. The deformity index varied between 0.02 (750 μatm $p\text{CO}_2$) and 0.17 (1400 μatm $p\text{CO}_2$) and was not significantly different between the different $p\text{CO}_2$ treatments (Kruskal-Wallis test, $df = 2$, $H = 2.761$, $p = 0.251$).

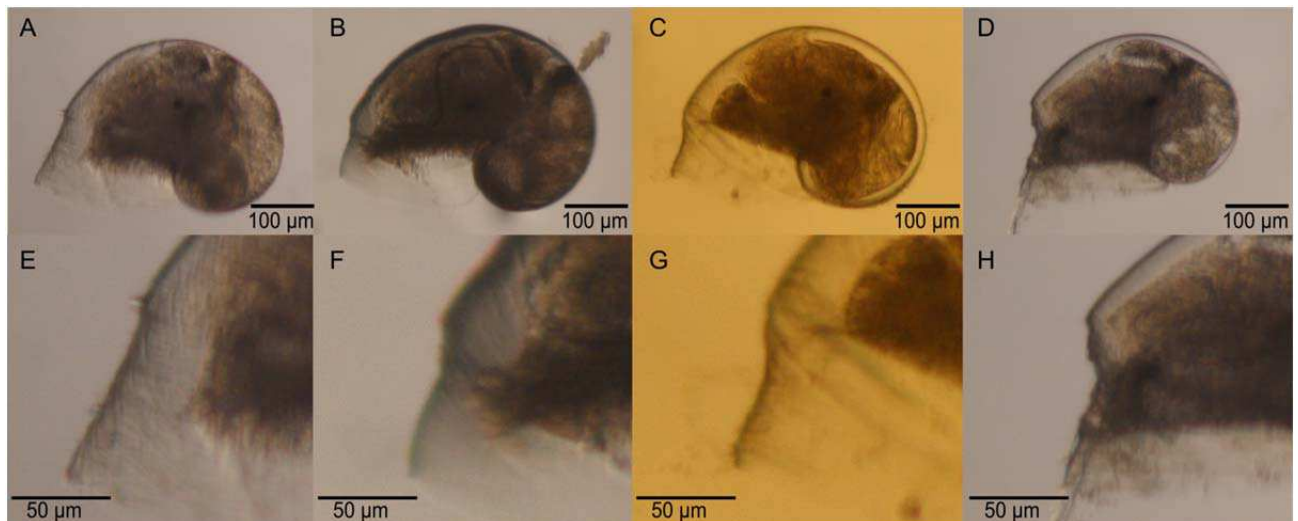


Figure 3 : Shell abnormalities. Different intensities of shell abnormalities observed among the samples. A, B, C, and D present the whole larvae, whereas E, F, G, and H show the detail of their respective abnormality.

Table 3: Percentages of abnormal larvae in each $p\text{CO}_2$ treatment

$p\text{CO}_2$ condition	390 μatm	750 μatm	1400 μatm
Total larvae observed	239	148	127
Total abnormal larvae	7	9	20
Percentage of abnormal larvae	2.93%	6.08%	15.75%

Among the larvae observed under polarized microscopy (see below), some of them presented deformities. These abnormalities appeared less birefringent, and even not calcified as revealed by the lack of birefringence in these parts of the shell (Figure 4).

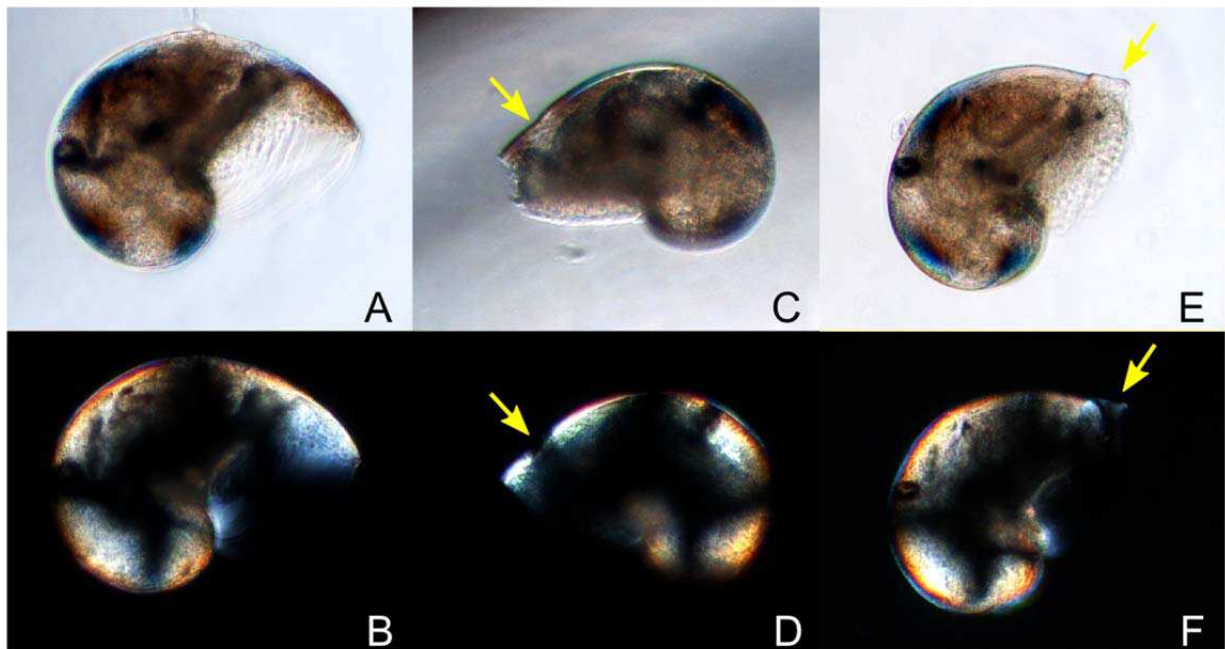


Figure 10: Shell abnormalities under normal (A, C, and E) and polarized (B, D, and F) light. A-B are pictures of a normal larva presenting the characteristic black cross of birefringence. C-D and E-F present different abnormalities observed among the samples, with arrows indicating less calcified zones

Shell calcification

Pictures taken under polarized light (Figure 5) suggested that the intensity of the birefringence decreased with the increase in $p\text{CO}_2$. The measure of birefringence intensity by using the mean grey values estimated for each shell clearly confirmed this observation (Kruskal-Wallis test, $df = 2$, $H = 21.685$, $p < 0.001$). Calcification was the highest at 390 μatm $p\text{CO}_2$, intermediate at 750 μatm $p\text{CO}_2$ and the lowest at 1400 μatm $p\text{CO}_2$ (Figure 5).

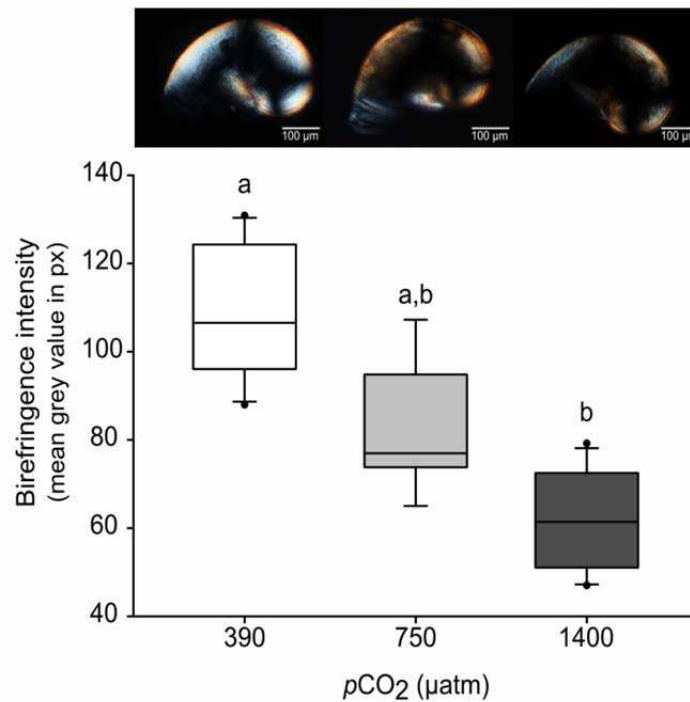


Figure 5: Birefringence intensity. Pictures under polarized light at the top present birefringent patterns in the different $p\text{CO}_2$ treatments. Boxplots represent the mean grey value of the shells (in pixel) in the different $p\text{CO}_2$ treatments. Unshared letters above bars indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$, Dunn's post hoc test), $n = 8$ to 12 larvae per condition

Discussion

In the context of the predicted acidification of the oceans, the integration of $p\text{CO}_2$ effects across all the developmental stages from fertilization to settlement and beyond is essential, especially because early life stages may respond to environmental stressors in a different way than adults. If acute exposure of early life stages brings many interesting information (Chan *et al.* 2011; Dineshram *et al.* 2013; Kim *et al.* 2013; Pansch *et al.* 2013), it may not represent the conditions they will face in the “real” environment. Results obtained from high $p\text{CO}_2$ acclimation across different life stages often differ from those arising from acute exposure of a given stage. For example, it has been shown that oyster D-veliger larvae grown from egg fertilized at elevated $p\text{CO}_2$ were more drastically impacted than those first produced at ambient $p\text{CO}_2$ and then reared later (embryo stages) at high $p\text{CO}_2$ (Parker *et al.* 2010). Keeping the parents under different $p\text{CO}_2$ conditions before fertilization up to larval release allowed the whole development to be achieved under different stressor levels. To our

knowledge, only Dupont *et al.* (2012) on sea urchins, Parker *et al.* (2012) on molluscs and Vehmaa *et al.* (2012) on copepods acclimated the adults to high $p\text{CO}_2$ during the reproductive conditioning before studying larvae in the same $p\text{CO}_2$ conditions. In our study, the effects of elevated $p\text{CO}_2$ were integrated along all the embryonic stages before the release of veliger larvae.

$p\text{CO}_2$ effects were first investigated on the shell morphology of the hatched larvae. The size (length, height and area) of the released larvae decreased with the increasing $p\text{CO}_2$ at both 13 and 19°C, particularly at 1400 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$. A noticeable exception was observed at 13°C and 750 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$ with an increase of the mean size of the larvae (Figure 2) which were from a single clutch. It is well known that different maternal investment can lead to between-female variations in hatching size in several calyptraeid species (Chaparro *et al.* 1999; Chaparro & Flores 2002; Collin 2010). The observation at 13°C and 750 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$ might thus be explained by an overrating of the larval size if the clutch only contained particularly large larvae. Egg and hatching size are also known to be influenced by temperature in some calyptraeids (Collin & Salazar 2010). Our observations might thus have resulted from the interaction between temperature and $p\text{CO}_2$, as reported by Talmage and Gobler (2011) in *Argopecten irradians* and *Mercenaria mercenaria* larvae. Unfortunately this could not be tested in this study.

Even if in some rare cases elevated $p\text{CO}_2$ did not impact larval morphology and growth (Gazeau *et al.* 2011; Thiyagarajan & Ko 2012), a correlation between high $p\text{CO}_2$ and lower size has been evidenced in most bivalve and gastropod species studied to date (Table 4), $p\text{CO}_2$ impacting sometimes the shape of the larval shell (Ellis *et al.* 2009). As observed here for length and height at 19°C (-5 % in the two high- $p\text{CO}_2$ treatments), shell lengths of *Crassostrea gigas* veliger larvae were smaller under elevated $p\text{CO}_2$, but were similar in conditions of pH lowered by 0.4 and 0.7 pH units (Barros *et al.* 2013). Smaller size and delayed shell growth may be explained by problems in shell deposition, delayed periostracum formation and/or increased shell dissolution as hypothesized by Watson *et al.* (2009).

Such processes may lead to development abnormalities and to an increase in their frequency under elevated $p\text{CO}_2$. Some few (3 %) *C. fornicata* larvae in the control group (390 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$) showed gentle shell abnormalities in the form of a notch close to the aperture (Figure 3A). The frequency of this abnormality increased under high $p\text{CO}_2$, being 2-fold more frequent at 750 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$ and reaching 15.6 % at 1400 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$. The intensity of shell abnormality, estimated from the deformity index, did not vary significantly with increasing $p\text{CO}_2$ even if the sharper shell deformities were detected at the highest $p\text{CO}_2$ condition (1400

μatm). The occurrence of abnormal shells is a common response in mollusc larvae exposed to elevated $p\text{CO}_2$. In bivalves for example, abnormalities can occur as shell hinge and edge deformities (Andersen *et al.* 2013), irregular-shaped shells (Kurihara *et al.* 2007) or protruding mantle (Kurihara *et al.* 2009). The frequency of abnormalities can reach 40% of shell deformities in *Pecten maximus* larvae reared at 1250 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$ (Andersen *et al.* 2013), and even 90 % of abnormal D-veligers in *Saccostrea glomerata* at 1000 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$ (Parker *et al.* 2009). In gastropods, larval shells were considered abnormal when shells were too small to fully cover the soft body (Li *et al.* 2013) or when dissolution zones were observed at the edge of the aragonitic larval shell (Kimura *et al.* 2011), with frequencies of abnormality ranging from 20 % in *Haliotis discus hannai* at 1650 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$ (Kimura *et al.* 2011) to 40 % in *Haliotis kamtschatkana* at 800 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$ (Crim *et al.* 2011). At extremely high $p\text{CO}_2$ ($> 1700 \mu\text{atm}$), some abalone larvae were even unable to precipitate a calcareous shell (Byrne *et al.* 2010; Crim *et al.* 2011).

Such abnormalities may be due to different processes: (i) the production of amorphous CaCO_3 may be impacted by damages to embryonic ectodermic cells and/or (ii) seawater corrosion may induce shell dissolution, affecting the strength and calcification of some parts of the shell (Barros *et al.* 2013). Here, the larval shell calcification was investigated at each $p\text{CO}_2$ condition through the observation of the veliger aragonitic shell under polarized light (Weiss *et al.* 2002). The characteristic dark cross observed in each larval shell (Figure 4B) indicated a radial arrangement of the aragonite crystals (Schönitzer & Weiss 2007) and did not have been considered as non-crystalline zone. The intensity of birefringence was used as a proxy of mineralization because the more intense the birefringence, the more crystalline and calcified the shell. Abnormalities observed under polarized light appeared less birefringent than the rest of the shell (Figure 4D) which suggested that deformities were likely less calcified as proposed by Barros *et al.* (2013).

The birefringence intensity of the larval shells decreased with increasing $p\text{CO}_2$, and was significantly lower at 1400 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$. This drop in birefringence revealed a decrease in calcification which may be related to a less mineralized matrix (Marxen *et al.* 2003), or more likely to a reduction of shell thickness (Schönitzer & Weiss 2007). Our data did not allow us to discriminate between these two hypotheses but previous work has already reported the decrease of shell thickness under high $p\text{CO}_2$ in bivalve larvae. For example, Gazeau *et al.* (2010) evidenced through scanning electron microscopy measurements a decrease in thickness of 12 % in *Mytilus edulis* larvae in 745 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$. Talmage and Gobler (2010) reported a decrease in thickness of *Mercenaria mercenaria* (-43 %) and *Argopecten irradians*

(-47.5%) larval shells after 17 days of development at 1500 $\mu\text{atm } p\text{CO}_2$, which was associated to an impact on the integrity and the connectedness of the hinge structure. A decrease of 5.7% in shell thickness of brooded larvae of the oyster *Ostrea chilensis* has also been observed following a decrease in pH (down to 6.56) within the mother's pallial cavity due to valve closure under salinity stress (Chaparro *et al.* 2009a).

The decrease in the larval size and calcification level might be due to reduced CaCO_3 saturation or hypercapnic suppression of metabolic pathways implied in calcification process (Byrne 2011). Very little is known about the conditions occurring along the intracapsular development and how acidified seawater can affect encapsulated embryos. Previous studies have shown that egg capsules of some gastropods, including *C. fornicata*, are permeable to water and ions (e.g. Pechenik 1982; Eyster 1986; Maeda-Martinez 2008) and it can be assumed that the capsule wall in *C. fornicata* is almost impermeable to gas because of its low O_2 conductance (Brante *et al.* 2008). Under "normal" conditions, embryos will progressively be exposed to hypoxia (Brante *et al.* 2008) and hypercapnia because of their respiration, which might lead to low intracapsular pH, as reported in other gastropod species (De Mahieu *et al.* 1974), without altering development (Brante *et al.* 2009). Under elevated $p\text{CO}_2$, diffusion of more protons (H^+) from external seawater to intracapsular medium may likely alter the intracapsular carbonate chemistry, thus enhancing metabolic acidosis. Similar acidosis can be observed under low salinity stress. For example, a decrease in pH down to 6.4 was recorded within the pallial cavity of the calyptraeid *Crepipatella dilatata* (Chaparro *et al.* 2009b; Montory *et al.* 2009), leading to the partial shell decalcification of the brooded encapsulated embryos (Montory *et al.* 2009). This decalcification may result in the release of some carbonate ions (CO_3^{2-}) which could link to free H^+ to form bicarbonate ions (HCO_3^-) thus buffering the intracapsular acidosis and limiting the drastic pH effects on larval metabolism. This potential buffering role in combination with the decrease in CaCO_3 saturation state are likely to impact shell calcification. Such processes were also hypothesized to buffer acidosis resulting from anaerobiosis in *C. fornicata* (Maeda-Martinez 1987) and thus likely explain our observations.

Altogether, our results showed that despite the potential protective role provided by encapsulation and brooding, elevated seawater $p\text{CO}_2$ impacted the shells of the released larvae in *C. fornicata*. However, *C. fornicata* larvae seemed to be less affected than other mollusc larvae, showing an overall low abnormality rate and low decrease in size. This low sensitivity might be due to resistance mechanisms existing in other molluscs such as the proton pump described in the cephalopod *Sepia officinalis* which permits an active excretion of H^+ out of

the egg capsule (Melzner *et al.* 2009). This has to be investigated in the future, for example by studying intracapsular fluid characteristics under future scenarios of ocean acidification.

The effects of elevated $p\text{CO}_2$ observed on *C. fornicata* larvae released from capsules may imply critical ecological consequences for their subsequent planktonic life and benthic settlement. Production of smaller larvae with weaker shell strength may increase vulnerability of larvae to predation and physical damages (Gaylord *et al.* 2011). Furthermore, larvae physiologically stressed during their development by various abiotic factors sometimes delay metamorphosis and settlement (Miller *et al.* 2009), staying longer in the water column which lead them to be more exposed to predators and diseases (Hickman 1999; Hickman 2001; Miller *et al.* 2009). In addition, reduced size in developmental early stages of may affect the juvenile survivorship and fitness, and may reduce abilities to competition (Anil *et al.* 2001; Pechenik 2006). Even if this study underlined that *C. fornicata* larvae might be more resistant to high $p\text{CO}_2$ conditions than other mollusc species, more studies on early life stages and particularly transition processes between them (e.g. metamorphosis) are needed to identify the potential tipping points and demographic bottleneck of this species in an ocean acidification context.

Table 4: Litterature review of the reports of negative impacts of high $p\text{CO}_2$ on morphological parameters in mollusc larvae

Species (veliger stage)	Measured parameter	pH conditions	$p\text{CO}_2$ (μatm)	% decrease due to $p\text{CO}_2$	Study
BIVALVES					
<i>Crassostrea gigas</i>	shell length	pH_{NBS} 7.4	2268	decrease	Kurihara <i>et al.</i> 2007
<i>Crassostrea gigas</i>	shell length	pH_{NBS} 7.8	1000	16%	Parker <i>et al.</i> 2010
<i>Crassostrea gigas</i>	shell length and height	pH_{NBS} 7.76, 7.37	1386, 3573	10.60%	Barros <i>et al.</i> 2013
<i>Crassostrea gigas</i>	shell area	pH_{NBS} 7.7, 7.4	1497, 2386	18.7 - 29%	Ko <i>et al.</i> 2013
<i>Crassostrea virginica</i>	shell length	pH_{T} 7.84, 7.49	\approx 650, 1500	16.70%	Talmage & Gobler 2009
<i>Crassostrea virginica</i>	shell area	pH_{NBS} 7.76	840	16%	Miller <i>et al.</i> 2009
<i>Ostrea lurida</i>	shell growth	pH_{T} 7.76	1000	5 - 14%	Hettinger <i>et al.</i> 2013
<i>Saccostrea glomerata</i>	shell length	-	1000	22%	Parker <i>et al.</i> 2009
<i>Saccostrea glomerata</i>	shell length	pH_{NBS} 7.8	1000	34%	Parker <i>et al.</i> 2010
<i>Saccostrea glomerata</i>	shell length	pH_{NBS} 7.9	856	31.6 - 1.3%	Parker <i>et al.</i> 2012
<i>Saccostrea glomerata</i>	antero posterior length	pH_{NBS} 7.8, 7.6	508.8, 775.6	8.7 - 6.3 %	Watson <i>et al.</i> 2009
<i>Saccostrea glomerata</i>	dorso ventral length	pH_{NBS} 7.8, 7.6	508.8, 775.6	7.5 - 5.1 %	Watson <i>et al.</i> 2009
<i>Mytilus californianus</i>	shell area	pH_{NBS} 7.75	970	5 - 7%	Gaylord <i>et al.</i> 2011
<i>Mytilus edulis</i>	shell length	pH_{NBS} 7.8	1200	4.5 - 6%	Gazeau <i>et al.</i> 2010

<i>Mytilus edulis</i>	area size	pH _{NBS} 7.6	1388 - 1493	7 - 8%	Bechmann <i>et al.</i> 2011
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	shell length and height	pH _{NBS} 7.4	2000	26 - 20%	Kurihara <i>et al.</i> 2009
<i>Argopecten irradians</i>	shell length	pH _T 7.84, 7.49	≈ 650, 1500	50%	Talmage & Gobler 2009
<i>Argopecten irradians</i>	diameter	pH _T (?) 7.5	1500	30.7%	Talmage & Gobler 2010
<i>Argopecten irradians</i>	shell length	pH _{SW} 7.39	1987	18.9 - 7.5%	White <i>et al.</i> 2013
<i>Pecten maximus</i>	shell length	pH _{NBS} (?) 7.51	1627	10%	Andersen <i>et al.</i> 2013
<i>Pecten maximus</i>	shell height	pH _{NBS} (?) 7.51	1627	5%	Andersen <i>et al.</i> 2013
<i>Macoma balthica</i>	shell length	pH _{NBS} 7.7, 7.2	1700, 4400	4.3 - 8.5%	Jansson <i>et al.</i> 2013
<i>Macoma balthica</i>	shell length	pH _{NBS} 7.8, 7.5	-	16.2 - 16.9%	Van Colen <i>et al.</i> 2012
<i>Mercenaria mercenaria</i>	shell length	pH _T 7.84, 7.49	≈ 650, 1500	22.70%	Talmage & Gobler 2009
<i>Mercenaria mercenaria</i>	diameter	pH _T (?) 7.5	1500	25.5%	Talmage & Gobler 2010
GASTROPODS					
<i>Littorina obtusata</i>	shell length	pH _{NBS} (?) 7.6	-	10%	Ellis <i>et al.</i> 2009
<i>Haliotis discus hannai</i>	shell length	pH _T (?) 7.71	1050	2.50%	Kimura <i>et al.</i> 2011
<i>Haliotis discus hannai</i>	shell length	pH _{NBS} 7.6, 7.3	1224.6, 2543.6	decrease	Li <i>et al.</i> 2013
<i>Haliotis kamtschatkana</i>	shell length	pH _{NBS} (?) 8.07	800	5%	Crim <i>et al.</i> 2011
<i>Crepidula fornicata</i>	shell length	pH _T 7.8, 7.6	750, 1400	5.3 - 10.7	Present study
<i>Crepidula fornicata</i>	shell height	pH _T 7.8, 7.6	750, 1400	2.6 - 13.1	Present study
<i>Crepidula fornicata</i>	shell area	pH _T 7.8, 7.6	750, 1400	6.2 - 19.8	Present study

¹ pH_{NBS}: pH on the NBS scale; pH_T: pH on the total scale; pH_{SW}: pH on the seawater scale

2.3 Processus hypothétiques contrôlant l'équilibre acido-basique dans les capsules de crépidule

Les hypothétiques réactions se produisant dans les capsules embryonnaires de *C. fornicata* (Figure II3-3) ne semblent pas avoir de conséquences drastiques sur la formation de la protonconque des embryons. En revanche, après avoir été libéré des capsules, les larves véligères se retrouvent libres dans la colonne d'eau, directement sous influence des paramètres physico-chimiques environnants. Cette nouvelle écophase est susceptible de présenter une sensibilité différente au phénomène d'acidification des océans.

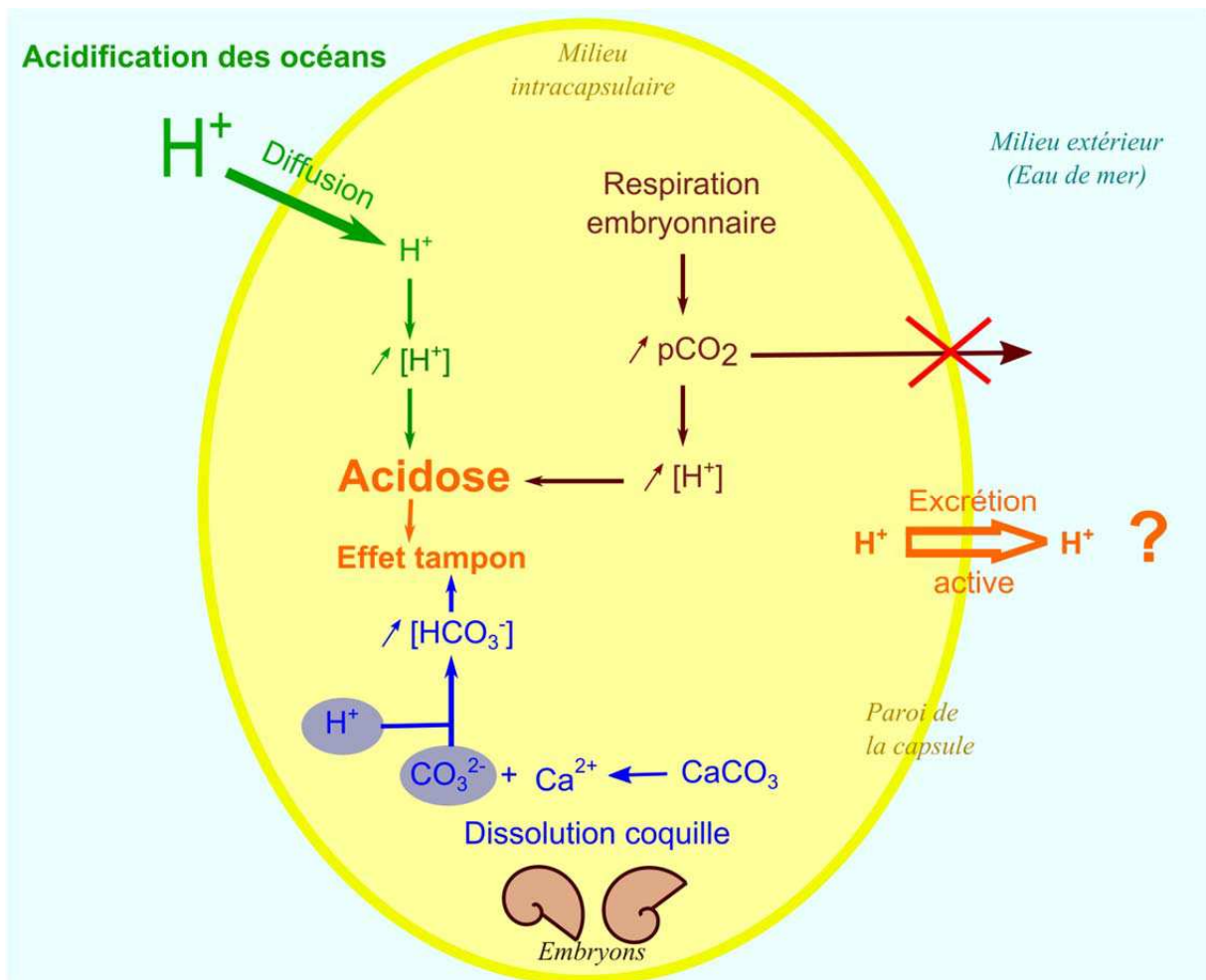


Figure II3-3: Hypothèses de mécanismes de régulation acido-basique dans la capsule. La respiration embryonnaire augmente la $p\text{CO}_2$ à l'intérieur de la capsule. Cette augmentation fait diminuer le pH intracapsulaire, induisant une acidose partielle du fluide intracapsulaire. Dans un contexte d'acidification des océans, des ions H^+ excédentaires pourraient diffuser à l'intérieur de la capsule et aggraver l'acidose intracapsulaire. Dans ces conditions, la dissolution des coquilles embryonnaires induirait une augmentation des ions HCO_3^- qui viendraient partiellement tamponner l'acidose. D'autres mécanismes comme une excrétion active des ions H^+ pourrait exister chez *C. fornicata*, permettant de diminuer les effets drastiques de l'acidose dans un contexte d'acidification des océans.

3. Impact de l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ sur la survie, la croissance et le métabolisme de larves véligères de *Crepidula fornicata*

3.1 Contexte général

N'ayant pu mettre les larves issues des parents acclimatés aux différentes conditions de $p\text{CO}_2$ en culture afin de pousser plus loin l'étude de l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ sur le cycle de vie de la crépidule, une deuxième étude a été réalisée sur des larves obtenues à partir d'adultes du milieu naturel, non préalablement acclimatés. Ces larves ont été soumises à deux conditions de $p\text{CO}_2$ élevée et leur croissance ainsi que leur métabolisme ont été observés durant tout leur développement larvaire jusqu'à la métamorphose en juvéniles. Bien que cette étude ne tienne pas compte d'effets potentiels d'acclimatation ou d'effets mémoire, la réponse des larves face à une diminution soudaine du pH permet d'observer les capacités de résistance des stades de vie précoce de l'espèce *Crepidula fornicata* déjà mis en évidence sur les adultes.



Figure II3-4: Jeune larve de crépidule (stade véligère)

3.2 Introduction

La phase planctonique larvaire est un stade du cycle de développement des espèces d'importance majeure en termes de dynamique de population des espèces à cycle benthopélagique. La dispersion des phases pélagiques minimise la compétition pour la nourriture, facilite la colonisation de nouveaux habitats et favorise le brassage génétique ce qui réduit les chances d'extinction de l'espèce et aide à la pérennité des populations (Pechenik 1999). Les larves sont des stades morphologiquement et écologiquement distincts des adultes et réputées

particulièrement sensibles aux stress abiotiques. Dans un contexte de changement global, les stades larvaires d'organismes calcifiants sont susceptibles d'être particulièrement exposés à l'acidification des océans à cause de leur squelette fragile (Byrne 2011) et du rapport volume exposé sur masse (Bechmann *et al.* 2011). Les effets négatifs de l'AO sur les larves sont donc susceptibles de créer des goulets d'étranglement des populations de mollusques calcifiants (Dupont *et al.* 2010a; Byrne 2011) notamment en influant sur la métamorphose et le recrutement des futurs juvéniles (Cigliano *et al.* 2010; Talmage & Gobler 2012).

Contrairement aux embryons encapsulés, la coquille des larves émises est en contact direct avec l'eau du milieu et donc directement soumise aux conditions de diminution du pH, de la concentration des ions CO_3^{2-} et de l'état de saturation des carbonates générés par l'augmentation de la $p\text{CO}_2$. De nombreuses études ont mis en évidence la grande sensibilité des larves de mollusque à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ notamment à travers la mesure du taux de survie (Gazeau *et al.* 2010; Crim *et al.* 2011; Kimura *et al.* 2011; Timmins-Schiffman *et al.* 2012), de la taille de la coquille (Watson *et al.* 2009; Parker *et al.* 2010; Sunday *et al.* 2011; Parker *et al.* 2012) et de son épaisseur et résistance (Talmage & Gobler 2010; Gaylord *et al.* 2011), du taux d'anomalies et malformations (Parker *et al.* 2009; Bechmann *et al.* 2011; Crim *et al.* 2011; Kimura *et al.* 2011), ou encore de taux métaboliques comme la respiration (Ko *et al.* 2013) ou la filtration (Bechmann *et al.* 2011; Vargas *et al.* 2013). Bien que les larves semblent être des stades de vie très sensibles à l'augmentation de $p\text{CO}_2$, de récentes études chez les mollusques ont montré que des diminutions modérées de pH n'avaient aucun effet sur la croissance des larves de certaines huitres comme *Crassostrea ariakensis* (Miller *et al.* 2009) ou *Crassostrea angulata* (Thiyagarajan & Ko 2012).

Les mécanismes associés à la réponse des larves à l'acidification des océans sont encore peu connus. Quelques études de protéomique et de génomique (O'Donnell *et al.* 2009; O'Donnell *et al.* 2010; Zippay & Hofmann 2010; Martin *et al.* 2011; Kurihara *et al.* 2012; Dineshram *et al.* 2013; Padilla-Gamino *et al.* 2013) ont montré que l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ pouvait provoquer des modifications de voies métaboliques, notamment celles associées à la biominéralisation, la squeletogenèse, le métabolisme énergétique, la respiration ou la régulation de molécules chaperonnes (Ross *et al.* 2011). Les gènes intervenant dans les processus de biominéralisation ont été sous exprimés chez des larves de l'oursin *Lytechinus pictus* alors que certains gènes de la régulation ionique ont été surexprimés sous des conditions élevées de $p\text{CO}_2$ (O'Donnell *et al.* 2010). Chez *Crassostrea angulata*, une diminution de 0,5 unités pH a causé la sous ou non expression de 71 protéines (Dineshram *et*

al. 2013). A l'inverse, la diminution de pH n'a eu aucun effet sur l'expression de deux gènes intervenant dans la calcification de la coquille (*ap24* et *engrailed*) chez l'ormeau *Haliotis rufescens* (Zippay & Hofmann 2010). La diversité de ces études montrent que les réponses à l'acidification des océans sont très spécifiques des espèces et dépendent fortement des gènes et protéines ciblées dans les études.

Chez la crépidule, la durée de vie larvaire peut varier de 2 à 7 semaines en fonction de différents facteurs environnementaux (Pechenik 1984; Rigal 2009). Cette longue phase planctonique confère à cette espèce un fort pouvoir de dispersion, caractère majeur pour une espèce invasive, mais expose aussi les larves de manière très importante aux stress biotiques et abiotiques de la colonne d'eau. Pour cette étude, des larves de *Crepidula fornicata* ont été obtenues en laboratoire à partir de femelles issues du milieu naturel après induction de ponte par augmentation de la température et de la quantité de nourriture. Les larves collectées ont été élevées en cylindro-coniques de culture dans deux conditions élevées de $p\text{CO}_2$. La densité, la croissance et la respiration larvaires ont été suivies tout au long du développement des larves jusqu'à leur transformation en juvéniles afin d'observer les effets de l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ sur ces stades réputés sensibles. Des analyses d'expression de gènes sont en cours pour observer la régulation de certains gènes et protéines cibles chez les larves de crépidule sous conditions de $p\text{CO}_2$ élevées.

3.3 Matériel et méthodes

a- Récupération des larves

Des chaînes de crépidules ont été prélevées à la drague le 6 février 2013 sur le site de la Barre des Flots en Baie de Morlaix. Une trentaine de chaînes d'une taille moyenne de 6 individus ont été sélectionnées puis maintenues en laboratoire dans un système semi ouvert dans une eau de mer filtrée sur 20 μm à une température de 16°C. Les crépidules étaient nourries tous les deux jours avec un mélange de deux espèces de microalgues, *Chaetoceros gracilis* ($\sim 15 \times 10^6$ cells mL^{-1}) et *Isochrysis affinis galbana* ($\sim 26 \times 10^6$ cells mL^{-1}) produites à la Station Biologique de Roscoff.

L'augmentation de la température et l'apport important de nourriture constituent une technique utilisée à la station Biologique de Roscoff depuis plusieurs années pour obtenir des pontes de crépidules désaisonnalisées. Des pontes de capsules embryonnaires ont été induites

en sortant de l'eau pendant 2h des crépidules adultes maintenues en laboratoire. Après deux semaines d'incubation et de maturation des capsules embryonnaires, un évènement d'émission larvaire important (25 mars 2013) a permis de récupérer, après filtration sur tamis, un peu plus de 96 000 de larves.

b- Système expérimental

Après avoir concentré les larves dans une éprouvette de 500 mL, la concentration larvaire a été déterminée par comptage des individus vivants sous loupe binoculaire. Les larves ont ensuite été également réparties à raison d'environ 16 000 larves dans chacun des six bacs cylindriques appelés "cylindros coniques" constituant le système expérimental (Figure II3-5).

Les larves ont été maintenues dans deux conditions de $p\text{CO}_2$: 390 μatm , $p\text{CO}_2$ atmosphérique actuelle et 1400 μatm , scénario de $p\text{CO}_2$ élevée prévu pour 2300 (Calderira & Wickett 2003). L'expérimentation a été réalisée dans une salle thermostatée maintenue à une température constante de 18°C. La $p\text{CO}_2$ était régulée dans des bacs tampons d'environ 50 L par bullage d'air appauvri en CO_2 par passage sur chaux sodée (condition 390 μatm) ou par bullage de CO_2 pur (condition 1400 μatm). Chaque bac, brassé par un bullage d'air additionnel, alimentait un triplicata de cylindros par des pompes. L'eau arrivant par le fond du cylindro retournait dans le bac tampon par un système de surverse protégé par un tamis (pour éviter que les larves ne tombent dans le bac de régulation). Les larves ainsi maintenues dans les cylindros ne sédimentaient pas sur le fond grâce au léger courant d'eau. Les valeurs de pH du contrôleur autonome IKS étaient ajustées en fonction des mesures quotidiennes de pH effectuées dans chaque cylindro avec un pH-mètre (826 pH mobile, Metrohm AG, Herisau, Switzerland) calibré avec des tampons Tris/HCl et 2-aminopyridine/HCl (Dickson *et al.* 2007). L'alcalinité (A_T) de l'eau a été déterminée au début et à la fin de l'expérience dans chaque cylindro par titration potentiométrique à l'HCl 0,01N (titrateur automatique Titroline alpha, Schott SI Analytics, Mainz, Allemagne).

Les larves ont été élevées dans ce système pendant 20 jours (25 mars – 13 avril 2013), jusqu'à l'apparition des premiers stades juvéniles fixés sur les parois des cylindros. Durant cette période, les larves ont été nourries quotidiennement avec un mélange de microalgues *C. gracilis* et *I. affinis galbana* à raison de 100 mL par cylindro (même mélange que pour nourrir

les adultes cf article 4). Tous les deux jours, 90 % de l'eau du système était renouvelée avec de l'eau de mer filtrée sur 20 μm

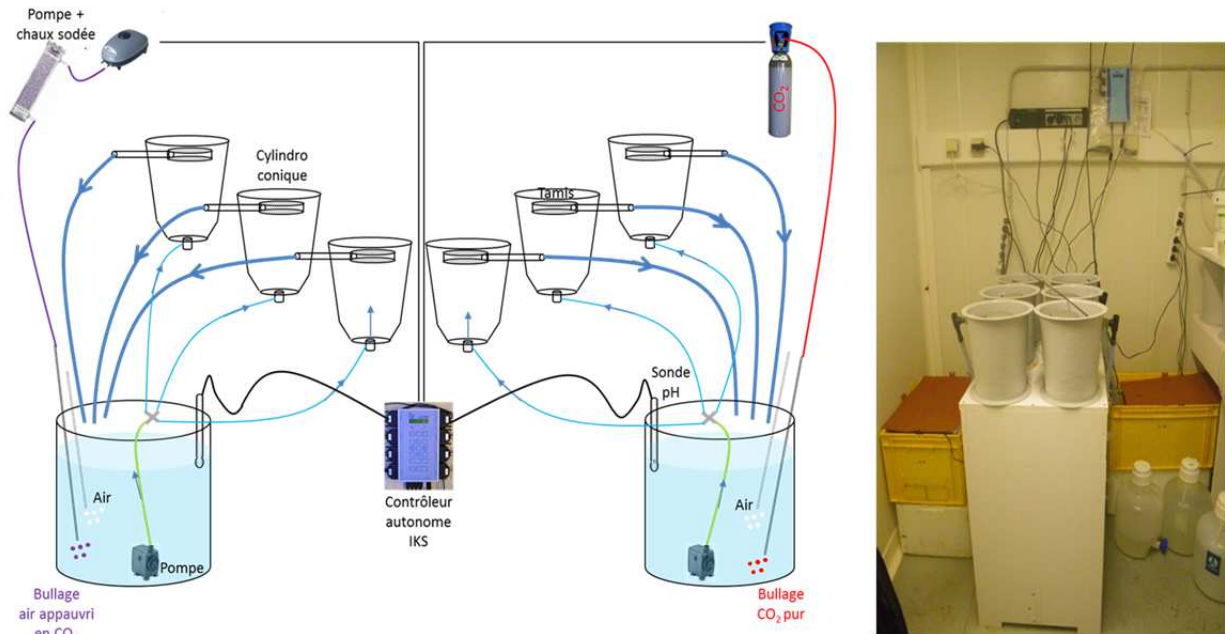


Figure II3-5: Système expérimental larvaire (schéma à gauche et photo à droite).

c- Densité

Tous les deux jours, à partir du 25 mars 2013, les densités de larves vivantes et mortes ont été estimées pour chaque cylindro. Après filtration sur des tamis de maille 400 μm , les larves ont ensuite été concentrées dans une éprouvette de 200 mL afin de prélever un triplicat d'échantillons de 1 mL. La quantité de larves vivantes et mortes était comptée sous loupe binoculaire pour chaque prélèvement afin d'estimer une densité moyenne de larves contenue dans le cylindro.

d- Croissance

La croissance larvaire dans chaque condition de $p\text{CO}_2$ a été estimée à partir des mesures faites sur les larves vivantes des échantillons prélevés pour la densité et sur les larves utilisées pour les mesures de respiration (voir ci-dessous). La longueur droite de la face

gauche de chaque larve (voir Figure 1A de l'article n°5) a été mesurée sous loupe binoculaire à l'aide d'un oculaire micrométrique par le même observateur.

e- Respiration larvaire

Tous les deux jours à partir du 26 mars 2013, des larves étaient sélectionnées aléatoirement dans chaque cylindre afin d'effectuer des mesures de respiration larvaire. Entre 1 et 20 larves (suivant la taille des larves) étaient ensuite enfermées dans des fioles de 1 mL à fond conique, dans de l'eau provenant de leur propre cylindre, sans aucune bulle d'air entre le bouchon et l'eau. Chaque fiole était bouchée par un opercule en téflon pouvant être percé et accessible par un trou dans le bouchon (Figure II3-6). Les fioles contenant les larves étaient ensuite placées sur une plaque d'agitation et incubées pendant 3h afin de mesurer la consommation d'oxygène des larves.



Figure II3-6: Mesure de respiration larvaire. Seringue contenant une fibre optique de résolution 50 μm (Presens, Regensburg, Germany) transperçant l'opercule en plastique/téflon d'une fiole de 1 mL à fond conique contenant les larves.

La respiration larvaire (R) a été calculée grâce à des mesures d'oxygène en début et fin d'incubation, effectuées à l'aide d'une microsonde à O_2 (Needle-Type Oxygen Microsensors, Presens, Allemagne) puis standardisée à une taille commune selon la formule suivante :

$$R = \frac{\Delta\text{O}_2}{\Delta t \times n \times L}$$

où R est le taux de respiration larvaire (en $\mu\text{mol O}_2 \mu\text{m}^{-1} \text{min}^{-1}$), ΔO_2 est la différence de concentration en oxygène entre le début et la fin de l'incubation (en $\mu\text{mol O}_2 \text{mL}^{-1}$), Δt est la durée de l'incubation (en min), n est le nombre de larve dans la fiole et L est la longueur moyenne des larves incubées (en μm).

3.4 Résultats

a- Paramètres de l'eau de mer

Les différents paramètres de l'eau de mer mesurés et calculés au cours de l'expérience sont présentés dans le tableau II3-2. La $p\text{CO}_2$ de 390 μatm n'a pu être maintenue dans le système à cause de la mauvaise ventilation de la pièce. La $p\text{CO}_2$ moyenne calculée dans cette condition qui devait être la condition témoin est donc plus proche de 750 μatm , scénario le moins pessimiste prédit par l'IPCC pour 2100. Dans aucun des deux traitements l'état de saturation n'a été inférieur à 1.

Tableau II3-2: Paramètres moyens du système des carbonates pour chaque traitement de $p\text{CO}_2$. Le pH sur l'échelle totale (pH_T) a été mesuré quotidiennement et l'alcalinité totale (A_T) en début et fin d'expérience. La $p\text{CO}_2$ (pression partielle de CO_2) et Ω_{Ar} (état de saturation des carbonates pour l'aragonite) ont été calculés avec le logiciel CO_2sys .

	pH_T	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	A_T ($\mu\text{Eq L}^{-1}$)	$p\text{CO}_2$ (μatm)	Ω_{Ar}
$p\text{CO}_2$ actuelle (390 μatm)	$7,82 \pm 0,02$	$18,3 \pm 0,1$	2405 ± 2	773 ± 50	$1,87 \pm 0,07$
$p\text{CO}_2$ élevée (1400 μatm)	$7,54 \pm 0,03$	$18,1 \pm 0,2$	2405 ± 2	1584 ± 97	$1,04 \pm 0,07$

b- Densité

Sur une densité initiale d'environ 16 000 larves par cylindro, seules quelques dizaines sont arrivées à la métamorphose et au stade de juvéniles au bout de 20 jours de développement. Le nombre de larves vivantes a diminué de manière similaire dans les deux conditions de $p\text{CO}_2$ (test de Mann-Whitney, $n = 81$, $t = 7141$, $p = 0,071$). La mortalité naturelle élevée des larves n'a donc pas été affectée de manière significative par la diminution de pH (Figure II3-7).

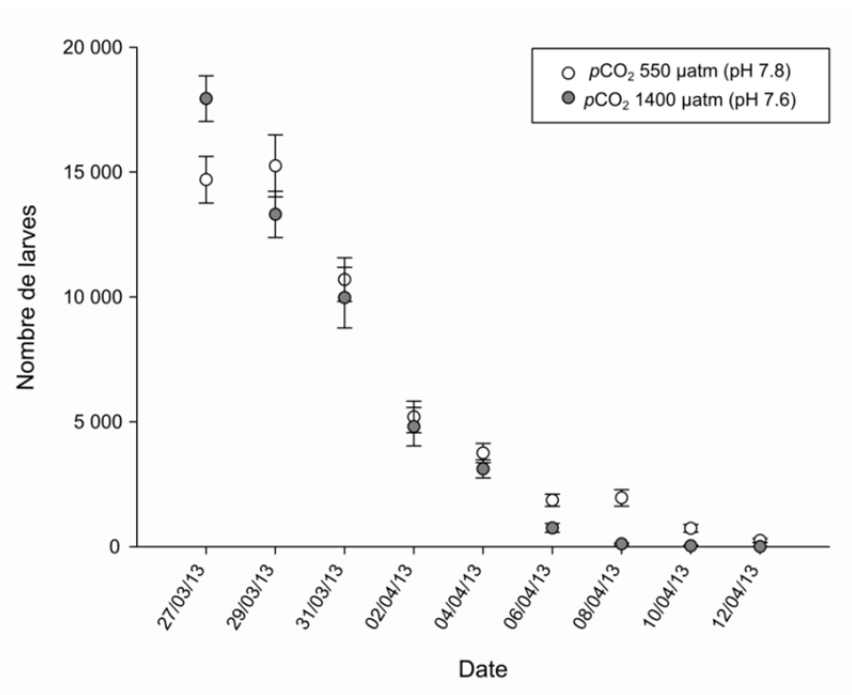


Figure II3-7: Densité larvaires au cours du temps dans les deux conditions de $p\text{CO}_2$ testées.

c- Croissance

Durant les 20 jours d'expérimentation, les larves sont passées d'une taille de 450 μm de long environ à une longueur supérieure à 900 μm . La croissance s'est effectuée de manière linéaire avec cependant une différence significative de taille entre les larves à 550 μatm et celles à 1400 μatm (test de Mann-Whitney, $n = 1295$, $T = 1\ 696\ 063$, $p < 0,001$). La $p\text{CO}_2$ a donc eu un effet significatif sur la croissance larvaire (Figure II3-8). La croissance larvaire estimée à partir de la pente de la droite tracée pour la condition 550 μatm est de 24,26 $\mu\text{m jour}^{-1}$ alors que celle pour la condition 1400 μatm est de 20,00 $\mu\text{m jour}^{-1}$.

d- Respiration larvaire

La respiration normalisée à la taille des larves est restée constante sur les 13 premiers jours de l'expérimentation puis a ensuite brusquement augmenté à partir du 7 avril 2013 et ce jusqu'à la fin de l'expérience (Figure II3-9). Cependant, aucun effet de la $p\text{CO}_2$ n'a été mis en évidence sur l'ensemble des taux de respiration calculés (test de Mann-Whitney, $n = 51$, $t = 2551$, $p = 0,413$).

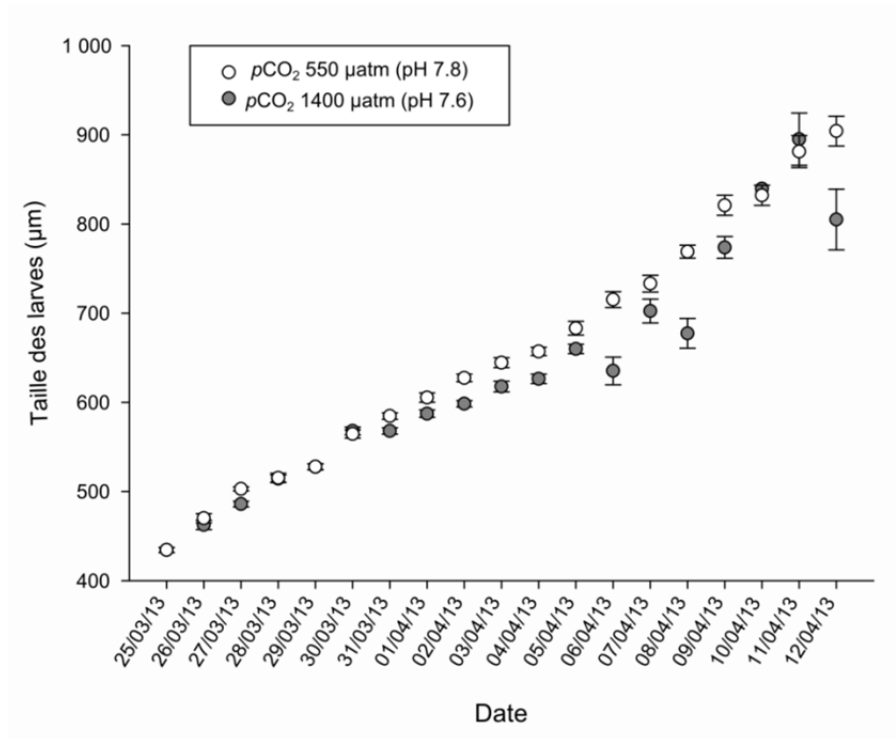


Figure II3-8: Taille moyenne des larves au cours du temps dans les deux conditions de $p\text{CO}_2$ testées.

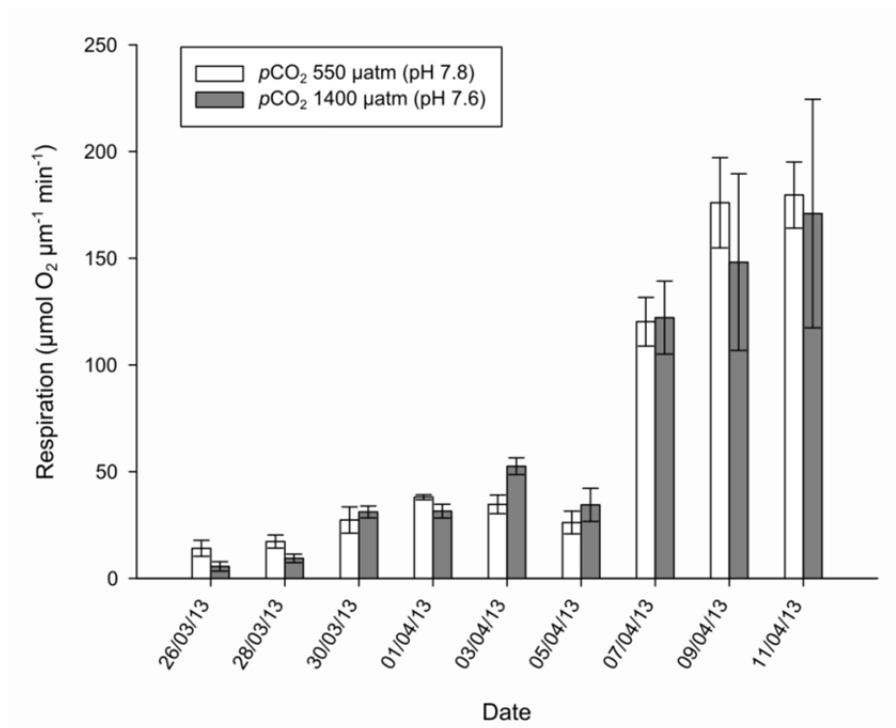


Figure II3-9: Respiration larvaire au cours du temps dans les deux conditions de $p\text{CO}_2$ testées

3.5 Discussion

A cause d'une mauvaise aération de la salle d'expérimentation, la condition 390 μatm $p\text{CO}_2$ n'a pu être atteinte malgré un bullage important d'air appauvri en CO_2 . La $p\text{CO}_2$ moyenne de la condition "témoin" était donc de 750 μatm (correspondant à un pH_T de 7,8). Ce traitement ne peut donc être considéré comme représentatif de la condition actuelle de $p\text{CO}_2$ dans l'atmosphère mais doublement de la $p\text{CO}_2$ (par rapport à la $p\text{CO}_2$ actuelle) constitue une diminution de pH de 0,3 unités prévue pour la fin du siècle (Solomon *et al.* 2007). Cependant, un premier élevage larvaire réalisé au printemps 2011 dans des béciers de 5 L, dans les mêmes conditions de température et de nourrissage, a montré qu'il n'y avait pas de différence de taille entre des larves maintenues à 430 et 760 μatm . L'élevage n'a duré que 4 jours suite à d'importantes mortalités spontanées dans les conditions de $p\text{CO}_2$ les plus élevées (1380 et 2600 μatm correspondant respectivement aux pHs 7,57 et 7,31) mais aucun effet $p\text{CO}_2$ n'a pu être détecté sur la croissance larvaire. De plus, parmi les études recensant les effets d'une diminution de 0,1 ou 0,2 unités pH par rapport au pH actuel sur la taille des larves ou la croissance larvaire (7 études dans Gazeau *et al.* 2013) plus de la moitié ont montré qu'il n'y avait pas de différence entre la condition témoin et celle où le pH avait été diminué. En prenant en compte ces divers éléments, on peut ainsi estimer que la condition 750 μatm , même si elle est différente de la condition de $p\text{CO}_2$ actuelle ne constitue pas un stress marqué pour les larves de crépidules.

La quantité de larves vivantes, au départ d'environ 16 000 larves par cylindro, a chuté au cours du temps dans les deux conditions de $p\text{CO}_2$ pour finir à seulement quelques dizaines d'individus en fin d'expérience. La forte mortalité est une constante de la phase de vie larvaire qui peut être accentuée par la densité de larves (Rumrill 1990). Cependant, aucun effet significatif de la $p\text{CO}_2$ n'a pu être mis en évidence sur l'abondance de larves vivantes dans les deux conditions. La survie larvaire est un paramètre qui peut être affecté (Talmage & Gobler 2009; Watson *et al.* 2009; Parker *et al.* 2012; Barros *et al.* 2013; White *et al.* 2013) ou non (Gazeau *et al.* 2010; Kimura *et al.* 2011) par l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ suivant les espèces. Dans notre étude, la survie des larves est faible mais identique dans les deux traitements ce qui n'empêche pas que la $p\text{CO}_2$ ait impacté le métabolisme des larves.

Les taux de respiration larvaire mesurés dans notre étude n'ont pu être comparés à ceux obtenus sur la même espèce dans d'autres études à cause d'unités non homogènes (Pechenik 1980; Dobbertein & Pechenik 1987; Eyster & Pechenik 1988) ni à d'autres larves

de mollusques par manque de données dans la littérature. Cependant, à taille égale (500 μm), le taux de respiration moyen des larves de crépidules (12 $\text{pmol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ individu}^{-1}$) est du même ordre de grandeur que celui mesuré chez d'autres larves d'invertébrés comme les oursins *Sterechinus neumayeri* (environ 15 $\text{pmol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ individu}^{-1}$; Marsh *et al.* 1999) et *Strongylocentrotus purpuratus* (Stumpff *et al.* 2011). Le taux de respiration ramené à la taille a très peu varié durant la première partie de l'expérience avant d'augmenter brutalement au bout du quatorzième jour. Cette augmentation pourrait être reliée à une phase particulière du développement (Marsh *et al.* 1999) comme le début de la compétence, processus certainement coûteux et demandeur en énergie à partir duquel les larves mettent en place les "appareils physiologiques" nécessaires à la métamorphose.

La croissance des larves est linéaire entre les tailles de 400 et 1000 μm dans les deux conditions de $p\text{CO}_2$ testées mais cependant plus faible que celles mesurées par Rigal (2009) (43,15 et 53,57 $\mu\text{m j}^{-1}$ à 17 et 20°C respectivement). La $p\text{CO}_2$ a impacté de manière significative la croissance larvaire avec une croissance plus lente à 1400 μatm (20,0 $\mu\text{m jour}^{-1}$) qu'à 750 μatm (24,3 $\mu\text{m jour}^{-1}$). Cette diminution de la croissance se traduisant par une diminution de la taille des larves de crépidules est un effet de la $p\text{CO}_2$ déjà largement documenté sur d'autres larves de mollusques (Parker *et al.* 2009; Talmage & Gobler 2009; Parker *et al.* 2010; Thiyagarajan & Ko 2012; Andersen *et al.* 2013; Jansson *et al.* 2013) et seul Gazeau *et al.* (2011) n'a montré aucun impact de la $p\text{CO}_2$ sur la taille des larves. La diminution de l'état de saturation en CaCO_3 due à l'augmentation de $p\text{CO}_2$ est l'un des facteurs majeurs induisant des ralentissements de la croissance larvaire (Gazeau *et al.* 2011; Barton *et al.* 2012) car les larves ne seraient pas capables d'isoler le site de calcification de l'eau ambiante (Waldbusser *et al.* 2013b). Cette diminution du taux de croissance pourrait aussi être due à une dépression métabolique (Pörtner *et al.* 2005), soit une diminution générale du fonctionnement de l'organisme en réaction à l'hypercapnie, répandue chez différentes espèces de mollusques (Willson & Burnett 2000; Michaelidis *et al.* 2005; Navarro *et al.* 2013). Cette dépression métabolique se manifeste notamment par une diminution du taux de respiration des organismes en conditions de stress (Guppy & Withers 1999). Tout au long du développement larvaire, la respiration n'a pas été affectée par la $p\text{CO}_2$, soulignant une absence de dépression métabolique en conditions hypercapniques, contrairement aux larves pédivéligères de *C. gigas* (Ko *et al.* 2013). Cette absence d'effet $p\text{CO}_2$ sur le métabolisme chez les larves de crépidules suggère une forte tolérance à la diminution de pH induite par l'augmentation de la $p\text{CO}_2$. Le pH interne pourrait être maintenu grâce à des processus de

régulation interne qui restent peu connus chez les larves (Melzner *et al.* 2009). En l'absence de dépression métabolique, la diminution de la croissance ne semble donc pas être le fait d'un ralentissement du métabolisme mais peut provenir d'une régulation de l'expression et de la quantité de protéines et enzymes intervenant dans la formation coquillière (Zippay & Hofmann 2010; Martin *et al.* 2011; Kurihara *et al.* 2012; Dineshram *et al.* 2013; Padilla-Gamino *et al.* 2013). Au cours de notre expérience des larves ont été fixées afin d'analyser l'expression de gènes ciblés chez les larves de crépidules durant leur croissance. Des informations sur leur régulation seront apportées dès que les analyses auront été réalisées.

Au terme de leur croissance, certaines larves se sont métamorphosées en juvéniles, recrutant sur les parois des cylindro-coniques dans les deux conditions de $p\text{CO}_2$. Le stress engendré par l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ n'a donc affecté le processus de métamorphose en lui-même comme déjà montré chez *Macoma balthica* (Van Colen *et al.* 2012). Cependant, les premiers juvéniles sont apparus deux jours plus tôt dans la condition de $p\text{CO}_2$ 750 μatm par rapport à la condition 1400 μatm . La croissance larvaire plus faible à 1400 μatm a permis d'atteindre la taille de métamorphose après les larves de la condition 750 μatm ce qui expliquerait le décalage de deux jours entre les débuts des premières métamorphoses. Hormis le délai de métamorphose induit, ce ralentissement de croissance entraîne une augmentation de la durée de vie larvaire et de ce fait une augmentation du risque de prédation et de contagion par des maladies (Hickman 1999; Hickman 2001; Miller *et al.* 2009).

Bien que la survie, le métabolisme et la croissance larvaires ne semblent pas être fortement impactés par l'augmentation de la $p\text{CO}_2$, d'autres fonctions physiologiques, non testées ici, comme les capacités natatoire ou de nourrissage pourraient être affectées par l'AO (Chan *et al.* 2011; Vargas *et al.* 2013) et pourraient jouer *in fine* sur la survie et la croissance des larves. Même si les larves de crépidules semblent être particulièrement résistantes à de fortes augmentations de la $p\text{CO}_2$, il faut prendre en compte le fait que cette expérience ne représente pas tout à fait le mécanisme d'acidification des océans. En effet, les larves véligères de cette expérience ont été produites dans une condition pH actuelle, sans pré-acclimation des géniteurs ou embryons aux $p\text{CO}_2$ testées dans l'expérience et donc sans prise en compte de la transmission de caractère parentaux (Parker *et al.* 2012). De plus, les larves ont été soumises à un stress hypercapnique brutal, alors que la diminution de pH est beaucoup plus progressive dans le contexte d'acidification des océans. Une des perspectives de recherche serait donc de développer les études sur plusieurs phases consécutives du cycle de vie des crépidules afin de prendre en compte les effets mémoire successifs des phases les unes

sur les autres et comprendre les réels impacts de l'AO sur les jeunes stades de vie de cette espèce.

Chapitre 4 : Synthèse générale sur l'impact de l'acidification des océans sur l'espèce invasive *Crepidula fornicata*

1. Impact de l'AO sur les jeunes phases du cycle de vie

Pour comprendre le devenir d'une espèce dans un contexte d'AO, il faut connaître les réponses de chacune des phases de son cycle de vie afin de déterminer leurs tolérances respectives à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$. Les jeunes stades du cycle de vie des invertébrés sont susceptibles d'être plus impactés par l'AO que les adultes car ce sont des stades réputés plus fragiles (Byrne 2011; Ross *et al.* 2011), notamment les larves calcifiantes de mollusques qui précipitent une calcite amorphe beaucoup plus soluble que les autres formes de CaCO_3 au début de leur développement (Weiss *et al.* 2002).

1.1 Importance de l'encapsulation dans la résistance à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$

Contrairement aux espèces à fécondation externe, dont la rencontre des gamètes se fait dans la colonne d'eau et dont les embryons et larves sont directement soumis aux variations de pH du milieu, certaines espèces protègent leurs descendants en les couvant, en les enfermant dans des capsules ou en utilisant ces deux processus (Pechenik 1999). Les capsules embryonnaires sont censées conférer aux embryons une protection physique contre les dangers extérieurs (Przeslawski 2004). Dans le milieu confiné des capsules, la diffusion du CO_2 et de l'oxygène est limitée (Brante *et al.* 2008; Gutowska & Melzner 2009), ce qui entraîne des conditions hypercapniques et hypoxiques, ainsi que des pHs faibles (De Mahieu *et al.* 1974), auxquels sont naturellement soumis les embryons au cours de leur développement. Melzner *et al.* (2009) ont mis en évidence que cette caractéristique ontogénique (long développement embryonnaire réalisé dans une enveloppe protectrice) était partagée par des taxons tolérants à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ comme les céphalopodes, les crustacés ou les poissons. A l'inverse, certains invertébrés dont la fécondation est externe et le développement larvaire se déroule dans la colonne d'eau (cnidaires, échinodermes, bivalves) seraient plus sensibles à l'AO. Il a donc été suggéré que l'exposition des embryons à des conditions intracapsulaires de $p\text{CO}_2$ élevées, faisant partie intégrante du cycle de vie de ces espèces, pourrait conférer aux larves une certaine forme de résistance à l'augmentation de la

$p\text{CO}_2$ prévue dans un contexte d'AO (Melzner *et al.* 2009; Moulin *et al.* 2011). Afin de mieux comprendre à quelles conditions physico-chimiques sont réellement exposés les embryons, une caractérisation de différents paramètres de la chimie des carbonates intracapsulaire (pH, alcalinité ...) pourrait être réalisée durant le développement embryonnaire de différentes espèces.

La crépidule est une espèce incubante qui, après un développement embryonnaire réalisé dans une capsule protégée sous la mère, libère dans la masse d'eau des larves dont la coquille est déjà formée. Les larves de crépidules récupérées à la fin de leur développement embryonnaire, une fois émises (Article n°5), ne présentaient pas d'absence de coquille ou même de déformations coquillières majeures susceptibles de diminuer la viabilité des larves comme cela a été montré chez d'autres espèces de gastéropodes dont le développement se fait directement dans la colonne d'eau (Byrne *et al.* 2010; Crim *et al.* 2011). Il est donc possible que les conditions intracapsulaires hypercapniques subies par les embryons de crépidules en conditions normales (Brante *et al.* 2008; Brante *et al.* 2009) leur aient permis de développer des mécanismes de résistance à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ leur conférant une grande tolérance au phénomène d'AO. Cependant, les larves émises dans la condition de $p\text{CO}_2$ la plus drastique (1400 μatm) étaient plus petites que dans les deux autres conditions (390 et 750 μatm). Cette diminution de la taille dans des conditions de $p\text{CO}_2$ élevée souligne que malgré une exposition naturelle à l'hypercapnie, les larves se développant à l'intérieur des capsules sont quand même impactées par l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ de l'eau de mer. Etudier l'efficacité de certaines enzymes impliquées dans le processus de calcification chez des larves élevées sous différents scénari d'AO, comme cela a déjà été fait chez des larves d'oursins (Martin *et al.* 2008; Todgham & Hofmann 2009), permettrait de comprendre de quelle manière les fortes $p\text{CO}_2$ peuvent influencer la croissance larvaire.

1.2 Importance de la durée de vie larvaire planctonique

Parmi les invertébrés marins benthiques, environ 10 % des larves produites sont lécitotrophes, c'est-à-dire qu'elles possèdent leurs propres réserves vitellines nécessaires à leur croissance (Thorson 1950). A l'inverse, la majorité des larves sont planctotrophes et se nourrissent du plancton présent dans la colonne d'eau. Il a été suggéré que les larves lécitotrophes, qui n'ont pas besoin de source de nourriture exogène, seraient peu ou pas impactées par l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ (Dupont *et al.* 2010c). A l'inverse, les effets

indirects de l'AO sur les fonctions natatoires et de filtration pourraient diminuer les capacités de nutrition des larves planctotrophes entraînant une réduction du métabolisme et des ralentissements de croissance (Bechmann *et al.* 2011; Vargas *et al.* 2013). Les larves lécitotrophes ont des durée de vie larvaires courte (Pawlik 1992) comparées aux larves planctotrophes dont 55 à 85 % ont une longue durée de vie larvaire (Thorson 1950). Plus que l'effet indirect de la diminution des capacités de nourrissage sur la croissance, l'impact direct de la $p\text{CO}_2$ sur le métabolisme durant la longue vie larvaire planctonique dans des conditions d'AO pourrait expliquer les tailles plus petites observées chez de nombreuses larves planctotrophes comparé aux lécitotrophes (voir revue à la fin de l'article 5).

Chez les larves planctotrophes de crépidule, aucune mortalité ou changement de métabolisme significatif n'a été décelé à pH faible, ce qui souligne la grande tolérance de ces organismes à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$. Cependant, la taille des larves dans la condition de $p\text{CO}_2$ la plus élevée (1400 μatm) était inférieure à celle de la condition témoin (750 μatm) alors qu'elles avaient une taille semblable à l'émission. L'augmentation de la $p\text{CO}_2$ a donc impacté la croissance larvaire, plus faible à 1400 μatm qu'à 750 μatm . Un ralentissement de la croissance larvaire est susceptible d'augmenter la durée de vie planctonique et d'affecter leur recrutement en retardant l'arrivée à la taille de métamorphose (Pechenik 2006). Cette augmentation de la durée de vie planctonique augmente la probabilité de mortalité naturelle et par prédation (Hickman 1999). Des larves de plus petite taille peuvent avoir des capacités de nourrissage réduites (Pechenik *et al.* 2002) et être plus sujettes à des périodes de jeûne car elles sont en contact avec moins de nourriture (Anger 1987; Kurihara *et al.* 2007; Talmage & Gobler 2010).

Afin de mieux comprendre si la supposée résistance des larves lécitotrophe à l'AO provient vraiment de leur réserves nutritives ou si elle est due au faible temps passé dans des conditions de $p\text{CO}_2$ élevée, des études comparant des espèces lécitotrophes et planctotrophes à la durée de vie larvaire planctonique similaire devraient être menées sur des larves d'invertébrés provenant des mêmes écosystèmes.

1.3 Importance des effets mémoires à travers plusieurs phases du cycle de vie

Les études récentes sur les premiers stades de vie des invertébrés marins ont généralement été menées sur un stade précis de ce cycle, sans conditionnement des stades antérieurs aux traitements expérimentaux (Byrne 2011). Or, dans le milieu naturel, les effets

d'un stress sont intégrés et se cumulent à travers les différents stades de vie avec parfois de profondes conséquences d'un stade sur un autre à travers un "effet mémoire". Il a par exemple été montré que des larves véligères de l'huitre *Saccostrea glomerata*, élevées dans des conditions de fortes $p\text{CO}_2$, avaient des tailles plus petites et des taux de survie plus faibles si elles étaient issues de fécondation à $p\text{CO}_2$ élevée plutôt que si elles étaient issues de la fécondation à $p\text{CO}_2$ normale (Parker *et al.* 2009). Une différence similaire a également été montrée chez des larves d'échinodermes (Foo 2010 dans (Byrne 2011) soulignant l'importance de réaliser le cycle de vie entier d'une espèce dans des conditions futures d'augmentation de la $p\text{CO}_2$ pour définir sa vulnérabilité. Ces phénomènes d'effets mémoires ou d'effets cumulés peuvent ainsi créer des effets délétères sur les stades successifs, provoquant de fortes mortalités, des diminutions de l'efficacité de recrutement et in fine des goulets d'étranglement des populations menaçant leur pérennité (Parker *et al.* 2012; Dupont *et al.* 2013).

Dans l'étude décrite dans l'article n°5, l'acclimatation et le maintien des géniteurs aux différentes conditions de pH a permis que la fécondation et le développement embryonnaire se déroulent entièrement sous différentes conditions de $p\text{CO}_2$, prenant en compte les effets mémoire à travers différentes phases du cycle de vie de la crépidule. Malheureusement, les larves ainsi émises n'ont pu être mises en culture pour poursuivre l'étude des phases de vie successives dans des conditions de $p\text{CO}_2$ élevées. Une des perspectives de travail serait de réaliser le cycle complet de la crépidule dans des conditions de forte $p\text{CO}_2$ afin d'observer si la résistance à l'AO diminue quand toutes les stades sont exposés.

2. Tolérance des adultes à l'AO

2.1 Réponses physiologiques et régulation du pH interne

L'hypercapnie (augmentation de la $p\text{CO}_2$ interne) engendre immédiatement une acidose interne dans les fluides corporels et tissus des invertébrés marins par diffusion du CO_2 depuis le milieu ambiant vers le milieu interne à travers les membranes de l'organisme (Burnett 1997; Pörtner *et al.* 2004; Pörtner *et al.* 2005; Melzner *et al.* 2009). Les effets de l'augmentation de la concentration de CO_2 à des petits niveaux organisationnels comme les molécules peuvent être intégrés et cumulés à des niveaux fonctionnels supérieurs induisant

une diminution des capacités fonctionnelles, premiers signes d'une réponse à l'AO (Pörtner *et al.* 2005). Des conditions d'hypercapnie prolongée, comme prévues dans le contexte d'AO, induisent des changements dans les régulations acide-base et les concentrations ioniques, amenant à de nouveaux équilibres acido-basiques spécifiques de l'espèce et susceptibles d'entraîner des conséquences à long terme. Ces perturbations et la compensation incomplète de l'équilibre acido-basique causée par la diminution du pH intra- et extra-cellulaire peuvent entraîner chez certains invertébrés une diminution des taux métaboliques aérobie, phénomène appelé "dépression métabolique" (Guppy & Withers 1999). Les taux de respiration sont alors réduits afin de diminuer la consommation d'ATP de même que les taux de biosynthèse des protéines (Langenbuch & Pörtner 2002; Langenbuch *et al.* 2006). Ces phénomènes peuvent expliquer la diminution de croissance observée chez de nombreux invertébrés dans des conditions de $p\text{CO}_2$ élevées.

Les réponses métaboliques (respiration et excrétion ammoniacale) mesurées chez les crépidules adultes montrent que cette espèce ne présente pas de dépression métabolique sous conditions de $p\text{CO}_2$ élevées comme la majorité des mollusques et autres invertébrés benthiques (Michaelidis *et al.* 2005; Christensen *et al.* 2011; Liu & He 2012; Collard *et al.* 2013; Navarro *et al.* 2013). Cette tolérance de la crépidule peut être due à des mécanismes efficaces de régulation interne de l'équilibre acide-base sous des conditions de $p\text{CO}_2$ élevées. Dans la condition de $p\text{CO}_2$ la plus drastique (1400 μatm), une augmentation d'excrétion ammoniacale a été mesurée chez les crépidules, preuve de la production accrue de protéines, ce qui est suggéré comme mécanisme de compensation permettant la régulation du pH interne (Michaelidis *et al.* 2005; Thomsen & Melzner 2010; Fernandez-Reiriz *et al.* 2011; Fernandez-Reiriz *et al.* 2012). Ces capacités tampons, permettant de protéger le pH extracellulaire (et intracellulaire) des $p\text{CO}_2$ élevées du milieu environnant, sont fortement suspectées chez la crépidule mais restent encore à approfondir. Les mesures de pH réalisées dans l'hémolymphe des adultes maintenus dans différentes conditions de $p\text{CO}_2$ ont en effet montré que les crépidules pouvaient maintenir leur milieu interne à des valeurs plus élevées que celles du milieu ambiant.

2.2 Réponses de calcification

Chez les organismes calcifiants, le processus de calcification est susceptible d'être fortement impacté par l'augmentation de la $p\text{CO}_2$, donnant notamment lieu à des diminutions

de la croissance (Findlay *et al.* 2009). L'impact de la $p\text{CO}_2$ sur la calcification est spécifique de l'espèce et varierait selon trois facteurs principaux : la forme de CaCO_3 sécrétée, la capacité de l'organisme à réguler son équilibre acide-base et l'environnement physico-chimique de la population (Parker *et al.* 2013).

Tous les invertébrés ne forment par leur coquille ou pièces calcifiées avec la même forme de CaCO_3 (Ries *et al.* 2009) et ne sont donc *a priori* pas impactés de la même manière par la diminution de l'état de saturation de l'eau de mer en CaCO_3 (Ω) prévue dans un contexte d'AO. La méta-analyse de Kroeker *et al.* (2010) a mis en évidence de manière surprenante que les invertébrés précipitant de la calcite faiblement magnésienne ou de l'aragonite avaient une calcification plus fortement affectée par l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ que ceux qui formaient de la calcite hautement magnésienne, forme de CaCO_3 normalement la plus soluble. La différence de résistance pourrait alors provenir de la matrice organique protectrice (périostracum chez les mollusques) entourant la coquille plutôt que de la forme de CaCO_3 sécrétée (Ries *et al.* 2009) ou de la capacité à réguler leur pH interne et autour du site de calcification (Findlay *et al.* 2009; Ries 2011b).

L'augmentation de la $p\text{CO}_2$ induit chez de nombreuses espèces une diminution de la calcification (Kroeker *et al.* 2013c). Comme discuté précédemment, les processus de régulation du pH interne n'ont pas la même efficacité chez toutes les espèces. Le stress généré par la diminution du pH peut amener à une redistribution énergétique des ressources de l'organisme au profit des mécanismes de résistance et au détriment de la calcification (Gazeau *et al.* 2013). L'augmentation de la $p\text{CO}_2$ peut aussi induire une diminution générale du métabolisme, la dépression métabolique, impactant la calcification (Pörtner 2008). Cependant cette réponse n'est pas universelle et la calcification de certains organismes peut augmenter de manière très localisée avec la diminution de pH (Wood *et al.* 2008; Findlay *et al.* 2009; Gutowska *et al.* 2010a). L'accumulation des bicarbonates, utilisée par les invertébrés comme processus de régulation du pH interne, peut augmenter Ω au niveau du site de calcification, créant à cet endroit des conditions favorables à la calcification même sous conditions hypercapniques (Hiebenthal *et al.* 2012).

Il a également été suggéré que les organismes exposés régulièrement à de fortes variations des paramètres physico-chimiques et notamment du pH dans leur habitat pouvaient être plus tolérants à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ (Hofmann & Todgham 2010). Des espèces adaptées à de faibles conditions de pH pourraient posséder les mécanismes de compensation

permettant de mieux résister aux futures conditions d'AO (Lannig *et al.* 2010; Waldbusser *et al.* 2011).

La crépidule est une espèce des milieux côtiers, dont les conditions physico-chimiques de l'habitat sont très fluctuantes, ce qui rend potentiellement cette espèce plus résistante à l'augmentation de $p\text{CO}_2$. Elle est capable de maintenir une calcification brute positive, même dans des conditions sous-saturées en CaCO_3 (voir Figure 2 Article n°4). Cependant, quand on considère l'organisme et sa coquille dans son ensemble, le taux de calcification diminue jusqu'à atteindre des taux de dissolution nette dans les conditions de $p\text{CO}_2$ les plus drastiques (1400 μatm). Notre étude met en évidence que, malgré une potentielle régulation interne du pH et une forte capacité de l'organisme à calcifier, les processus de dissolution chimique impactant la coquille des invertébrés benthiques peuvent être très importants et dépasser les capacités de compensation de l'individu. Mesurer la part de processus de dissolution de la coquille et de calcification de l'organisme est nécessaire afin d'observer si la capacité de calcification de l'individu est directement affectée par l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ (Findlay *et al.* 2009; Andersson & Mackenzie 2011).

3. Interaction de l'AO avec d'autres facteurs abiotiques

L'augmentation de la $p\text{CO}_2$ est susceptible d'interagir avec d'autres stress environnementaux, ce qui amène à considérer l'interaction de différents facteurs dans le contexte de changement climatique.

La température est un facteur influençant tous les processus biologiques, de la réaction biochimique à la distribution des espèces. Connaître la fenêtre de tolérance thermique des organismes est crucial pour déterminer les effets de l'AO (Pörtner *et al.* 2005). Les réponses à l'augmentation couplée de la température et de la $p\text{CO}_2$ dépendent principalement de la température témoin de départ utilisée (à partir de laquelle l'augmentation est appliquée) et de sa situation dans la fenêtre de tolérance thermique de l'organisme (Pörtner & Farrell 2008). Pour les organismes dont la température témoin est en dessous de leur optimum, une augmentation de la température pourrait améliorer les performances et la résistance à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$. Au contraire, l'augmentation de la température amenant au-delà de l'optimum thermique exacerbera les effets négatifs de la $p\text{CO}_2$ (Pörtner 2008; Pörtner

2012). Contrairement à de nombreux mollusques dont la sensibilité à la diminution de pH a été accrue par l'augmentation de la température (Lannig *et al.* 2010; Hiebenthal *et al.* 2012; Matozzo *et al.* 2012; Watson *et al.* 2012a; Matozzo *et al.* 2013), la crépidule ne semble pas affectée négativement par le couplage des deux facteurs. On peut donc supposer que la température de 16°C, à partir de laquelle a été faite l'augmentation de 3°C, n'a pas généré de stress important affectant négativement les organismes. La crépidule est une espèce eurytherme qui supporte une large gamme de température (Newell & Kofoed 1977b; Diederich & Pechenik 2013), ce qui laisse supposer un optimum thermique supérieur à 16°C.

La quantité et la qualité de nourriture disponible est un second facteur important influant sur la réponse des mollusques à l'AO, qui a été souligné pour différentes espèces de bivalves (Bechmann *et al.* 2011; Talmage & Gobler 2011; Hettinger *et al.* 2013; Vargas *et al.* 2013). Melzner *et al.* (2011) ont montré que des organismes en bonne santé et bien nourris avaient de meilleures capacités de résistance et de compensation face à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ que les organismes ayant jeûné. La nourriture serait en effet un facteur majeur de régulation de la croissance somatique et de la calcification, conditionnant prioritairement les réponses des organismes à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ (Thomsen *et al.* 2013). Ce paramètre est à prendre en compte dans les expériences sur les l'impact de l'AO sur les invertébrés. Pour obtenir des réponses non biaisées, les organismes devraient être nourris *ad libitum*. Outre la quantité et la qualité de la nourriture, l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ peut impacter les capacités de filtration de certaines espèces (Bamber 1990; Fernandez-Reiriz *et al.* 2011; Navarro *et al.* 2013) ce qui peut également affecter la rendement du métabolisme.

L'AO n'est pas un phénomène isolé et, en zone côtière, de nombreux autres paramètres comme la salinité (Egilsdottir *et al.* 2009; Dickinson *et al.* 2012), la quantité d'oxygène (Pörtner *et al.* 2005; Pörtner & Farrell 2008; Melzner *et al.* 2013) ou la présence de métaux (Han *et al.* 2013; Lewis *et al.* 2013) peuvent influencer les réponses physiologiques des organismes. Les études actuelles tendent à montrer que l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ agit en synergie avec les autres facteurs abiotiques (Parker *et al.* 2013) mais des études testant les effets de stress multiples doivent être menées pour mieux appréhender les réponses des organismes aux futures conditions physico-chimiques des océans.

4. Impacts de l'AO sur les communautés

Les changements de communautés ne sont pas seulement dépendant des réponses physiologiques individuelles des organismes les composant mais résultent aussi de changement des pressions écologiques au sein de l'écosystème. Ainsi, les variations d'abondance spécifique et de diversité des communautés dans un contexte d'AO et de réchauffement climatique sont liés à la fois à la physiologie et aux interactions écologiques des espèces. Des études sur les écosystèmes naturellement acidifiés comme le site d'Ischia en Italie suggèrent que l'AO pourrait causer une réorganisation totale des communautés marines (Hall-Spencer *et al.* 2008; Fabricius *et al.* 2011; Kroeker *et al.* 2011; Porzio *et al.* 2011) mais peu de choses sont connues sur les mécanismes écologiques sous-tendant ces changements et sur les conséquences induites sur le fonctionnement des écosystèmes.

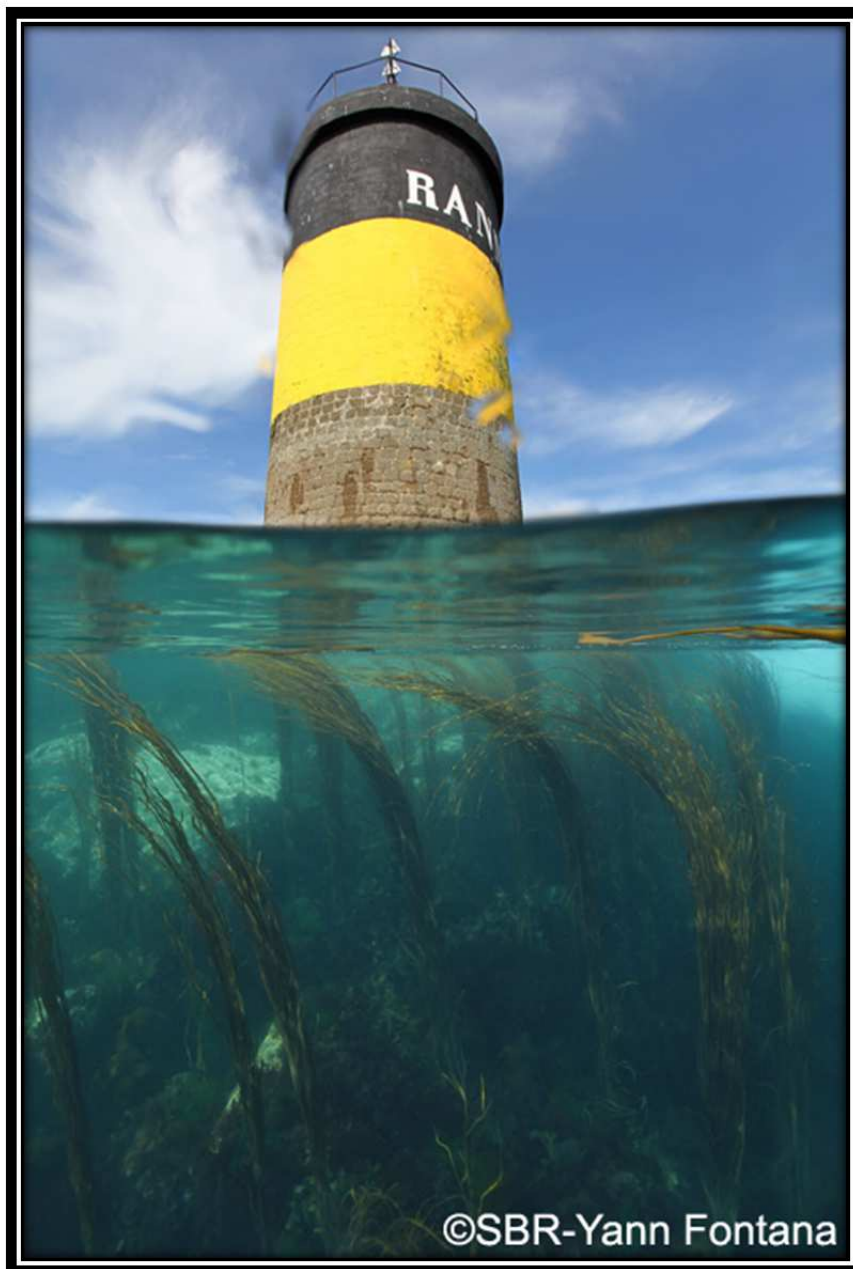
L'impact de l'AO sur les interactions biologiques, et notamment les relations proies-prédateurs, est un domaine relativement peu exploré (Pörtner & Farrell 2008) malgré l'évidence de la diminution de la résistance de la coquille (Ries *et al.* 2009) et des réponses immunitaires (Bibby *et al.* 2008; Matozzo *et al.* 2012) de certaines espèces. Ces interactions proies-prédateurs sont très importantes au sein des communautés car elles exercent par exemple une régulation sur les herbivores brouteurs qui modèlent les communautés algales (Underwood & Jernakoff 1981). Elles sont susceptibles d'être impactées par l'AO, modifiant ainsi la structure des communautés par une cascade d'impacts successifs (Asnaghi *et al.* 2013; Borell *et al.* 2013; Kroeker *et al.* 2013a). Quelques études ont mis en évidence un changement de comportement face à la prédation (stimuli chimiques ou visuels représentant le prédateur) sous des conditions de $p\text{CO}_2$ élevée (Bibby *et al.* 2007; Manriquez *et al.* 2013) mais peu ont étudié simultanément les réponses de la proie et du prédateur à la diminution de pH. Une étude de 5 mois sur la proie *Littorina littorea* et son prédateur *Carcinus maenas* a montré que l'interaction proie-prédateur ne changeait pas dans un contexte d'augmentation de la $p\text{CO}_2$ et de la température malgré un impact négatif sur les performances individuelles de deux espèces (Landes & Zimmer 2012). Parallèlement à la diminution de la résistance de la coquille de la littorine, le crabe développe un muscle de la pince servant à écraser les coquilles plus court et moins puissant, ce qui maintient l'équilibre de prédation présent sous conditions de $p\text{CO}_2$ actuelle. Un suivi de plusieurs années sur les côtes nord-est américaines a montré que l'abondance de deux espèces de balanes avait augmenté potentiellement grâce à la

diminution de la compétition et de la prédation due à une faible diminution de pH (Wootton *et al.* 2008).

Les différences de sensibilité des espèces à l'AO, liées aux capacités physiologiques différentes des organismes, pourraient à long terme entraîner des changements majeurs en terme de diversité, structure et fonctionnement des communautés marines dans l'océan de demain (Fulton 2011; Harley *et al.* 2012; Kroeker *et al.* 2013a). Dans l'une des rares études sur l'impact de l'AO sur les communautés d'invertébrés en mésocosme, Hale *et al.* (2011) ont mis en évidence qu'après 60 jours d'exposition à de faibles pH, les communautés montraient une perte de diversité et des changements de structure avec, notamment, une réduction de la diversité et de l'abondance des mollusques et aucun effet sur les annélides. Des réponses similaires ont également été soulignées dans une récente étude sur d'autres communautés benthiques d'espèces proches (Christen *et al.* 2013). Les expérimentations menées *in situ* sur le site d'Ischia suggèrent que la diminution de pH pourrait réduire la variabilité naturelle de la structure des communautés, donnant lieu à des communautés plus homogènes et plus simples (Kroeker *et al.* 2013a).

La crépidule ne semble pas posséder de prédateurs majeurs dans son aire d'introduction (Thieltges *et al.* 2004) et apparaît très tolérante à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ et de la température, plus résistante que certaines de ses compétitrices comme la coquille Saint-Jacques (Schalkhausser *et al.* 2012; Andersen *et al.* 2013) ou les moules (Michaelidis *et al.* 2005; Berge *et al.* 2006; Thomsen & Melzner 2010; Melzner *et al.* 2011). Cette espèce invasive, qui provoque déjà un fort impact sur les communautés d'accueil, pourrait jouer un rôle encore plus important dans les écosystèmes où elle s'est implantée, influençant la structure et la diversité des communautés côtières nord européennes. Cependant, l'AO est un phénomène qui s'inscrit dans le temps et les réponses des espèces obtenues actuellement ne sont représentatives que du moment présent. Il faut envisager que des processus d'adaptation permettront peut-être aux espèces de développer des mécanismes de résistance à l'AO à travers l'héritage génétique et de survivre dans les océans de demain sans que les fonctions écologiques des écosystèmes ne soient profondément bouleversées.

DISCUSSION et PERSPECTIVES



Discussion générale et perspectives

1. Importance du compartiment benthique dans les écosystèmes côtiers

Les écosystèmes côtiers abritent de multiples communautés benthiques dominées par des espèces ingénieures comme par exemple en Manche et Atlantique Nord Est des algues calcaires (Martin *et al.* 2007b; Basso 2012), des zoostères (Ouisse *et al.* 2011), des mollusques (Gutiérrez *et al.* 2003; Martin *et al.* 2007c) ou des échinodermes (Migné *et al.* 1998; Davoult *et al.* 2009) qui génèrent d'importants flux de carbone et carbonates par les processus de production primaire, respiration et calcification (Gattuso *et al.* 1998). Les flux métaboliques générés par ce compartiment benthique, dont l'intensité est régulée par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques (Staehr *et al.* 2012), influencent les cycles biogéochimiques et impactent les concentrations de CO₂ et d'ions carbonates, l'alcalinité et le pH de la colonne d'eau. Les communautés benthiques sont des éléments moteurs des variations de la chimie des carbonates en zone côtière et les effets de l'AO sur leur physiologie sont susceptibles de bouleverser les flux de carbone et carbonates des écosystèmes côtiers.

Dans beaucoup de zones côtières abritant des populations d'organismes calcifiants, la pCO₂ de l'eau de mer est déjà plus élevée et le pH plus bas que l'équilibre attendu avec la pCO₂ atmosphérique actuelle (Duarte *et al.* 2013; Waldbusser & Salisbury 2013). De plus, ces écosystèmes sont soumis à une grande variabilité des paramètres environnementaux tels que la température, la lumière, la salinité et la quantité de nutriments de par leur proximité avec l'embouchure de fleuves. Dans nombre de ces écosystèmes côtiers proches des littoraux et sous influence estuarienne, le pH côtier peut fluctuer de plus d'une unité pH au cours de la journée (Duarte *et al.* 2013), influencé par de multiples sources (flux métaboliques, apports d'eau douce ...) qui varient en intensité et en direction. Les conditions de faibles pH (et pCO₂ élevées) sont principalement dues à l'hétérotrophie des systèmes dont les taux de reminéralisation de la matière organique dépassent les taux de production primaire (Mackenzie *et al.* 2011). D'autre part, les taux importants de calcification font diminuer l'alcalinité des eaux côtières et libèrent d'importantes quantités de CO₂ (Frankignoulle & Canon 1994). En outre, de nombreux écosystèmes côtiers sont soumis à des variations

nycthémérales de la chimie des carbonates induites par l'intensité des processus de photosynthèse/respiration en fonction de la lumière et des cycles de marée. De ce fait, les conditions physico-chimiques rencontrées dans ces milieux sont souvent bien plus variables et de plus forte amplitude que celles de l'océan ouvert. Dans ces conditions, les diminutions de pH et de concentrations de CO₂ induites par l'AO en milieu côtier pourraient dépasser les prédictions faites pour la fin du siècle par l'IPCC et basées sur un schéma applicable à l'océan ouvert. Les combinaisons entre les apports anthropiques, les flux induits par les communautés et l'hydrologie locale créent des "dynamiques chimiques" localisées où les changements de la chimie des carbonates et du pH peuvent être complètement différents d'une zone à l'autre, rendant très difficiles les prédictions futures de variations du pH et de l'alcalinité (Borges *et al.* 2005; Waldbusser *et al.* 2013a).

2. Impacts de l'AO sur les flux des communautés calcifiantes des milieux tempérés côtiers

Des extrapolations au niveau des populations de maërl et de crépidules faites à partir des taux individuels de production brute, respiration et calcification mesurés durant cette thèse ont mis en évidence un impact de l'AO sur les flux de CO₂ et le stockage du carbone par ces populations (Figure D-1). Dans des conditions de $p\text{CO}_2$ proche des prédictions du RCP 2.6 de l'IPCC 2013 (IPCC 2013) (550 μatm), la production brute des bancs de maërl pourrait augmenter de 20 % sans que la calcification ne soit trop impactée, provoquant une augmentation de la consommation de carbone. Un scénario semblable n'a pas été testé pour les crépidules. Dans un scénario plus pessimiste prévu pour 2100 (750 μatm pour les crépidules et 1000 μatm pour le maërl, valeurs proches des 800 μatm du RCP 6.0), les taux de calcification diminueraient de 63 à 80 % avec l'augmentation de la $p\text{CO}_2$, pour les populations de crépidules et de maërl respectivement, diminuant ainsi le stockage du carbone par précipitation de CaCO₃. Sous le même scénario, les taux de respiration et de production brute de ces deux populations ne seraient que faiblement impactés. Enfin, dans le scénario le plus pessimiste (RCP 8.5, 1370 μatm , IPCC 2013) prévu pour 2100, les populations de crépidules pourraient subir de la dissolution nette dans des conditions de $p\text{CO}_2$ très élevée (1400 μatm), processus consommant du CO₂. Dans cette condition, l'augmentation de l'excrétion des populations de crépidules (+ 13 %) pourrait stimuler la photosynthèse et la

croissance du phytoplancton. Ainsi, grâce aux processus de dissolution et à l'augmentation de la production primaire, l'absorption du CO_2 par l'océan serait de plus en plus importante. Les impacts de l'AO sur la physiologie du maërl et de la crépidule, deux espèces calcifiantes majeures des communautés des eaux côtières bretonnes, seraient donc susceptibles d'entraîner une augmentation des capacités d'absorption du CO_2 de ces communautés benthiques tout en subissant une diminution importante des phénomènes de calcification et donc des pertes de masse.

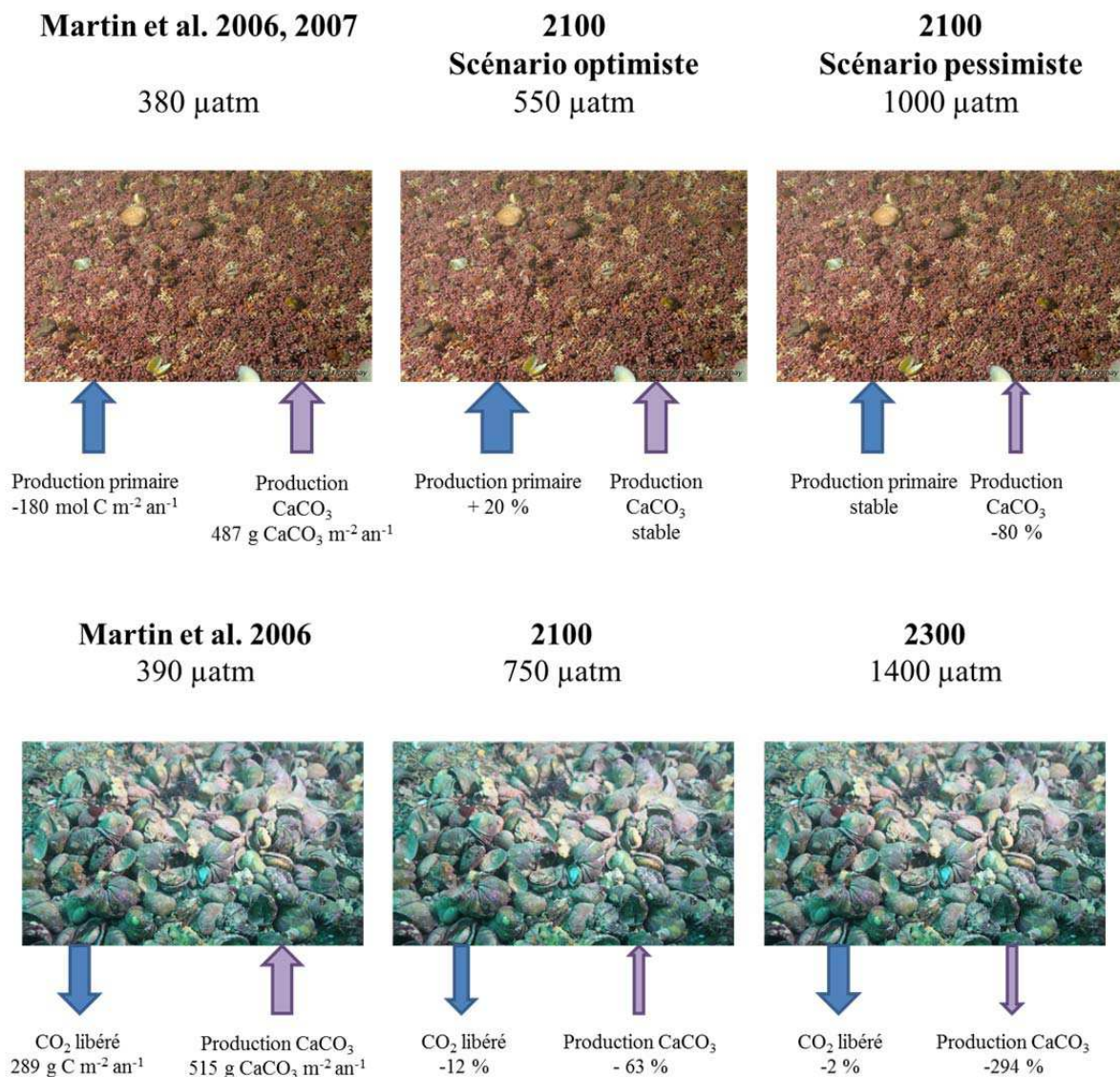


Figure D-11: Flux de carbone (C) et carbonate (CaCO_3) des populations de maërl et crépidules mesurés *in situ* sous des conditions actuelles de $p\text{CO}_2$ (Martin *et al.* 2006a; Martin *et al.* 2006b; Martin *et al.* 2007a) et extrapolées à partir des mesures faites durant cette thèse pour des conditions de $p\text{CO}_2$ prévues pour la fin du siècle. Les flèches bleues représentent les flux de CO_2 assimilé ou libéré par les processus de photosynthèse et de respiration alors que les flèches violette traduisent les flux de CaCO_3 induits par les processus de précipitation et de dissolution. La largeur des flèches est proportionnelle à l'intensité des flux.

De manière plus générale, Mackenzie *et al.* (2011) ont établi par modélisation que les augmentations des concentrations en carbone, azote et phosphore dans les systèmes côtiers mondiaux atteindraient respectivement 7, 23 et 22 % entre la période préindustrielle (1850) et 2100 à cause de l'intensification des forçages anthropiques. Corrélée à l'apport de nutriments, la production primaire pourrait augmenter de 50 % en zone côtière (contre 4 % en zone hauturière) sur cette période. Ceci conduirait à une augmentation de l'accumulation nette de carbone dans les sédiments après dépôt et reminéralisation. En parallèle de cette augmentation de la productivité de l'écosystème, le taux de calcification net des écosystèmes côtiers pourrait diminuer de 65 % entre 1850 et 2100 à cause de la diminution de l'état de saturation de l'eau de mer en CaCO_3 , Ω (Mackenzie *et al.* 2011). La dissolution des carbonates pourrait alors dépasser la production côtière de CaCO_3 au début du 22^{ème} siècle, et les récifs et systèmes accumulant des carbonates pourraient faire face à des pertes de masse considérables (Andersson *et al.* 2005; Andersson *et al.* 2006). Sous ces conditions, les écosystèmes côtiers tempérés européens d'Atlantique Nord et de Manche (proche des littoraux), généralement eutrophes et caractérisés par d'importantes communautés d'organismes benthiques calcifiants (Borges & Gypens 2010), pourraient voir leur production primaire augmenter sous les effets de l'eutrophisation et leur calcification diminuer dans un contexte d'AO. Ainsi, ces écosystèmes pourraient devenir de moins en moins hétérotrophes tout en réduisant le stockage de carbone opéré par le processus de calcification.

Ce changement de régime des écosystèmes pourrait impacter la fonction puits ou source de CO_2 des zones côtières. Alors que les écosystèmes tropicaux sont des sources de CO_2 (Borges *et al.* 2005), les écosystèmes côtiers des côtes européennes sont principalement des puits de CO_2 avec une absorption moyenne de $1,85 \text{ mol m}^{-2} \text{ an}^{-1}$ de CO_2 atmosphérique (Borges *et al.* 2006). Cependant, la Manche et particulièrement sa partie ouest présente un bilan annuel de flux de CO_2 air-eau très légèrement positif ($0,5 \text{ mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ an}^{-1}$; (Borges & Frankignoulle 2003) ou négatif ($0,1$ à $-1,2 \text{ mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ an}^{-1}$; Marec *et al.* 2013) suivant les études et la résolution de mesure. Que ce soit une source ou un puits de CO_2 , sa contribution est très faible et varie suivant la période de l'année (Marrec *et al.* 2013). La rade de Brest où les populations de maërl et crépidules ont une importance majeure dans les flux biogéochimiques (Martin *et al.* 2007b; Martin *et al.* 2007a; Martin *et al.* 2007c) a également un bilan de CO_2 air-mer positif de $0,7 \text{ mol m}^{-2} \text{ an}^{-1}$ (Bozec *et al.* 2011). Ainsi, dans des conditions futures d'AO, la diminution des taux de respiration, l'augmentation des taux de

production brute et la dissolution nette des coquilles de crépidules pourrait augmenter la capacité de puits de CO₂ de la Manche occidentale et de la rade de Brest.

3. Impacts des communautés sur les paramètres de la chimie des carbonates dans un contexte d'AO

Par leurs variations de production primaire, respiration et calcification, les communautés peuvent moduler le pH et l'alcalinité des habitats, modifiant localement les conditions de diminution de pH prévues dans un contexte d'AO. Par exemple, Waldbusser *et al.* (2013a) ont mis en évidence sur les bancs d'huîtres (composés d'organismes vivants et de coquilles vides), que la diminution de pH induite par la respiration des organismes était tamponnée par de la dégradation des coquilles, provoquant une régénération de l'alcalinité dans ces habitats et favorisant le recrutement des larves d'huîtres. Dans un contexte d'AO, la dissolution pourrait augmenter d'avantage et créer des zones à l'alcalinité et au Ω bien plus élevés que sur les milieux adjacents produisant un "refuge" pour les organismes calcifiants dans des conditions plus corrosives. Un phénomène similaire pourrait se produire au niveau des populations de crépidules de Manche et des autres populations dominées par les espèces calcifiantes, potentiellement soumises à des phénomènes de dissolution à l'horizon 2100.

Dans certains récifs tropicaux, les flux de carbone induits par le compartiment benthique se superposent aux émissions de carbone d'origine anthropique, et peuvent dans certaines situations masquer les variations de pH et de la chimie des carbonates induites par le phénomène d'AO (Anthony *et al.* 2011). Les communautés dominées par des producteurs primaires non calcifiants (macroalgues, microalgues benthiques et herbiers de phanérogames) peuvent faire baisser significativement les concentrations de CO₂, contrant localement les effets de l'AO dans les eaux de faible profondeur et faisant remonter Ω dans les habitats proches et connectés (Anthony *et al.* 2013). En fonction de la vitesse du courant et du taux de production primaire, il a été montré que les récifs en aval de communautés importantes d'algues brunes pouvaient bénéficier de leur effet tampon sur le pH environnant, et ce malgré d'autres effets indirects comme la compétition pour l'espace ou pour les nutriments (Anthony *et al.* 2013). De même, Hendricks *et al.* (2013) ont démontré qu'en fonction de l'hydrodynamisme, de la saison et de la taille de l'herbier, le métabolisme des phanérogames

pouvait influencer sur le pH, non seulement au niveau de la sous-canopée mais aussi sur les bancs de sable nus adjacents, sur plusieurs mètres en dehors des limites de l'herbier.

4. Une zone côtière aux multiples stress

De par leur connexion avec le continent, les écosystèmes côtiers proches du littoral sont également soumis à d'autres stress abiotiques venant interagir avec les variations de pH, comme les changements de salinité et de température induits par les arrivées d'eau douce ou les zones d'hypoxie générées par l'eutrophisation des systèmes d'origine anthropique (Borges & Gypens 2010; Melzner *et al.* 2013). Dans les zones côtières soumises à l'hypoxie, l'amplitude du phénomène d'AO est plus importante que dans les différents scénarios prédits pour la fin du siècle dans les zones oxygénées de l'océan. En outre, l'interaction de ces facteurs abiotiques (pH, salinité, concentration d'O₂, UVs, ...) a généralement un effet significatif sur les réponses des organismes marins (Melzner *et al.* 2013) et peut influencer la production primaire, la respiration et la calcification des organismes côtiers qui représentent des processus majeurs de régulation de la chimie des carbonates en zone côtière (Gattuso *et al.* 1998).

De plus, les apports d'eau douce par les fleuves peuvent générer des perturbations physiques (création de fronts entre les masses d'eau) ou biologiques (eaux chargées en matière organique) susceptibles de stratifier les masses d'eau et de perturber localement le pH et l'alcalinité des milieux (Waldbusser & Salisbury 2013). Des événements régionaux comme les upwellings côtiers font remonter en surface des eaux froides des profondeurs, chargées en nutriments et en CO₂. Ils peuvent provoquer une acidification locale et ponctuelle, faisant brutalement diminuer le pH et le Ω des eaux côtières avant que l'apport de nutriments stimule la production phytoplanctonique et fasse rapidement remonter le pH par consommation de CO₂ (Capone & Hutchins 2013). Ces variations locales créent des micro environnements chimiques dans lesquels la diminution globale de pH et de Ω prévue dans un contexte d'AO n'est pas du tout maintenue (Duarte *et al.* 2013).

Le concept général d'AO décrit pour l'océan ouvert est difficilement applicable à la zone côtière de par la variabilité de sa chimie des carbonates et les nombreux facteurs physico-chimiques qui s'y combinent et interagissent avec les communautés benthiques et

pélagiques. Pour prédire les futures variations du pH dans ces environnements côtiers et comprendre les réponses des écosystèmes benthiques à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$, l'accent doit être mis sur l'étude à des échelles locales et une meilleure caractérisation des milieux.

5. Perspectives

Cette thèse est centrée sur deux modèles d'études principaux, les algues Corallinacées et la crépidule. Deux pistes privilégiées, chacune en rapport avec un modèle d'étude, pourraient être explorées dans la continuité du travail déjà initié.

➤ Il a été montré au cours des expériences réalisées durant cette thèse que les réponses à l'AO des macroalgues calcifiantes dépendaient de résistances spécifiques certainement acquises en fonction des variations physico-chimiques de leur habitat. Les différentes canopées algales créent au sein des communautés des microenvironnements au pH différent de la masse d'eau qui impactent les espèces de sous-canopée de manière différente d'un milieu complètement ouvert (Cornwall *et al.* 2013a). Il serait intéressant d'étudier les réponses physiologiques et les processus de compétition spécifique se développant au sein de communautés naturelles de macroalgues en prenant par exemple des assemblages d'espèces présents dans les cuvettes, composés à la fois d'espèces calcifiantes et non calcifiantes et soumises à de fortes variations naturelles de pH.

➤ La crépidule a montré d'importantes capacités de résistance à la diminution de pH/augmentation de la $p\text{CO}_2$, bien supérieure à celles communément admises chez d'autres espèces de mollusques. Une des perspectives de travail serait de caractériser plus précisément la physiologie de cette espèce afin de comprendre ses mécanismes de régulation du pH interne. Cette étude pourrait s'étendre aux différents stades de vie de la crépidule en travaillant notamment sur l'environnement physico-chimique des capsules embryonnaires.

Dans un contexte plus général, ce travail de thèse a mis en évidence que des espèces calcifiantes des milieux tempérés benthiques pouvaient présenter différentes résistances à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$ en fonction de leur habitat naturel mais aussi que leurs réponses pouvaient être modulées par l'interaction de différents facteurs comme le pH et la

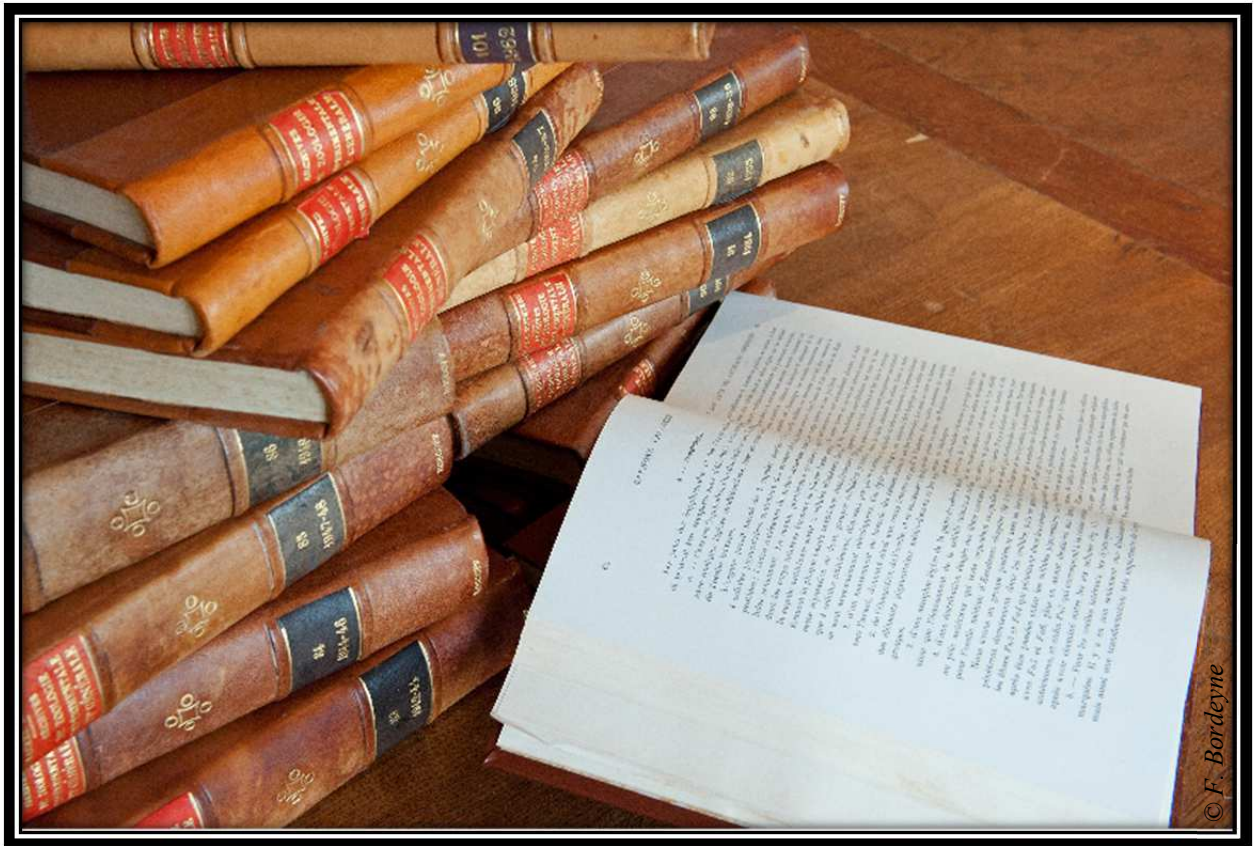
température. Cela amène à développer d'autres perspectives dans le cadre général de la recherche sur l'AO.

➤ Connaître et mesurer précisément les paramètres abiotiques du milieu de vie des espèces étudiées est un élément très important à développer pour les futures expérimentations car il est nécessaire d'appliquer en mésocosme des valeurs de pH réalistes pour tester l'impact futur de l'AO. Les espèces développent des mécanismes de résistance en fonctions des conditions physico-chimiques qu'elles subissent dans leur habitat. Il faut donc appliquer une gamme de pH correspondant aux variations futures pour éviter de sur- (ou sous) évaluer leurs réponses physiologiques. Trop d'études utilisent encore des gammes de pH inappropriées qui ne reflètent pas les variations subies par les organismes dans l'environnement naturel. En outre, les variations de pH au cours du cycle nyctéméral dans les habitats côtiers peuvent atteindre une unité pH et cette rythmicité peut influencer les réponses des organismes, facteur à prendre en compte dans les études d'organismes intertidaux.

➤ En zone côtière, l'interaction entre les différents facteurs abiotiques peut avoir des effets positifs, négatifs ou neutres sur les réponses des organismes comme cela a été montré avec la température. Les études multifactorielles se développent de plus en plus dans le champ de l'AO mais un effort doit être fait pour augmenter le nombre de composantes ou diversifier les facteurs étudiés. Puisque reconstituer en laboratoire la totalité des paramètres *in situ* est impossible, cerner les facteurs majeurs influant sur les systèmes étudiés et les reproduire en mésocosme permettrait d'optimiser les ressources humaines, financières et logistiques tout en observant des réponses physiologiques plus probables dans le contexte futur des océans.

➤ Au cours de cette thèse, les expérimentations sont restées monospécifiques. Or, en milieu naturel, une espèce fait partie d'une biocénose. Les réponses individuelles peuvent être fortement modulées par les interactions biotiques et abiotiques au sein des écosystèmes, ce qui ne peut être observé dans le cadre d'études monospécifiques. Une dernière perspective proposée dans le cadre de cette thèse serait de développer des approches à l'échelle des communautés et écosystèmes afin d'observer les effets des différentes interactions dans des conditions d'AO et les flux globaux réels générés sous conditions d'augmentation de la $p\text{CO}_2$. Déjà mise en place dans des études *in situ* (Ischia ...) cette approche pourrait être développée de façon plus importante en laboratoire mais aussi avec des dispositifs augmentant *in situ* la $p\text{CO}_2$ comme les mésocosmes KOSMOS (Riebesell *et al.* 2013) ou les projets x-FOCE (Kline *et al.* 2012 ; www.mbari.org/highCO2/; <http://efoce.eu/>).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



Références bibliographiques

-A-

- Adey WH (1998) Coral reefs: Algal structured and mediated ecosystems in shallow, turbulent, alkaline waters. *Journal of Phycology* 34: 393-406
- Agegian CR (1985) The biogeochemical ecology of *Porolithon gardineri* (Foslie). PhD dissertation University of Hawaii 178p
- Allen TR (2012) The effects of ocean acidification and sea surface warming on the embryonic development of the opisthobranch gastropod *Stylocheilus stiatius*., Student Research Papers, Fall 2012, UCB Moorea Class: Biology and Geomorphology of Tropical Islands, Berkeley Natural History Museum, UC Berkeley, 18 p
- Amado-Filho GM, Moura RL, Bastos AC, Salgado LT, Sumida PY, Guth AZ, Francini-Filho RB, Pereira-Filho GH, Abrantes DP, Brasileiro PS, Bahia RG, Leal RN, Kaufman L, Kleypas JA, Farina M, Thompson FL (2012) Rhodolith beds are major CaCO₃ bio-factories in the tropical South West Atlantic. *Plos One* 7: e35171
- Andersen S, Grefsrud ES, Harboe T (2013) Effect of increased *p*CO₂ on early shell development in great scallop (*Pecten maximus* Lamarck) larvae. *Biogeosciences Discussions* 10: 3281-3310
- Andersson AJ, Mackenzie FT (2011) Ocean acidification: setting the record straight. *Biogeosciences Discussions* 8: 6161-6190
- Andersson AJ, Mackenzie FT, Lerman A (2005) Coastal ocean and carbonate systems in the high CO₂ world of the anthropocene. *American Journal of Science* 305: 875-918
- Andersson AJ, Mackenzie FT, Lerman A (2006) Coastal ocean CO₂-carbonic acid-carbonate sediment system of the Anthropocene. *Global Biogeochemical Cycles* 20: GBS1S92
- Andersson AJ, Mackenzie FT, Bates NR (2008) Life on the margin: implications of ocean acidification on Mg-calcite, high latitude and cold-water marine calcifiers. *Marine Ecology-Progress Series* 373: 265-273
- Andersson AJ, Mackenzie FT, Gattuso J-P (2011) Effects of ocean acidification on benthic processes, organisms and ecosystems. In: Gattuso J-P, Hansson L (eds) *Ocean acidification*. Oxford University Press, Oxford, pp 122-153
- Andersson AJ, Kuffner IB, Mackenzie FT, Jokiel PL, Rodgers KS, Tan A (2009) Net loss of CaCO₃ from a subtropical calcifying community due to seawater acidification: mesocosm-scale experimental evidence. *Biogeosciences* 6: 1811-1823
- Anger K (1987) The D₀ threshold: a critical point in the larval development of decapod crustaceans. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 108: 15-30

- Anil AC, Desai D, Khandeparker L (2001) Larval development and metamorphosis in *Balanus amphitrite* Darwin (Cirripedia; Thoracica): significance of food concentration, temperature and nucleic acids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 263: 125-141
- Anthony KRN, Kleypas JA, Gattuso J-P (2011) Coral reefs modify their seawater carbon chemistry - implications for impacts of ocean acidification. *Global Change Biology* 17: 3655-3666
- Anthony KRN, Kline DI, Diaz-Pulido G, Dove S, Hoegh-Guldberg O (2008) Ocean acidification causes bleaching and productivity loss in coral reef builders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 17442-17446
- Anthony KRN, Diaz-Pulido G, Verlinden N, Tilbrook B, Andersson AJ (2013) Benthic buffers and boosters of ocean acidification on coral reefs. *Biogeosciences Discussions* 10: 1831-1865
- Arnott DL, Vanni MJ (1996) Nitrogen and phosphorus recycling by the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in the western basin of Lake Erie. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53: 646-659
- Asnaghi V, Chiantore M, Mangialajo L, Gazeau F, Francour P, Alliouane S, Gattuso J-P (2013) Cascading effects of ocean acidification in a rocky subtidal community. *Plos One* 8: e61978
- Aufdenkampe AK, Mayorga E, Raymond PA, Melack JM, Doney SC, Alin SR, Aalto RE, Yoo K (2011) Riverine coupling of biogeochemical cycles between land, oceans, and atmosphere. *Frontiers in Ecology and the Environment* 9: 53-60
- Auzoux-Bordenave S, Badou A, Gaume B, Berland S, Helleouet MN, Milet C, Huchette S (2010) Ultrastructure, chemistry and mineralogy of the growing shell of the European abalone *Haliotis tuberculata*. *Journal of Structural Biology* 171: 277-290

-B-

- Ballantine DL, Weil E, Ruiz H (2005) Coralline white band syndrome, a coralline algal affliction in the tropical Atlantic. *Coral Reefs* 24: 117-117
- Bamber R (1990) The effects of acidic seawater on three species of lamellibranch mollusc. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 143: 181-191
- Barbera C, Bordehore C, Borg JA, Glemarec M, Grall J, Hall-Spencer JM, De La Huz CH, Lanfranco E, Lastra M, Moore PG, Mora J, Pita ME, Ramos-Espla AA, Rizzo M, Sanchez-Mata A, Seva A, Schembri PJ, Valle C (2003) Conservation and management of northeast Atlantic and Mediterranean maerl beds. *Aquatic Conservation : Marine and Freshwater Ecosystems* 13: S65-S76

- Barille L, Cognie B, Beninger P, Decottignies P, Rince Y (2006) Feeding responses of the gastropod *Crepidula fornicata* to changes in seston concentration. *Marine Ecology-Progress Series* 322: 169-178
- Barros P, Sobral P, Range P, Chicharo L, Matias D (2013) Effects of seawater acidification on fertilization and larval development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 440: 200-206
- Barry JP, Tyrrell T, Hansson L, Plattner GK, Gattuso J-P (2010) Atmospheric CO₂ targets for ocean acidification perturbation experiments. In: Riebesell U, Fabry VJ, Hansson L, Gattuso J-P (eds) *Guide to best practices for ocean acidification research and data reporting*, Luxembourg: Publications Office of the European Union, pp 258
- Bartoli M, Nizzoli D, Viaroli P, Turolla E, Castaldelli G, Fano EA, Rossi R (2001) Impact of *Tapes philippinarum* farming on nutrient dynamics and benthic respiration in the Sacca di Goro. *Hydrobiologia* 455: 203-212
- Barton A, Hales B, Waldbusser GG, Langdon C, Feely RA (2012) The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, shows negative correlation to naturally elevated carbon dioxide levels: Implications for near-term ocean acidification effects. *Limnology & Oceanography* 57: 698-710
- Basso D (1996) Adaptive strategies and convergent morphologies in some Mediterranean coralline algae. *Autoecology of selected fossil organisms: achievements and problems*. *Bollettino della Societa Geologica Italiana* 3: 1-8
- Basso D (2012) Carbonate production by calcareous red algae and global change. *Geodiversitas* 34: 13-33
- Bechmann RK, Taban IC, Westerlund S, Godal BF, Arnberg M, Vingen S, Ingvarsdottir A, Baussant T (2011) Effects of ocean acidification on early life stages of shrimp (*Pandalus borealis*) and mussel (*Mytilus edulis*). *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A* 74: 424-438
- Beniash E, Ivanina A, Lieb NS, Kurochkin I, Sokolova IM (2010) Elevated level of carbon dioxide affects metabolism and shell formation in oysters *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology-Progress Series* 419: 95-108
- Bensoussan N, Gattuso J-P (2007) Community primary production and calcification in a NW Mediterranean ecosystem dominated by calcareous macroalgae. *Marine Ecology-Progress Series* 334: 37-45
- Berge JA, Bjerkgeng B, Pettersen O, Schaanning MT, Øxnevad S (2006) Effects of increased sea water concentrations of CO₂ on growth of the bivalve *Mytilus edulis* L. *Chemosphere* 62: 681-687
- Bibby R, Cleall-Harding P, Rundle S, Widdicombe S, Spicer J (2007) Ocean acidification disrupts induced defences in the intertidal gastropod *Littorina littorea*. *Biology Letters* 3: 699-701

- Bibby R, Widdicombe S, Parry H, Spicer J, Pipe R (2008) Effects of ocean acidification on the immune response of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Biology* 2: 67-74
- Bijma J, Pörtner H-O, Yesson C, Rogers AD (2013) Climate change and the oceans - What does the future hold? *Marine Pollution Bulletin* 74: 495-505
- BIOMAERL T (2003) Conservation and management of northeast Atlantic and Mediterranean maerl beds. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 13: S65-S76
- Birket D, Maggs C, Dring M (1998) An overview of dynamic and sensitivity characteristics for conservation management of marine SACs, Oban, Scotland
- Bishop SH, Ellis LL, Burcham JM (1983) Amino acid metabolism in molluscs In: Hochachka PW (ed) *The Mollusca: metabolic biochemistry and molecular biomechanics*, Vol 1. Academic Press, New York, NY, p 234-327
- Björk M, Axelsson L, Beer S (2004) Why is *Ulva intestinalis* the only macroalga inhabiting isolated rockpools along the Swedish Atlantic coast? *Marine Ecology Progress Series* 284: 109-116
- Blake C, Maggs CA (2003) Comparative growth rates and internal banding periodicity of maerl species (Corallinales, Rhodophyta) from northern Europe. *Phycologia* 42: 606-612
- Blanchard M (1995) Origine et état de la population de *Crepidula fornicata* (Gastropoda Prosobranchia) sur le littoral français. *Halictis* 24: 75-86
- Blanchard M (1997) Spread of the slipper limpet *Crepidula fornicata* (L. 1758) in Europe. Current state and consequences. *Scientia Marina* 61: 109-118
- Blanchard M, Hamon D (2006) Bilan du suivi de l'exploitation industrielle de la crépidule en Bretagne Nord (baies de Saint-Brieuc et du Mont Saint-Michel) 2002-2005. R. Ifremer DYNECO/EB/06-01: 42p + annexes
- Bohn K, Richardson C, Jenkins S (2012) The invasive gastropod *Crepidula fornicata*: reproduction and recruitment in the intertidal at its northernmost range in Wales, UK, and implications for its secondary spread. *Marine Biology* 159: 2091-2103
- Borell EM, Steinke M, Fine M (2013) Direct and indirect effects of high $p\text{CO}_2$ on algal grazing by coral reef herbivores from the Gulf of Aqaba (Red Sea). *Coral Reefs*: 1-11
- Borges A, Gypens N (2010) Carbonate chemistry in the coastal zone responds more strongly to eutrophication than to ocean acidification. *Limnology & Oceanography* 55: 346-353
- Borges AV, Frankignoulle M (2003) Distribution of surface carbon dioxide and air-sea exchange in the English Channel and adjacent areas. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 108: 3140
- Borges AV, Delille B, Frankignoulle M (2005) Budgeting sinks and sources of CO_2 in the coastal ocean: Diversity of ecosystems counts. *Geophysical Research Letters* 32: L14601

- Borges AV, Schiettecatte L-S, Abril G, Delille B, Gazeau F (2006) Carbon dioxide in European coastal waters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 70: 375-387
- Boron WF (2004) Regulation of intracellular pH. *Advances in physiology education* 28: 160-179
- Borowitzka MA (1979) Calcium exchange and the measurement of calcification rates in the calcareous coralline red alga *Amphiroa foliacea*. *Marine Biology* 50: 339-347
- Borowitzka MA (1981) Photosynthesis and calcification in the articulated coralline red algae *Amphiroa anceps* and *Amphiroa foliacea*. *Marine Biology* 62: 17-23
- Bosence D, Wilson J (2003) Maerl growth, carbonate production rates and accumulation rates in the northeast Atlantic. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 13: S21-S31
- Bozec Y, Merlivat L, Baudoux AC, Beaumont L, Blain S, Bucciarelli E, Danguy T, Grossteffan E, Guillot A, Guillou J, Repecaud M, Treguer P (2011) Diurnal to inter-annual dynamics of $p\text{CO}_2$ recorded by a CARIOCA sensor in a temperate coastal ecosystem (2003-2009). *Marine Chemistry* 126: 13-26
- Bradassi F, Cumani F, Bressan G, Dupont S (2013) Early reproductive stages in the crustose coralline alga *Phymatolithon lenormandii* are strongly affected by mild ocean acidification. *Marine Biology* 160: 2261-2269
- Branch GM, Borchers P, Brown CR, Donnelly D (1988) Temperature and food as factors influencing oxygen consumption of intertidal organisms, particularly limpets. *American Zoologist* 28: 137-146
- Brante A, Fernandez M, Viard F (2008) Effect of oxygen conditions on intracapsular development in two calyptraeid species with different modes of larval development. *Marine Ecology-Progress Series* 368: 197-207
- Brante A, Fernandez M, Viard F (2009) Limiting factors to encapsulation: the combined effects of dissolved protein and oxygen availability on embryonic growth and survival of species with contrasting feeding strategies. *Journal of Experimental Biology* 212: 2287-2295
- Brennand HS, Soars NA, Dworjanyn SA, Davis AR, Byrne M (2010) Impact of ocean warming and ocean acidification on larval development and calcification in the sea urchin *Tripneustes gratilla*. *Plos One* 5: e11372
- Büdenbender J, Riebesell U, Form A (2011) Calcification of the Arctic coralline red algae *Lithothamnion glaciale* in response to elevated CO_2 . *Marine Ecology-Progress Series* 441: 79-87
- Burdett HL, Aloisio E, Calosi P, Findlay HS, Widdicombe S, Hatton AD, Kamenos NA (2012) The effect of chronic and acute low pH on the intracellular DMSP production and epithelial cell morphology of red coralline algae. *Marine Biology Research* 8: 756-763

- Burnett LE (1997) The challenges of living in hypoxic and hypercapnic aquatic environments. *American Zoologist* 37: 633-640
- Byrne M (2011) Impact of ocean warming and ocean acidification on marine invertebrate life history stages: vulnerabilities and potential for persistence in a changing ocean. In: Gibson R, Atkinson R, Gordon J, Smith I, Hughes D (eds) *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*. Taylor & Francis, pp 1-42
- Byrne M, Ho M, Wong E, Soars NA, Selvakumaraswamy P, Shepard-Brennan HS, Dworjanyn SA, Davis AR (2010) Unshelled abalone and corrupted urchins: development of marine calcifiers in a changing ocean. *Proceedings of the Royal Society of London, B-Biological Sciences* 278: 2376-2383

-C-

- Cabioch J (1966) Contribution à l'étude morphologique anatomique et systématique de deux Melobesies - *Lithothamnium calcareum* (Pallas) Areschoug et *Lithothamnium corallioides* Crouan. *Botanica Marina* 9: 33-53
- Cabioch J (1969) Les fonds de Maerl de la Baie de Morlaix et leur peuplement végétal. *Cahiers de Biologie Marine* 10: 139-161
- Cabioch J (1971) Etude sur les corallinacées 1. Caractères généraux de la cytologie. *Cahiers de Biologie Marine* 12: 121-186
- Cabioch J (1988) Morphogenesis and generic concepts in coralline algae - a reappraisal. *Helgolander Meeresuntersuchungen* 42: 493-509
- Cabioch J, Floch JY, Le Toquin A (1992) Guide des algues des mers d'Europe. In: Niestlé D (ed), pp 231
- Caldeira K, Wickett ME (2003) Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* 425: 365-365
- Capone DG, Hutchins DA (2013) Microbial biogeochemistry of coastal upwelling regimes in a changing ocean. *Nature Geoscience* 6: 711-717
- Catarino AI, Bauwens M, Dubois P (2012) Acid-base balance and metabolic response of the sea urchin *Paracentrotus lividus* to different seawater pH and temperatures. *Environmental Science and Pollution Research* 19: 2344-2353
- Chan KYK, Grunbaum D, O'Donnell MJ (2011) Effects of ocean-acidification-induced morphological changes on larval swimming and feeding. *Journal of Experimental Biology* 214: 3857-3867
- Chaparro OR, Flores ML (2002) Reproductive output of *Crepidula fecunda* females: distribution of energy in the production of gametes and capsular walls. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 36: 661-673

- Chaparro OR, Oyarzun RF, Vergara AM, Thompson RJ (1999) Energy investment in nurse eggs and egg capsules in *Crepidula dilatata* Lamarck (Gastropoda, Calyptraeidae) and its influence on the hatching size of the juvenile. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 232: 261-274
- Chaparro OR, Montory JA, Segura CJ, Pechenik JA (2009a) Effect of reduced pH on shells of brooded veligers in the estuarine bivalve *Ostrea chilensis* Philippi 1845. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 377: 107-112
- Chaparro OR, Segura CJ, Montory JA, Navarro JM, Pechenik JA (2009b) Brood chamber isolation during salinity stress in two estuarine mollusk species: from a protective nursery to a dangerous prison. *Marine Ecology-Progress Series* 374: 145-155
- Chaparro OR, Montiel YA, Segura CJ, Cubillos VM, Thompson RJ, Navarro JM (2008) The effect of salinity on clearance rate in the suspension-feeding estuarine gastropod *Crepidatella dilatata* under natural and controlled conditions. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 76: 861-868
- Chauvaud L, Jean F, Ragueneau O, Thouzeau G (2000) Long-term variation of the Bay of Brest ecosystem: benthic-pelagic coupling revisited. *Marine Ecology-Progress Series* 200: 35-48
- Chauvaud L, Thompson JK, Cloern JE, Thouzeau G (2003) Clams as CO₂ generators: the *Potamocorbula amurensis* example in San Francisco Bay. *Limnology & Oceanography* 48: 2086-2092
- Chipperfield PNJ (1951) The breeding of *Crepidula fornicata* (L) in the river Blackwater, Essex. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 30: 49-71
- Chisholm JRM, Gattuso J-P (1991) Validation of the alkalinity anomaly technique for investigating calcification and photosynthesis in coral-reef communities. *Limnology & Oceanography* 36: 1232-1239
- Christen N, Calosi P, McNeill CL, Widdicombe S (2013) Structural and functional vulnerability to elevated *p*CO₂ in marine benthic communities. *Marine Biology* 160: 2113-2128
- Christensen AB, Nguyen HD, Byrne M (2011) Thermotolerance and the effects of hypercapnia on the metabolic rate of the ophiuroid *Ophionereis schayeri*: Inferences for survivorship in a changing ocean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 403: 31-38
- Chua CM, Leggat W, Moya A, Baird AH (2013) Temperature affects the early life history stages of corals more than near future ocean acidification. *Marine Ecology-Progress Series* 475: 85-92
- Cigliano M, Gambi MC, Rodolfo-Metalpa R, Patti FP, Hall-Spencer JM (2010) Effects of ocean acidification on invertebrate settlement at volcanic CO₂ vents. *Marine Biology* 157: 2489-2502

- Clark MS, Thorne MAS, Amaral A, Vieira F, Batista FM, Reis J, Power DM (2013) Identification of molecular and physiological responses to chronic environmental challenge in an invasive species: the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Ecology and Evolution* 3: 3283-3297
- Clarke A (1983) Life in cold water: the physiological ecology of polar marine ectotherms. *Oceanography and Marine Biology* 21: 341-453
- Clarke A (1991) What is cold adaptation and how should we measure it? *American Zoologist* 31: 81-92
- Clarke A (2003) Costs and consequences of evolutionary temperature adaptation. *Trends in Ecology & Evolution* 18: 573-581
- Coe WR (1936) Sexual phases in *Crepidula*. *Journal of experimental zoology* 72: 455-477
- Cole HA (1952) The American slipper limpet (*Crepidula fornicata* L.) on Cornish oyster beds. *Fishery Investigations Series* 17: 1-13
- Collard M, Catarino AI, Bonnet S, Flammang P, Dubois P (2013) Effects of CO₂-induced ocean acidification on physiological and mechanical properties of the starfish *Asterias rubens*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 446: 355-362
- Collin R (1995) Sex, size, and position: a test of models predicting size at sex change in the protandrous gastropod *Crepidula fornicata*. *American Naturalist* 146: 815-831
- Collin R (2010) Repeatability of egg size in two marine gastropods: brood order and female size do not contribute to intraspecific variation. *Marine Ecology-Progress Series* 410: 89-96
- Collin R, Salazar MZ (2010) Temperature-mediated plasticity and genetic differentiation in egg size and hatching size among populations of *Crepidula* (Gastropoda: Calyptraeidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 99: 489-499
- Comeau S, Carpenter RC, Edmunds PJ (2013) Coral reef calcifiers buffer their response to ocean acidification using both bicarbonate and carbonate. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280: 20122374
- Connell SD, Russell BD (2010) The direct effects of increasing CO₂ and temperature on non-calcifying organisms: increasing the potential for phase shifts in kelp forests. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 277: 1409-1415
- Connell SD, Kroeker KJ, Fabricius KE, Kline DI, Russell BD (2013) The other ocean acidification problem: CO₂ as a resource among competitors for ecosystem dominance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368: 20120442
- Cornwall CE, Hepburn CD, Pilditch CA, Hurd CL (2013a) Concentration boundary layers around complex assemblages of macroalgae: Implications for the effects of ocean acidification on understory coralline algae. *Limnology & Oceanography* 58: 121-130

- Cornwall CE, Hepburn CD, Pritchard D, Currie KI, McGraw CM, Hunter KA, Hurd CL (2012) Carbon-use strategies in macroalgae: differential responses to lowered pH and implications for ocean acidification *Journal of Phycology* 48: 137-144
- Cornwall CE, Hepburn CD, McGraw CM, Currie KI, Pilditch CA, Hunter KA, Boyd PW, Hurd CL (2013b) Diurnal fluctuations in seawater pH influence the response of a calcifying macroalga to ocean acidification. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280
- Cossins AR, Bowler K (1987) *Temperature biology of animals*. Chapman and Hall London
- Costanza R, d'Arge R, De Groot R, Farber S, Grasso M, Hannon B, Limburg K, Naeem S, O'Neill RV, Paruelo J (1997) The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387: 253-260
- Coughlan J (1969) Estimation of filtering rate from clearance of suspensions. *Marine Biology* 2: 356-&
- Crim RN, Sunday JM, Harley CDG (2011) Elevated seawater CO₂ concentrations impair larval development and reduce larval survival in endangered northern abalone (*Haliotis kamtschatkana*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 400: 272-277
- Cummings V, Hewitt J, Van Rooyen A, Currie K, Beard S, Thrush S, Norkko J, Barr N, Heath P, Halliday NJ, Sedcole R, Gomez A, McGraw C, Metcalf V (2011) Ocean acidification at high latitudes: potential effects on functioning of the antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Plos One* 6: e16069

-D-

- Davenport J, Chen X (1987) A comparison of methods for the assessment of condition in the mussel (*Mytilus edulis* L.). *Journal of Molluscan Studies* 53: 293-297
- Davis AR, Coleman D, Broad A, Byrne M, Dworjanyn SA, Przeslawski R (2013) Complex responses of intertidal molluscan embryos to a warming and acidifying ocean in the presence of UV radiation. *Plos One* 8: e55939
- Davoult D, Harlay J, Gentil F (2009) Contribution of a dense population of the brittle star *Acrocnida brachiata* (Montagu) to the biogeochemical fluxes of CO₂ in a temperate coastal ecosystem. *Estuaries and Coasts* 32: 1103-1110
- De Beer D, Larkum AWD (2001) Photosynthesis and calcification in the calcifying algae *Halimeda discoidea* studied with microsensors. *Plant Cell and Environment* 24: 1209-1217
- De Mahieu G, Penchaszadeh P, Casal A (1974) Algunos aspectos de las variaciones de proteínas y aminoácidos libres totales del líquido intracapsular en relación al desarrollo embrionario en *Adelomelon brasiliense* (Lamarck, 1811)(Gastropoda, Prosobranchia, Volutidae). *Cahiers de Biologie Marine* 15: 215-227

- De Montaudoin X, Audemard C, Labourg P-J (1999) Does the slipper limpet (*Crepidula fornicata*, L.) impair oyster growth and zoobenthos biodiversity? A revisited hypothesis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 235: 105-124
- De Montaudouin X, Sauriau PG (1999) The proliferating Gastropoda *Crepidula fornicata* may stimulate macrozoobenthic diversity. *Journal of Marine Biology Association U.K.* 79: 1069-1077
- De Montaudouin X, Audemard C, Labourg P-J (1999) Does the slipper limpet (*Crepidula fornicata*, L.) impair oyster growth and zoobenthos biodiversity? A revisited hypothesis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 235: 105-124
- Decottignies P, Beninger PG, Rincé Y, Riera P (2007a) Trophic interactions between two introduced suspension-feeders, *Crepidula fornicata* and *Crassostrea gigas*, are influenced by seasonal effects and qualitative selection capacity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 342: 231-241
- Decottignies P, Beninger PG, Rince Y, Robins RJ, Riera P (2007b) Exploitation of natural food sources by two sympatric, invasive suspension-feeders: *Crassostrea gigas* and *Crepidula fornicata*. *Marine Ecology-Progress Series* 334: 179-192
- Denman KL, Brasseur G, Chidthaisong, Ciais AP, Cox PM, Dickinson RE, Hauglustaine D, Heinze C, Holland E, Jacob D, Lohmann U, Ramachandran S, da Silva Dias PL, Wofsy SC, Zhang X (2007) Couplings between changes in the climate system and biogeochemistry. In: Solomon S, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M.Tignor and H.L. Miller (ed) *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA
- Deschaseaux ESM, Taylor AM, Maher WA, Davis AR (2010) Cellular responses of encapsulated gastropod embryos to multiple stressors associated with climate change. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 383: 130-136
- Diaz-Pulido G, Anthony KRN, Kline DI, Dove S, Hoegh-Guldberg O (2012) Interactions between ocean acidification and warming on the mortality and dissolution of coralline algae. *Journal of Phycology* 48: 32-39
- Dickinson GH, Ivanina AV, Matoo OB, Pörtner H-O, Lannig G, Bock C, Beniash E, Sokolova IM (2012) Interactive effects of salinity and elevated CO₂ levels on juvenile eastern oysters, *Crassostrea virginica*. *The Journal of experimental biology* 215: 29-43
- Dickson AG, Millero FJ (1987) A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep Sea Research* 34: 1733-1743
- Dickson AG, Afghan JD, Anderson GC (2003) Reference materials for oceanic CO₂ analysis: a method for the certification of total alkalinity. *Marine Chemistry* 80: 185-197

- Dickson AG, Sabine CL, Christian JR (2007) Guide to best practices for ocean CO₂ measurements PICES special publication. North Pacific Marine Science Organization, Sidney, British Columbia, pp 176
- Diederich CM, Pechenik JA (2013) Thermal tolerance of *Crepidula fornicata* (Gastropoda) life history stages from intertidal and subtidal subpopulations. Marine Ecology-Progress Series 486: 173-187
- Digby PSB (1977) Growth and calcification in coralline algae, *Clathromorphum circumscriptum* and *Corallina officinalis*, and significance of pH in relation to precipitation Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 57: 1095-1109
- Dineshram R, Thiyagarajan V, Lane A, Ziniu Y, Xiao S, Leung PY (2013) Elevated CO₂ alters larval proteome and its phosphorylation status in the commercial oyster, *Crassostrea hongkongensis*. Marine Biology 160: 2189-2205
- Dobbertein RA, Pechenik JA (1987) Comparison of larval bioenergetics of 2 marine gastropods with widely differing lengths of planktonic life, *Thais haemastoma canalicula* (Grey) and *Crepidula fornicata* (L). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 109: 173-191
- Doney SC, Fabry VJ, Feely RA, Kleypas JA (2009) Ocean acidification: the other CO₂ problem. Annual Review of Marine Science 1: 169-192
- Doropoulos C, Ward S, Diaz-Pulido G, Hoegh-Guldberg O, Mumby PJ (2012) Ocean acidification reduces coral recruitment by disrupting intimate larval-algal settlement interactions. Ecology Letters 15: 338-346
- Duarte C, Hendriks I, Moore T, Olsen Y, Steckbauer A, Ramajo L, Carstensen J, Trotter J, McCulloch M (2013) Is ocean acidification an open-ocean syndrome? Understanding anthropogenic impacts on seawater pH. Estuaries and Coasts 36: 221-236
- Duckworth A, Peterson B (2013) Effects of seawater temperature and pH on the boring rates of the sponge *Cliona celata* in scallop shells. Marine Biology 160: 27-35
- Dumbauld BR, Ruesink JL, Rumrill SS (2009) The ecological role of bivalve shellfish aquaculture in the estuarine environment: A review with application to oyster and clam culture in West Coast (USA) estuaries. Aquaculture 290: 196-223
- Dupont L (2004) Invasion des côtes française par le mollusque exotique *Crepidula fornicata* : contribution de la dispersion larvaire et du système de reproduction au succès de la colonisation, PhD thesis. Paris: Université Pierre et Marie Curie. 253 p
- Dupont S, Thorndyke M (2009) Impact of CO₂-driven ocean acidification on invertebrates early life-history - What we know, what we need to know and what we can do. Biogeosciences Discussions 6: 3109-3131
- Dupont S, Pörtner H-O (2013) A snapshot of ocean acidification research. Marine Biology 160: 1765-1771

- Dupont S, Dorey N, Thorndyke M (2010a) What meta-analysis can tell us about vulnerability of marine biodiversity to ocean acidification? *Estuarine Coastal and Shelf Science* 89: 182-185
- Dupont S, Ortega-Martinez O, Thorndyke M (2010b) Impact of near-future ocean acidification on echinoderms. *Ecotoxicology* 19: 449-462
- Dupont S, Lundve B, Thorndyke M (2010c) Near future ocean acidification increases growth rate of the lecithotrophic larvae and juveniles of the sea star *Crossaster papposus*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 314B: 382-389
- Dupont S, Havenhand J, Thorndyke W, Peck L, Thorndyke M (2008) Near-future level of CO₂-driven ocean acidification radically affects larval survival and development in the brittlestar *Ophiothrix fragilis*. *Marine Ecology-Progress Series* 373: 285-294
- Dupont S, Dorey N, Stumpp M, Melzner F, Thorndyke M (2012) Long-term and trans-life-cycle effects of exposure to ocean acidification in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Marine Biology*: 1-9
- Dupont S, Dorey N, Stumpp M, Melzner F, Thorndyke M (2013) Long-term and trans-life-cycle effects of exposure to ocean acidification in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Marine Biology* 160: 1835-1843
- Dutertre M (2012) Structuration des habitats benthiques des substrats meubles subtidiaux de la frange côtière de Bretagne sud en relation avec les facteurs environnementaux, Convention IFREMER-AAMP. *RST/IFREMER/ODE/DYNECO/EB/12-03/MD*,

-E-

- Egilsdottir H, Spicer JI, Rundle SD (2009) The effect of CO₂ acidified sea water and reduced salinity on aspects of the embryonic development of the amphipod *Echinogammarus marinus* (Leach). *Marine Pollution Bulletin* 58: 1187-1191
- Egilsdottir H, Noisette F, Noel LMLJ, Olafsson J, Martin S (2013) Effects of pCO₂ on physiology and skeletal mineralogy in a tidal pool coralline alga *Corallina elongata*. *Marine Biology* 160: 2103-2112
- Ehrhold A, Blanchard M, Auffret JP, Garlan T (1998) The role of *Crepidula* proliferation in the modification of the sedimentary tidal environment in Mont-Saint-Michel Bay (The Channel, France). *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie Ii Fascicule a-Sciences de la Terre et des Planetes* 327: 583-588
- Ellis RP, Bersey J, Rundle SD, Hall-Spencer JM, Spicer JI (2009) Subtle but significant effects of CO₂ acidified seawater on embryos of the intertidal snail, *Littorina obtusata*. *Aquatic Biology* 5: 41-48
- Eyster LS (1986) Shell inorganic composition and onset of shell mineralization during bivalve and gastropod embryogenesis. *Biological Bulletin* 170: 211-231

Eyster LS, Pechenik JA (1988) Comparison of growth, respiration, and feeding of juvenile *Crepidula fornicata* (L) following natural or KCl-triggered metamorphosis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 118: 269-279

-F-

Fabricius KE, Langdon C, Uthicke S, Humphrey C, Noonan S, De'ath G, Okazaki R, Muehllehner N, Glas MS, Lough JM (2011) Losers and winners in coral reefs acclimatized to elevated carbon dioxide concentrations. *Nature Climate Change* 1: 165-169

Fabry VJ, Seibel BA, Feely RA, Orr JC (2008) Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *Ices Journal of Marine Science* 65: 414-432

Feely RA, Sabine CL, Takahashi T, Wanninkhof R (2001) Uptake and storage of carbon dioxide in the ocean: the global CO₂ survey. *Oceanography* 14: 18-32

Feely RA, Sabine CL, Hernandez-Ayon JM, Ianson D, Hales B (2008) Evidence for upwelling of corrosive "acidified" water onto the continental shelf. *Science* 320: 1490-1492

Feely RA, Sabine CL, Lee K, Berelson W, Kleypas J, Fabry VJ, Millero FJ (2004) Impact of anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the oceans. *Science* 305: 362-366

Fernandes DAO, Podolsky RD (2012) Effects of ocean acidification on growth, development, and calcification of gastropod embryos: does encapsulation matter? *Integrative and comparative biology* 52: e244-e244

Fernandez-Reiriz MJ, Range P, Alvarez-Salgado XA, Labarta U (2011) Physiological energetics of juvenile clams *Ruditapes decussatus* in a high CO₂ coastal ocean. *Marine Ecology-Progress Series* 433: 97-105

Fernandez-Reiriz MJ, Range P, Alvarez-Salgado XA, Espinosa J, Labarta U (2012) Tolerance of juvenile *Mytilus galloprovincialis* to experimental seawater acidification. *Marine Ecology-Progress Series* 454: 65-74

Figueiredo M, Norton TA, Kain JM (1997) Settlement and survival of epiphytes on two intertidal crustose coralline alga. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 213: 247-260

Findlay H, Wood H, Kendall M, Spicer J, Twitchett R, Widdicombe S (2009) Calcification, a physiological process to be considered in the context of the whole organism. *Biogeosciences Discussions* 6: 2267-2284

Findlay HS, Wood HL, Kendall MA, Spicer JI, Twitchett RJ, Widdicombe S (2011) Comparing the impact of high CO₂ on calcium carbonate structures in different marine organisms. *Marine Biology Research* 7: 565-575

- Foster MS (2001) Rhodoliths: Between rocks and soft places. *Journal of Phycology* 37: 659-667
- Frankignoulle M, Canon C (1994) Marine calcification as a source of carbon-dioxide - Positive feedback of increasing atmospheric CO₂. *Limnology & Oceanography* 39: 458-462
- Fresard M, Boncoeur J (2006) Costs and benefits of stock enhancement and biological invasion control: the case of the Bay of Brest scallop fishery. *Aquatic Living Resources* 19: 299-305
- Fulton EA (2011) Interesting times: winners, losers, and system shifts under climate change around Australia. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* 68: 1329-1342
- Füssel HM (2009) An updated assessment of the risks from climate change based on research published since the IPCC Fourth Assessment Report. *Climatic Change* 97: 469-482

-G-

- Gao KS, Zheng YQ (2010) Combined effects of ocean acidification and solar UV radiation on photosynthesis, growth, pigmentation and calcification of the coralline alga *Corallina sessilis* (Rhodophyta). *Global Change Biology* 16: 2388-2398
- Gao KS, Aruga Y, Asada K, Ishihara T, Akano T, Kiyohara M (1991) Enhanced growth of the red alga *Porphyra yezoensis* Ueda high CO₂ concentrations. *Journal of Applied Phycology* 3: 355-362
- Gao KS, Aruga Y, Asada K, Ishihara T, Akano T, Kiyohara M (1993) Calcification on the articulated coralline alga *Corallina pilulifera*, with special reference to the effect of elevated CO₂ concentration. *Marine Biology* 117: 129-132
- Gattuso J-P, Lavigne H (2009) Technical Note: approaches and software tools to investigate the impact of ocean acidification. *Biogeosciences* 6: 2121-2133
- Gattuso J-P, Hansson L (2011) Ocean acidification. Oxford University Press, pp 326
- Gattuso J-P, Frankignoulle M, Wollast R (1998) Carbon and carbonate metabolism in coastal aquatic ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 405-434
- Gaylord B, Hill TM, Sanford E, Lenz EA, Jacobs LA, Sato KN, Russell AD, Hettinger A (2011) Functional impacts of ocean acidification in an ecologically critical foundation species. *Journal of Experimental Biology* 214: 2586-2594
- Gazeau F, Quiblier C, Jansen JM, Gattuso J-P, Middelburg JJ, Heip CHR (2007) Impact of elevated CO₂ on shellfish calcification. *Geophysical Research Letters* 34: 5
- Gazeau F, Gattuso J-P, Greaves M, Elderfield H, Peene J, Heip CHR, Middelburg JJ (2011) Effect of carbonate chemistry alteration on the early embryonic development of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Plos One* 6: e23010

- Gazeau F, Gattuso J-P, Dawber C, Pronker AE, Peene F, Peene J, Heip CHR, Middelburg JJ (2010) Effect of ocean acidification on the early life stages of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Biogeosciences* 7: 2051-2060
- Gazeau F, Parker L, Comeau S, Gattuso J-P, O'Connor W, Martin S, Pörtner H-O, Ross P (2013) Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. *Marine Biology* 160: 2207-2245
- Gherardi DFM (2004) Community structure and carbonate production of a temperate rhodolith bank from Arvoredo Island, Southern Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography* 52: 207-224
- Giordano M, Beardall J, Raven JA (2005) CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annual Review of Plant Biology*. Annual Reviews, Palo Alto, pp 99-131
- Giraud G, Cabioch J (1979) L'exemple des Corallinacées actuelles [The example of Recent Corallinaceae]. *Bulletin du Centre de Recherche Exploration-Production Elf-Aquitaine* 3: 601-610
- Golubic S, Friedmann I, Schneider J (1981) The lithobiontic ecological niche, with special reference to microorganisms. *Journal of Sedimentary Petrology* 51: 475-478
- Gordillo FJL, Niell FX, Figueroa FL (2001) Non-photosynthetic enhancement of growth by high CO₂ level in the nitrophilic seaweed *Ulva rigida* C. Agardh (Chlorophyta). *Planta* 213: 64-70
- Grall J (2002) Biodiversité spécifique et fonctionnelle du maerl: réponses à la variabilité de l'environnement côtier. PhD thesis, Université de Bretagne Occidentale
- Grall J (2003) Fiche de synthèse des biocénoses: les bancs de maerl. IUEM Ifremer
- Grall J, Hall-Spencer JM (2003) Problems facing maerl conservation in Brittany. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 13: S55-S64
- Grall J, Le Loc'h F, Guyonnet B, Riera P (2006) Community structure and food web based on stable isotopes ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$) analysis of a North Eastern Atlantic maerl bed. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 338: 1-15
- Guillou M, Grall J, Connan S (2002) Can low sea urchin densities control macro-epiphytic biomass in a north-east Atlantic maerl bed ecosystem (Bay of Brest, Brittany, France)? *Journal of the Marine Biological Association, U.K.* 82: 867-876
- Guppy M, Withers P (1999) Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 74: 1-40
- Gutiérrez JL, Jones CG, Strayer DL, Iribarne OO (2003) Mollusks as ecosystem engineers: the role of shell production in aquatic habitats. *Oikos* 101: 79-90
- Gutowska MA, Melzner F (2009) Abiotic conditions in cephalopod (*Sepia officinalis*) eggs: embryonic development at low pH and high pCO₂. *Marine Biology* 156: 515-519

- Gutowska MA, Pörtner H-O, Melzner F (2008) Growth and calcification in the cephalopod *Sepia officinalis* under elevated seawater $p\text{CO}_2$. Marine Ecology-Progress Series 373: 303-309
- Gutowska MA, Melzner F, Pörtner H-O, Meier S (2010a) Cuttlebone calcification increases during exposure to elevated seawater $p\text{CO}_2$ in the cephalopod *Sepia officinalis*. Marine Biology 157: 1653-1663
- Gutowska MA, Melzner F, Langenbuch M, Bock C, Claireaux G, Pörtner H-O (2010b) Acid-base regulatory ability of the cephalopod (*Sepia officinalis*) in response to environmental hypercapnia. Journal of Comparative Physiology B 180: 323-335

-H-

- Hader DP, Lebert M, FloresMoya A, Jimenez C, Mercado J, Salles S, Aguilera J, Figueroa FL (1997) Effects of solar radiation on the photosynthetic activity of the red alga *Corallina elongata* Ellis et Soland. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology 37: 196-202
- Hale R, Calosi P, McNeill L, Mieszkowska N, Widdicombe S (2011) Predicted levels of future ocean acidification and temperature rise could alter community structure and biodiversity in marine benthic communities. Oikos 120: 661-674
- Hall-Spencer JM, Rodolfo-Metalpa R, Martin S, Ransome E, Fine M, Turner SM, Rowley SJ, Tedesco D, Buia MC (2008) Volcanic carbon dioxide vents show ecosystem effects of ocean acidification. Nature 454: 96-99
- Hammer KM, Kristiansen E, Zachariassen KE (2011) Physiological effects of hypercapnia in the deep-sea bivalve *Acesta excavata* (Fabricius, 1779)(Bivalvia; Limidae). Marine Environmental Research 72: 135-142
- Han Z-X, Wu D-D, Wu J, Lv C-X, Liu Y-R (2013) Effects of ocean acidification on toxicity of heavy metals in the bivalve *Mytilus edulis* L. Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry 44: 133-139
- Harley CDG, Anderson KM, Demes KW, Jorve JP, Kordas RL, Coyle TA, Graham MH (2012) Effects of climate change on global seaweed communities. Journal of Phycology 48: 1064-1078
- Harley CDG, Randall Hughes A, Hultgren KM, Miner BG, Sorte CJB, Thornber CS, Rodriguez LF, Tomanek L, Williams SL (2006) The impacts of climate change in coastal marine systems. Ecology Letters 9: 228-241
- Harper EM (2000) Are calcitic layers an effective adaptation against shell dissolution in the Bivalvia? Journal of Zoology 251: 179-186
- Hauri C, Fabricius KE, Schaffelke B, Humphrey C (2010) Chemical and physical environmental conditions underneath mat- and canopy-forming macroalgae, and their effects on understory corals. Plos One 5: e12685

- Hendriks IE, Duarte CM, Alvarez M (2010) Vulnerability of marine biodiversity to ocean acidification: A meta-analysis. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 86: 157-164
- Hendriks IE, Olsen YS, Ramajo L, Basso L, Steckbauer A, Moore TS, Howard J, Duarte CM (2013) Photosynthetic activity buffers ocean acidification in seagrass meadows. *Biogeosciences Discussions* 10: 12313-12346
- Hepburn CD, Pritchard DW, Cornwall CE, McLeod RJ, Beardall J, Raven JA, Hurd CL (2011) Diversity of carbon use strategies in a kelp forest community: implications for a high CO₂ ocean. *Global Change Biology* 17: 2488-2497
- Hettinger A, Sanford E, Hill T, Hosfelt J, Russell A, Gaylord B (2013) The influence of food supply on the response of *Olympia* oyster larvae to ocean acidification. *Biogeosciences Discussions* 10: 5781-5802
- Hickman CS (1999) Adaptive function of gastropod larval shell features. *Invertebrate biology* 118: 346-356
- Hickman CS (2001) Evolution and development of gastropod larval shell morphology: experimental evidence for mechanical defense and repair. *Evolution & Development* 3: 18-23
- Hiebenthal C, Philipp EE, Eisenhauer A, Wahl M (2012) Effects of seawater pCO₂ and temperature on shell growth, shell stability, condition and cellular stress of Western Baltic Sea *Mytilus edulis* (L.) and *Arctica islandica* (L.). *Marine Biology*: 1-15
- Hily C (1991) Is the activity of benthic suspension feeders a factor controlling water quality in the Bay of Brest? *Marine Ecology-Progress Series* 69: 179-188
- Hoagland K (1979) The behavior of three sympatric species of *Crepidula* (Gastropoda: Prosobranchia) from the Atlantic, with implications for evolutionary ecology. *Nautilus* 94: 143-148
- Hoegh-Guldberg O (2009) Climate change and coral reefs: Trojan horse or false prophecy? *Coral Reefs* 28: 569-575
- Hofmann GE, Todgham AE (2010) Living in the now: physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment. *Annual Review of Physiology* 72: 127-145
- Hofmann LC, Straub S, Bischof K (2012a) Competition between calcifying and noncalcifying temperate marine macroalgae under elevated CO₂ levels. *Marine Ecology-Progress Series* 464: 89-105
- Hofmann LC, Straub S, Bischof K (2013) Elevated CO₂ levels affect the activity of nitrate reductase and carbonic anhydrase in the calcifying rhodophyte *Corallina officinalis*. *Journal of Experimental Botany* 64: 899-908
- Hofmann LC, Yildiz G, Hanelt D, Bischof K (2012b) Physiological responses of the calcifying rhodophyte, *Corallina officinalis* (L.), to future CO₂ levels. *Marine Biology* 159: 783-792

- Hofmann M, Schellnhuber H-J (2009) Oceanic acidification affects marine carbon pump and triggers extended marine oxygen holes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 3017-3022
- Hönisch B, Ridgwell A, Schmidt DN, Thomas E, Gibbs SJ, Sluijs A, Zeebe R, Kump L, Martindale RC, Greene SE, Kiessling W, Ries J, Zachos JC, Royer DL, Barker S, Marchitto TM, Moyer R, Pelejero C, Ziveri P, Foster GL, Williams B (2012) The geological record of ocean acidification. *Science* 335: 1058-1063
- Huggett J, Griffiths CL (1986) Some relationships between elevation, physicochemical variables and biota of intertidal rock pools *Marine Ecology-Progress Series* 29: 189-197
- Huning AK, Melzner F, Thomsen J, Gutowska MA, Kramer L, Frickenhaus S, Rosenstiel P, Portner H-O, Philipp EE, Lucassen M (2013) Impacts of seawater acidification on mantle gene expression patterns of the Baltic Sea blue mussel: implications for shell formation and energy metabolism. *Marine Biology* 160: 1845-1861
- Hurd CL, Hepburn CD, Currie KI, Raven JA, Hunter KA (2009) Testing the effects of ocean acidification on algal metabolism: considerations for experimental designs. *Journal of Phycology* 45: 1236-1251
- Hurd CL, Cornwall CE, Currie K, Hepburn CD, McGraw CM, Hunter KA, Boyd PW (2011) Metabolically induced pH fluctuations by some coastal calcifiers exceed projected 22nd century ocean acidification: a mechanism for differential susceptibility? *Global Change Biology* 17: 3254-3262
- I-
- Incze L, Lutz R, Watling L (1980) Relationships between effects of environmental temperature and seston on growth and mortality of *Mytilus edulis* in a temperate northern estuary. *Marine Biology* 57: 147-156
- IPCC (2013) Working Group I Contribution to the IPCC Fifth Assessment Report - *Climate Change 2013: The Physical Science Basis* - Summary for Policymakers
- IPCC IPoCC (2007) Climate change 2007: the AR4 synthesis report. In: Pachauri RK RA (ed) Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge
- Irvine LM, Chamberlain YM (1994) *Seaweeds of the British Isles*. The Natural History Museum, London
- Irving AD, Connell SD, Elsdon TS (2004) Effects of kelp canopies on bleaching and photosynthetic activity of encrusting coralline algae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 310: 1-12

- Israel A, Hophy M (2002) Growth, photosynthetic properties and Rubisco activities and amounts of marine macroalgae grown under current and elevated seawater CO₂ concentrations. *Global Change Biology* 8: 831-840
- Ivanina AV, Dickinson GH, Matoon OB, Bagwe R, Dickinson A, Beniash E, Sokolova IM (2013) Interactive effects of elevated temperature and CO₂ levels on energy metabolism and biomineralization of marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 166

-J-

- Jansen JM, Hummel H, Bonga SW (2009) The respiratory capacity of marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in relation to the high temperature threshold. *Comparative Biochemistry and Physiology A - Molecular & Integrative Physiology* 153: 399-402
- Jansson A, Norkko J, Norkko A (2013) Effects of reduced pH on *Macoma balthica* larvae from a system with naturally fluctuating pH-dynamics. *Plos One* 8: e68198
- Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (1997) *Phytoplankton pigments in oceanography*. Unesco Publishing, Paris
- Johnson MD, Carpenter RC (2012) Ocean acidification and warming decrease calcification in the crustose coralline alga *Hydrolithon onkodes* and increase susceptibility to grazing. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 434-435: 94-101
- Johnson VR, Russell BD, Fabricius KE, Brownlee C, Hall-Spencer JM (2012) Temperate and tropical brown macroalgae thrive, despite decalcification, along natural CO₂ gradients. *Global Change Biology* 18: 2792-2803
- Jokiel PL (2011) Ocean acidification and control of reef coral calcification by boundary layer limitation of proton flux. *Bulletin of Marine Science* 87: 639-657
- Jokiel PL, Rodgers KS, Kuffner IB, Andersson AJ, Cox EF, Mackenzie FT (2008) Ocean acidification and calcifying reef organisms: a mesocosm investigation. *Coral Reefs* 27: 473-483
- Jorgensen CB, Kiorboe T, Mohlenberg F, Riisgard HU (1984) Ciliary and mucus-net filter feeding, with special reference to fluid mechanical characteristics. *Marine Ecology-Progress Series* 15: 283-292

-K-

- Kamenos NA, Moore PG, Hall-Spencer JM (2004a) Small-scale distribution of juvenile gadoids in shallow inshore waters; what role does maerl play? *ICES Journal of Marine Science* 61: 422-429

- Kamenos NA, Moore PG, Hall-Spencer JM (2004b) Nursery-area function of maerl grounds for juvenile queen scallops *Aequipecten opercularis* and other invertebrates. *Marine Ecology-Progress Series* 274: 183-189
- Kamenos NA, Strong SC, Shenoy DM, Wilson ST, Hatton AD, Moore PG (2008) Red coralline algae as a source of marine biogenic dimethylsulphoniopropionate. *Marine Ecology-Progress Series* 372: 61-66
- Kamenos NA, Burdett HL, Aloisio E, Findlay HS, Martin S, Longbone C, Dunn J, Widdicombe S, Calosi P (2013) Coralline algal structure is more sensitive to rate, rather than the magnitude, of ocean acidification. *Global Change Biology*: in press
- Kennedy VS, Mihursky J (1971) Upper temperature tolerances of some estuarine bivalves. *Chesapeake Science* 12: 193-204
- Kim K-S, Shim J, Kim S (2013) Effects of ocean acidification on the larval growth of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Biogeosciences Discussions* 10: 7413-7431
- Kimura R, Takami H, Ono T, Onitsuka T, Nojiri Y (2011) Effects of elevated $p\text{CO}_2$ on the early development of the commercially important gastropod, Ezo abalone *Haliotis discus hannai*. *Fisheries Oceanography* 20: 357-366
- Kline DI, Teneva L, Schneider K, Miard T, Chai A, Marker M, Headley K, Opdyke B, Nash M, Valetich M, Caves JK, Russell BD, Connell SD, Kirkwood BJ, Brewer P, Peltzer E, Silverman J, Caldeira K, Dunbar RB, Koseff JR, Monismith SG, Mitchell BG, Dove S, Hoegh-Guldberg O (2012) A short-term in situ CO_2 enrichment experiment on Heron Island (GBR). *Scientific Reports* 2: 9
- Ko GWK, Chan VBS, Dineshram R, Choi DKS, Li ALJ, Ziniu Y, Thiyagarajan V (2013) Larval and post-larval stages of Pacific oyster *Crassostrea gigas* are resistant to elevated CO_2 . *Plos One* 8: e64147
- Koch M, Bowes G, Ross C, Zhang XH (2013) Climate change and ocean acidification effects on seagrasses and marine macroalgae. *Global Change Biology* 19: 103-132
- Kroeker KJ, Micheli F, Gambi MC (2012) Ocean acidification causes ecosystem shifts via altered competitive interactions. *Nature Climate Change* advance online publication
- Kroeker KJ, Gambi MC, Micheli F (2013a) Community dynamics and ecosystem simplification in a high- CO_2 ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 12721-12726
- Kroeker KJ, Micheli F, Gambi MC (2013b) Ocean acidification causes ecosystem shifts via altered competitive interactions. *Nature Climate Change* 3: 156-159
- Kroeker KJ, Kordas RL, Crim RN, Singh GG (2010) Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. *Ecology Letters* 13: 1419-1434
- Kroeker KJ, Micheli F, Gambi MC, Martz TR (2011) Divergent ecosystem responses within a benthic marine community to ocean acidification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 14515-14520

- Kroeker KJ, Kordas RL, Crim R, Hendriks IE, Ramajo L, Singh GS, Duarte CM, Gattuso J-P (2013c) Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. *Global Change Biology* 19: 1884-1896
- Kubler JE, Johnston AM, Raven JA (1999) The effects of reduced and elevated CO₂ and O₂ on the seaweed *Lomentaria articulata*. *Plant Cell and Environment* 22: 1303-1310
- Kuffner IB, Andersson AJ, Jokiel PL, Rodgers KS, Mackenzie FT (2008) Decreased abundance of crustose coralline algae due to ocean acidification. *Nature Geoscience* 1: 114-117
- Kurihara H (2008) Effects of CO₂-driven ocean acidification on the early developmental stages of invertebrates. *Marine Ecology-Progress Series* 373: 275-284
- Kurihara H, Kato S, Ishimatsu A (2007) Effects of increased seawater pCO₂ on early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Biology* 1: 91-98
- Kurihara H, Asai T, Kato S, Ishimatsu A (2009) Effects of elevated pCO₂ on early development in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Biology* 4: 225-233
- Kurihara H, Takano Y, Kurokawa D, Akasaka K (2012) Ocean acidification reduces biomineralization-related gene expression in the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Marine Biology* 159: 2819-2826

-L-

- Landes A, Zimmer M (2012) Acidification and warming affect both a calcifying predator and prey, but not their interaction. *Marine Ecology-Progress Series* 450: 1-10
- Langdon C, Broecker WS, Hammond DE, Glenn E, Fitzsimmons K, Nelson SG, Peng TH, Hajdas I, Bonani G (2003) Effect of elevated CO₂ on the community metabolism of an experimental coral reef. *Global Biogeochemical Cycles* 17: 1-14
- Langenbuch M, Pörtner H-O (2002) Changes in metabolic rate and N excretion in the marine invertebrate *Sipunculus nudus* under conditions of environmental hypercapnia identifying effective acid-base variables. *Journal of Experimental Biology* 205: 1153-1160
- Langenbuch M, Bock C, Leibfritz D, Pörtner H-O (2006) Effects of environmental hypercapnia on animal physiology: A C-13 NMR study of protein synthesis rates in the marine invertebrate *Sipunculus nudus*. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* 144: 479-484
- Lannig G, Eilers S, Pörtner H-O, Sokolova IM, Bock C (2010) Impact of ocean acidification on energy metabolism of oyster, *Crassostrea gigas* - Changes in metabolic pathways and thermal response. *Marine Drugs* 8: 2318-2339

- Le Cam S (2009) Grégarité, changement de sexe et polyandrie: modalités de la reproduction chez une espèce invasive *Crepidula fornicata*, PhD thesis. Paris: Université Pierre et Marie Curie. 251p
- Le Cam S, Viard F (2011) Infestation of the invasive mollusc *Crepidula fornicata* by the native shell borer *Cliona celata*: a case of high parasite load without detrimental effects. *Biological Invasions* 13: 1087-1098
- Le Pape O, Guéroult D, Désaunay Y (2004) Effect of an invasive mollusc, American slipper limpet *Crepidula fornicata*, on habitat suitability for juvenile common sole *Solea solea* in the Bay of Biscay. *Marine Ecology-Progress Series* 277: 107-115
- Leclercq N, Gattuso J-P, Jaubert J (2000) CO₂ partial pressure controls the calcification rate of a coral community. *Global Change Biology* 6: 329-334
- Lenz M, da Gama BAP, Gerner NV, Gobin J, Groner F, Harry A, Jenkins SR, Kraufvelin P, Mummelthei C, Sareyka J, Xavier EA, Wahl M (2011) Non-native marine invertebrates are more tolerant towards environmental stress than taxonomically related native species: Results from a globally replicated study. *Environmental Research* 111: 943-952
- Leroy F (2011) Influence des conditions trophiques sur le développement larvaire de l'espèce invasive *Crepidula fornicata* : conséquences sur ses capacités de dispersion, PhD thesis. Paris: Université Pierre et Marie Curie. 204 p
- Lewis C, Clemow K, Holt W (2013) Metal contamination increases the sensitivity of larvae but not gametes to ocean acidification in the polychaete *Pomatoceros lamarckii* (Quatrefages). *Marine Biology* 160: 2089-2101
- Lewis E, Wallace DWR (1998) Program developed for CO₂ system calculations. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy
- Li J, Jiang Z, Zhang J, Qiu J-W, Du M, Bian D, Fang J (2013) Detrimental effects of reduced seawater pH on the early development of the Pacific abalone. *Marine Pollution Bulletin* 74: 320-324
- Littler MM (1972) The crustose Corallinaceae. *Annual Review of Oceanography and Marine Biology* 10: 311-347
- Littler MM, Littler DS (1998) An undescribed fungal pathogen of reef-forming crustose coralline algae discovered in American Samoa. *Coral Reefs* 17: 144-144
- Littler MM, Littler DS, Blair SM, Norris JN (1985) Deepest known plant life discovered on an uncharted seamount. *Sciences* 227: 57-59
- Liu J, Weinbauer MG, Maier C, Dai M, Gattuso J-P (2010) Effect of ocean acidification on microbial diversity and on microbe-driven biogeochemistry and ecosystem functioning. *Aquatic Microbial Ecology* 61: 291-305

- Liu W, He M (2012) Effects of ocean acidification on the metabolic rates of three species of bivalve from southern coast of China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 30: 206-211
- Lomovasky BJ, Gutiérrez JL, Iribarne OO (2005) Identifying repaired shell damage and abnormal calcification in the stout razor clam *Tagehus plebeius* as a tool to investigate its ecological interactions. *Journal of Sea Research* 54: 163-175
- Lucas A (1992) Bioénergétique des animaux aquatiques. In: Masson (ed), Paris, pp 179
- Lüthi D, Le Floch M, Bereiter B, Blunier T, Barnola J-M, Siegenthaler U, Raynaud D, Jouzel J, Fischer H, Kawamura K (2008) High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000 - 800,000 years before present. *Nature* 453: 379-382

-M-

- Machado J, Lopes-Lima M, Damasceno-Oliveira A, Colaco A, Andrade J, Silva D, Jimenez-Lopez C, Rodriguez-Navarro A, Checa A (2009) The influence of hydrostatic pressure on shell mineralization of *Anodonta cygnea*: a comparative study with a hydrothermal vent bivalve *Bathymodiolus azoricus*. *Journal of Shellfish Research* 28: 899-904
- Mackenzie FT, Andersson AJ, Arvidson RS, Guidry MW, Lerman A (2011) Land-sea carbon and nutrient fluxes and coastal ocean CO₂ exchange and acidification: Past, present, and future. *Applied Geochemistry* 26, Supplement: S298-S302
- Maeda-Martinez AN (1987) The rates of calcium deposition in shells of molluscan larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* 86: 21-28
- Maeda-Martinez AN (2008) Osmotic and ionic concentration of the egg capsule fluid of *Crepidula fornicata* in relation to embryonic development. *Marine Biology* 154: 643-648
- Malone PG, Dodd JR (1967) Temperature and salinity effects on calcification rate in *Mytilus edulis* and its paleoecological implications. *Limnology & Oceanography* 12: 432-436
- Manriquez PH, Jara ME, Mardones ML, Navarro JM, Torres R, Lardies MA, Vargas CA, Duarte C, Widdicombe S, Salisbury J, Lagos NA (2013) Ocean acidification disrupts prey responses to predator cues but not net prey shell growth in *Concholepas concholepas* (loco). *Plos One* 8: e68643
- Marchant HK, Calosi P, Spicer JI (2010) Short-term exposure to hypercapnia does not compromise feeding, acid-base balance or respiration of *Patella vulgata* but surprisingly is accompanied by radula damage. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 90: 1379-1384
- Marin F, Luquet G (2004) Molluscan shell proteins. *Comptes Rendus - Palevol* 3:469-492

- Marrec P, Cariou T, Collin E, Durand A, Latimier M, Macé E, Morin P, Raimund S, Vernet M, Bozec Y (2013) Seasonal and latitudinal variability of the CO₂ system in the western English Channel based on Voluntary Observing Ship (VOS) measurements. *Marine Chemistry* 155: 29-41
- Marsh AG, Leong PKK, Manahan DT (1999) Energy metabolism during embryonic development and larval growth of an Antarctic sea urchin. *Journal of Experimental Biology* 202: 2041-2050
- Marshall DJ, Perissinotto R, Holley JF (2003) Respiratory responses of the mysid *Gastrosaccus brevifissura* (Peracarida : Mysidacea), in relation to body size, temperature and salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* 134: 257-266
- Martin S, Gattuso J-P (2009) Response of Mediterranean coralline algae to ocean acidification and elevated temperature. *Global Change Biology* 15: 2089-2100
- Martin S, Castets MD, Clavier J (2006a) Primary production, respiration and calcification of the temperate free-living coralline alga *Lithothamnion corallioides*. *Aquatic Botany* 85: 121-128
- Martin S, Charnoz A, Gattuso J-P (2013a) Photosynthesis, respiration and calcification in the Mediterranean crustose coralline alga *Lithophyllum cabiochae* (Corallinales, Rhodophyta). *European Journal of Phycology* 48: 163-172
- Martin S, Clavier J, Chauvaud L, Thouzeau G (2007a) Community metabolism in temperate maerl beds. II. Nutrient fluxes. *Marine Ecology-Progress Series* 335: 31-41
- Martin S, Clavier J, Chauvaud L, Thouzeau G (2007b) Community metabolism in temperate maerl beds. I. Carbon and carbonate fluxes. *Marine Ecology-Progress Series* 335: 19-29
- Martin S, Thouzeau G, Chauvaud L, Jean F, Guérin L (2006b) Respiration, calcification, and excretion of the invasive slipper limpet, *Crepidula fornicata* L.: Implications for carbon, carbonate, and nitrogen fluxes in affected areas. *Limnology & Oceanography* 51: 1996-2007
- Martin S, Cohu S, Vignot C, Zimmerman G, Gattuso J-P (2013b) One-year experiment on the physiological response of the Mediterranean crustose coralline alga, *Lithophyllum cabiochae*, to elevated pCO₂ and temperature. *Ecology and Evolution* 3: 676-693
- Martin S, Thouzeau G, Richard M, Chauvaud L, Jean F, Clavier J (2007c) Benthic community respiration in areas impacted by the invasive mollusk *Crepidula fornicata*. *Marine Ecology-Progress Series* 347: 51-60
- Martin S, Rodolfo-Metalpa R, Ransome E, Rowley S, Buia MC, Gattuso J-P, Hall-Spencer J (2008) Effects of naturally acidified seawater on seagrass calcareous epibionts. *Biology Letters* 4: 689-692

- Martin S, Clavier J, Guarini J-M, Chauvaud L, Hily C, Grall J, Thouzeau G, Jean F, Richard J (2005) Comparison of *Zostera marina* and maerl community metabolism. *Aquatic Botany* 83: 161-174
- Martin S, Richier S, Pedrotti ML, Dupont S, Castejon C, Gerakis Y, Kerros ME, Oberhansli F, Teyssie JL, Jeffree R, Gattuso J-P (2011) Early development and molecular plasticity in the Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus* exposed to CO₂-driven acidification. *Journal of Experimental Biology* 214: 1357-1368
- Martone PT, Alyono M, Stites S (2010) Bleaching of an intertidal coralline alga: untangling the effects of light, temperature, and desiccation. *Marine Ecology-Progress Series* 416: 57-67
- Marxen JC, Becker W, Finke D, Hasse B, Epple M (2003) Early mineralization in *Biomphalaria glabrata*: microscopic and structural results. *Journal of Molluscan Studies* 69: 113-121
- Matoo OB, Ivanina AV, Ullstad C, Beniash E, Sokolova IM (2013) Interactive effects of elevated temperature and CO₂ levels on metabolism and oxidative stress in two common marine bivalves (*Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 164: 545-553
- Matozzo V, Chinellato A, Munari M, Bressan M, Marin MG (2013) Can the combination of decreased pH and increased temperature values induce oxidative stress in the clam *Chamelea gallina* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Marine Pollution Bulletin* 72: 34-40
- Matozzo V, Chinellato A, Munari M, Finos L, Bressan M, Marin MG (2012) First evidence of immunomodulation in bivalves under seawater acidification and increased temperature. *Plos One* 7: e33820
- Mehrbach C, Culberso Ch, Hawley JE, Pytkowic RM (1973) Measurement of apparent dissociation-constants of carbonic-acid in seawater at atmospheric-pressure. *Limnology & Oceanography* 18: 897-907
- Meistertzheim A-L, Tanguy A, Moraga D, Thébault M-T (2007) Identification of differentially expressed genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to prolonged thermal stress. *Febs Journal* 274: 6392-6402
- Melatunan S, Calosi P, Rundle SD, Moody AJ, Widdicombe S (2011) Exposure to elevated temperature and pCO₂ reduces respiration rate and energy status in the periwinkle *Littorina littorea*. *Physiological and Biochemical Zoology* 84: 583-594
- Melatunan S, Calosi P, Rundle SD, Widdicombe S, Moody AJ (2013) Effects of ocean acidification and elevated temperature on shell plasticity and its energetic basis in an intertidal gastropod. *Marine Ecology-Progress Series* 472: 155-168
- Melzner F, Gutowska MA, Langenbuch M, Dupont S, Lucassen M, Thorndyke MC, Bleich M, Pörtner H-O (2009) Physiological basis for high CO₂ tolerance in marine

- ectothermic animals: pre-adaptation through lifestyle and ontogeny? *Biogeosciences* 6: 2313-2331
- Melzner F, Stange P, Trubenbach K, Thomsen J, Casties I, Panknin U, Gorb SN, Gutowska MA (2011) Food supply and seawater $p\text{CO}_2$ impact calcification and internal shell dissolution in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Plos One* 6: e24223
- Melzner F, Thomsen J, Koeve W, Oschlies A, Gutowska MA, Bange HW, Hansen HP, Körtzinger A (2013) Future ocean acidification will be amplified by hypoxia in coastal habitats. *Marine Biology* 160: 1875-1888
- Mesnildrey L, Jacob C, Frangoudes K, Reunavot M, Lesueur M (2012) La filière des macroalgues en France. Rapport d'étude. NETALGAE – Interreg Vb. Les publications du Pôle halieutique AGROCAMPUS OUEST n°9, 38 p
- Metzger R, Sartoris FJ, Langenbuch M, Pörtner H-O (2007) Influence of elevated CO_2 concentrations on thermal tolerance of the edible crab *Cancer pagurus*. *Journal of Thermal Biology* 32: 144-151
- Michaelidis B, Ouzounis C, Palaras A, Pörtner H-O (2005) Effects of long-term moderate hypercapnia on acid-base balance and growth rate in marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology-Progress Series* 293: 109-118
- Middelboe AL, Hansen PJ (2007) High pH in shallow-water macroalgal habitats. *Marine Ecology-Progress Series* 338: 107-117
- Migné A, Davoult D, Gattuso J-P (1998) Calcium carbonate production of a dense population of the brittle star *Ophiothrix fragilis* (Echinodermata: Ophiuroidea): role in the carbon cycle of a temperate coastal ecosystem. *Marine Ecology-Progress Series* 173: 305-308
- Miller AW, Reynolds AC, Sobrino C, Riedel GF (2009) Shellfish face uncertain future in high CO_2 world: influence of acidification on oyster larvae calcification and growth in estuaries. *Plos One* 4: e5661
- Millero FJ (2007) The marine inorganic carbon cycle. *Chemical Reviews* 107: 308-341
- Millero FJ, Graham TB, Huang F, Bustos-Serrano H, Pierrot D (2006) Dissociation constants of carbonic acid in seawater as a function of salinity and temperature. *Marine Chemistry* 100: 80-94
- Montory JA, Chaparro OR, Cubillos VM, Pechenik JA (2009) Isolation of incubation chambers during brooding: effect of reduced pH on protoconch development in the estuarine gastropod *Crepidatella dilatata* (Calyptraeidae). *Marine Ecology-Progress Series* 374: 157-166
- Moran D, Stottrup JG (2011) The effect of carbon dioxide on growth of juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Aquatic Toxicology* 102: 24-30
- Morris S, Taylor AC (1983) Diurnal and seasonal variation in physicochemical conditions within intertidal rock pools. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 17: 339-355

- Morse JW, Andersson AJ, Mackenzie FT (2006) Initial responses of carbonate-rich shelf sediments to rising atmospheric $p\text{CO}_2$ and "ocean acidification": role of high Mg-calcites. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 70: 5814-5830
- Moulin L, Catarino AI, Claessens T, Dubois P (2011) Effects of seawater acidification on early development of the intertidal sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816). *Marine Pollution Bulletin* 62: 48-54
- Munday PL, Gagliano M, Donelson JM, Dixon DL, Thorrold SR (2011) Ocean acidification does not affect the early life history development of a tropical marine fish. *Marine Ecology-Progress Series* 423: 211-221
- Murru M, Sandgren CD (2004) Habitat matters for inorganic carbon acquisition in 38 species of red macroalgae (Rhodophyta) from Puget Sound, Washington, USA. *Journal of Phycology* 40: 837-845

-N-

- Nakicenovic N, Alcamo J, Davis G, de Vries B, Fenhann J, Gaffin S, Gregory K, Grubler A, Jung TY, Kram T (2000) Special report on emissions scenarios: a special report of Working Group III of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Pacific Northwest National Laboratory, Richland, WA (US), Environmental Molecular Sciences Laboratory (US), New York
- Nash MC, Troitzsch U, Opdyke BN, Trafford JM, Russell BD, Kline DI (2011) First discovery of dolomite and magnesite in living coralline algae and its geobiological implications. *Biogeosciences* 8: 3331-3340
- Nash MC, Opdyke BN, Troitzsch U, Russell BD, Adey WH, Kato A, Diaz-Pulido G, Brent C, Gardner M, Prichard J, Kline DI (2013) Dolomite-rich coralline algae in reefs resist dissolution in acidified conditions. *Nature Climate Change* 3: 268-272
- Navarro JM, Chaparro OR (2002) Grazing-filtration as feeding mechanisms in motile specimens of *Crepidula fecunda* (Gastropoda : Calyptraeidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 270: 111-122
- Navarro JM, Torres R, Acuña K, Duarte C, Manriquez PH, Lardies M, Lagos NA, Vargas C, Aguilera V (2013) Impact of medium-term exposure to elevated $p\text{CO}_2$ levels on the physiological energetics of the mussel *Mytilus chilensis*. *Chemosphere* 90: 1242-1248
- Nelson WA (2009) Calcified macroalgae - critical to coastal ecosystems and vulnerable to change: a review. *Marine and Freshwater Research* 60: 787-801
- Neo ML, Todd PA, Teo SLM, Chou LM (2009) Can artificial substrates enriched with crustose coralline algae enhance larval settlement and recruitment in the fluted giant clam (*Tridacna squamosa*)? *Hydrobiologia* 625: 83-90

- Newell R, Kofoed Ldb (1977a) The energetics of suspension-feeding in the gastropod *Crepidula fornicata* L. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 57: 161-180
- Newell RC, Kofoed LH (1977b) Adjustment of components of energy-balance in gastropod *Crepidula fornicata* in response to thermal acclimation. *Marine Biology* 44: 275-286
- Nienhuis S, Palmer AR, Harley CDG (2010) Elevated CO₂ affects shell dissolution rate but not calcification rate in a marine snail. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277: 2553-2558
- Noisette F, Egilsdottir H, Davoult D, Martin S (2013a) Physiological responses of three temperate coralline algae from contrasting habitats to near-future ocean acidification. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 448: 179-187
- Noisette F, Duong G, Six C, Davoult D, Martin S (2013b) Effects of elevated pCO₂ on the metabolism of a temperate rhodolith *Lithothamnion corallioides* grown under different temperatures. *Journal of Phycology* 49: 746-757

-O-

- O'Connor MI, Selig ER, Pinsky ML, Altermatt F (2012) Toward a conceptual synthesis for climate change responses. *Global Ecology and Biogeography* 21: 693-703
- O'Donnell M, Hammond L, Hofmann G (2009) Predicted impact of ocean acidification on a marine invertebrate: elevated CO₂ alters response to thermal stress in sea urchin larvae. *Marine Biology* 156: 439-446
- O'Donnell MJ, Todgham AE, Sewell MA, Hammond LM, Ruggiero K, Fangué NA, Zippay ML, Hofmann GE (2010) Ocean acidification alters skeletogenesis and gene expression in larval sea urchins. *Marine Ecology-Progress Series* 398: 157-171
- Olabarria C, Arenas F, Viejo RM, Gestoso I, Vaz-Pinto F, Incera M, Rubal M, Cacabelos E, Veiga P, Sobrino C (2013) Response of macroalgal assemblages from rockpools to climate change: effects of persistent increase in temperature and CO₂. *Oikos* 122: 1065-1079
- Orr JC, Fabry VJ, Aumont O, Bopp L, Doney SC, Feely RA, Gnanadesikan A, Gruber N, Ishida A, Joos F, Key RM, Lindsay K, Maier-Reimer E, Matear R, Monfray P, Mouchet A, Najjar RG, Plattner GK, Rodgers KB, Sabine CL, Sarmiento JL, Schlitzer R, Slater RD, Totterdell IJ, Weirig MF, Yamanaka Y, Yool A (2005) Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* 437: 681-686
- Orton J (1912) An account of the natural history of the slipper-limpet (*Crepidula fornicata*) with some remarks on its occurrence on the oyster grounds on the Essex coast. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 9: 437-443

Ouisse V, Migne A, Davoult D (2011) Community-level carbon flux variability over a tidal cycle in *Zostera marina* and *Z. noltii* beds. Marine Ecology-Progress Series 437: 79-87

-P-

Padilla-Gamino JL, Kelly MW, Evans TG, Hofmann GE (2013) Temperature and CO₂ additively regulate physiology, morphology and genomic responses of larval sea urchins, *Strongylocentrotus purpuratus*. Proceedings of the Royal Society of London, B: Biological Sciences 280: 20130155

Palmer AR (1992) Calcification in marine molluscs: how costly is it? Proceedings of the National Academy of Sciences 89: 1379-1382

Pansch C, Schlegel P, Havenhand J (2013) Larval development of the barnacle *Amphibalanus improvisus* responds variably but robustly to near-future ocean acidification. ICES Journal of Marine Science 70: 805-811

Parker LM, Ross PM, O'Connor WA (2009) The effect of ocean acidification and temperature on the fertilization and embryonic development of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould 1850). Global Change Biology 15: 2123-2136

Parker LM, Ross PM, O'Connor WA (2010) Comparing the effect of elevated pCO₂ and temperature on the fertilization and early development of two species of oysters. Marine Biology 157: 2435-2452

Parker LM, Ross PM, O'Connor WA, Borysko L, Raftos DA, Portner H-O (2012) Adult exposure influences offspring response to ocean acidification in oysters. Global Change Biology 18: 82-92

Parker LM, Ross PM, O'Connor WA, Pörtner H-O, Scanes E, Wright JM (2013) Predicting the response of molluscs to the impact of ocean acidification. Biology 2: 651-692

Parsons TR, Takahashi M, Hargrave B (1984) Biological oceanographic processes (3rd ed). In: (Eds) BH (ed), Oxford, pp 330

Pawlik JR (1992) Chemical ecology of the settlement of benthic marine invertebrates. Oceanography and Marine Biology - An Annual Review 30: 273-335

Payri C (2000) Production primaire et calcification des algues benthiques et milieu corallien. Océanis 26: 427-463

Pechenik JA (1980) Growth and energy-balance during the larval lives of 3 prosobranch gastropods. . Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 44: 1-28

Pechenik JA (1982) Ability of some gastropod egg capsules to protect against low-salinity stress. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 63: 195-208

- Pechenik JA (1983) Egg capsules of *Nucella lapillus* (L.) protect against low-salinity stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 71: 165-179
- Pechenik JA (1984) The relationship between temperature, growth rate, and duration of planktonic life for larvae of the gastropod *Crepidula fornicata* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 74: 241-257
- Pechenik JA (1986) The encapsulation of eggs and embryos by molluscs: an overview. *American Malacological Bulletin* 4: 165-172
- Pechenik JA (1999) On the advantages and disadvantages of larval stages in benthic marine invertebrate life cycles. *Marine Ecology-Progress Series* 177: 269-297
- Pechenik JA (2006) Larval experience and latent effects: metamorphosis is not a new beginning. *Integrative and Comparative Biology* 46: 323-333
- Pechenik JA, Lima GM (1984) Relationship between growth, differentiation, and length of larval life for individually reared larvae of the marine gastropod *Crepidula fornicata*. *Biological Bulletin* 166: 537-549
- Pechenik JA, Jarrett JN, Rooney J (2002) Relationships between larval nutritional experience, larval growth rates, juvenile growth rates, and juvenile feeding rates in the prosobranch gastropod *Crepidula fornicata*. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 280: 63-78
- Peck LS (2005) Prospects for surviving climate change in Antarctic aquatic species. *Frontiers in Zoology* 2: 1-8
- Peck LS (2011) Organisms and responses to environmental change. *Marine Genomics* 4: 237-243
- Peck LS, Pörtner H-O, Hardewig I (2002) Metabolic demand, oxygen supply, and critical temperatures in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Physiological and Biochemical Zoology* 75: 123-133
- Peck LS, Webb KE, Bailey DM (2004) Extreme sensitivity of biological function to temperature in Antarctic marine species. *Functional Ecology* 18: 625-630
- Peck LS, Souster T, Clark MS (2013a) Juveniles are more resistant to warming than adults in 4 species of Antarctic marine invertebrates. *Plos One* 8: e66033
- Peck LS, Morley SA, Richard J, Clark MS (2013b) Acclimation and thermal tolerance in Antarctic marine ectotherms. *Journal of Experimental Biology* In press
- Peck LS, Clark MS, Morley SA, Massey A, Rossetti H (2009) Animal temperature limits and ecological relevance: effects of size, activity and rates of change. *Functional Ecology* 23: 248-256
- Pena V, Barbara I (2010) Seasonal patterns in the maerl community of shallow European Atlantic beds and their use as a baseline for monitoring studies. *European Journal of Phycology* 45: 327-342

- Plattner GK, Joos F, Stocker TF, Marchal O (2001) Feedback mechanisms and sensitivities of ocean carbon uptake under global warming. *Tellus B* 53: 564-592
- Pörtner H-O (2002) Physiological basis of temperature-dependent biogeography: trade-offs in muscle design and performance in polar ectotherms. *Journal of Experimental Biology* 205: 2217-2230
- Pörtner H-O (2008) Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: a physiologist's view. *Marine Ecology-Progress Series* 373: 203-217
- Pörtner H-O (2010) Oxygen-and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *The Journal of experimental biology* 213: 881-893
- Pörtner H-O (2012) Integrating climate-related stressor effects on marine organisms: unifying principles linking molecule to ecosystem-level changes. *Marine Ecology-Progress Series* 470: 273-290
- Pörtner H-O, Knust R (2007) Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science* 315: 95-97
- Pörtner H-O, Farrell AP (2008) Physiology and climate change. *Science* 322: 690-692
- Pörtner H-O, Langenbuch M, Reipschläger A (2004) Biological impact of elevated ocean CO₂ concentrations: lessons from animal physiology and earth history. *Journal of Oceanography* 60: 705-718
- Pörtner H-O, Langenbuch M, Michaelidis B (2005) Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia, and increases in CO₂ on marine animals: from Earth history to global change. *Journal of Geophysical Research-Oceans* 110: 15
- Pörtner H-O, Peck LS, Hirse T (2006) Hyperoxia alleviates thermal stress in the Antarctic bivalve, *Laternula elliptica*: evidence for oxygen limited thermal tolerance. *Polar Biology* 29: 688-693
- Pörtner H-O, Peck LS, Somero G (2007) Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms: an integrative view. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362: 2233-2258
- Porzio L, Buia MC, Hall-Spencer JM (2011) Effects of ocean acidification on macroalgal communities. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 400: 278-287
- Porzio L, Garrard SL, Buia MC (2013) The effect of ocean acidification on early algal colonization stages at natural CO₂ vents. *Marine Biology* 160: 2247-2259
- Potin P, Floch JY, Augris C, Cabioch J (1990) Annual growth-rate of the calcareous red alga *Lithothamnion corallioides* (Corallinales Rhodophyta) in the Bay of Brest, France *Hydrobiologia* 204: 263-267
- Price NN, Hamilton SL, Tootell JS, Smith JE (2011) Species-specific consequences of ocean acidification for the calcareous tropical green algae *Halimeda*. *Marine Ecology-Progress Series* 440: 67-78

- Provoost P, van Heuven S, Soetaert K, Laane R, Middelburg J (2010) Seasonal and long-term changes in pH in the Dutch coastal zone. *Biogeosciences* 7: 3869-3878
- Przeslawski R (2004) A review of the effects of environmental stress on embryonic development within intertidal gastropod egg masses. *Molluscan Research* 24: 43-63
- Putnam HM, Mayfield AB, Fan TY, Chen CS, Gates RD (2013) The physiological and molecular responses of larvae from the reef-building coral *Pocillopora damicornis* exposed to near-future increases in temperature and $p\text{CO}_2$. *Marine Biology* 160: 2157-2173

-R-

- R Core Team (2013) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- Ragazzola F, Foster LC, Form A, Anderson PSL, Hansteen TH, Fietzke J (2012) Ocean acidification weakens the structural integrity of coralline algae. *Global Change Biology* 18: 2804-2812
- Ragazzola F, Foster LC, Form AU, Büscher J, Hansteen TH, Fietzke J (2013) Phenotypic plasticity of coralline algae in a high CO_2 world. *Ecology and Evolution* 3: 3436-3446
- Ragueneau O, Chauvaud L, Leynaert A, Thouzeau G, Paulet Y-M, Bonnet S, Lorrain A, Grall J, Corvaisier R, Le Hir M (2002) Direct evidence of a biologically active coastal silicate pump: ecological implications. *Limnology & Oceanography* 47: 1849-1854
- Range P, Chicharo MA, Ben-Hamadou R, Pilo D, Matias D, Joaquim S, Oliveira AP, Chicharo L (2011) Calcification, growth and mortality of juvenile clams *Ruditapes decussatus* under increased $p\text{CO}_2$ and reduced pH: Variable responses to ocean acidification at local scales? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 396: 177-184
- Range P, Pilo D, Ben-Hamadou R, Chicharo M, Matias D, Joaquim S, Oliveira A, Chicharo L (2012) Seawater acidification by CO_2 in a coastal lagoon environment: effects on life history traits of juvenile mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 424: 89-98
- Range P, Chicharo MA, Ben-Hamadou R, Pilo D, Fernandez-Reiriz MJ, Labarta U, Marin MG, Bressan M, Matozzo V, Chinellato A, Munari M, El Menif NT, Dellali M, Chicharo L (2013) Impacts of CO_2 -induced seawater acidification on coastal Mediterranean bivalves and interactions with other climatic stressors. *Regional Environmental Change* in press
- Rasband WS (2012) ImageJ version 1.46r. In: Health USNIo (ed) imagej.nih.gov/ij/, 1997-2012., Bethesda, Maryland, USA

- Raupach MR, Marland G, Ciais P, Le Quere C, Canadell JG, Klepper G, Field CB (2007) Global and regional drivers of accelerating CO₂ emissions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104: 10288-10293
- Raven JA (2011) Effects on marine algae of changed seawater chemistry with increasing atmospheric CO₂. *Biology and Environment-Proceedings of the Royal Irish Academy* 111B: 1-17
- Raven JA, Beardall J (2003) Carbon acquisition mechanisms of algae: carbon dioxide diffusion and carbon dioxide concentrating mechanisms. *Photosynthesis in algae*. Springer, pp 225-244
- Raven JA, Hurd CL (2012) Ecophysiology of photosynthesis in macroalgae. *Photosynthesis research* 113: 105-125
- Raven JA, Giordano M, Beardall J, Maberly SC (2012) Algal evolution in relation to atmospheric CO₂: carboxylases, carbon-concentrating mechanisms and carbon oxidation cycles. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 367: 493-507
- Raven JA, Ball LA, Beardall J, Giordano M, Maberly SC (2005) Algae lacking carbon-concentrating mechanisms. *Canadian Journal of Botany* 83: 879-890
- Repeta DJ, Bjørnland T (1997) Preparation of carotenoid standards. In: Jeffrey SW, Mantoura, R.F.C. & Wright, S.W. (ed) *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. UNESCO, Paris, pp 239-260
- Richard J, Huet M, Thouzeau G, Paulet YM (2006) Reproduction of the invasive slipper limpet, *Crepidula fornicata*, in the Bay of Brest, France. *Marine Biology* 149: 789-801
- Richard J, Morley SA, Deloffre J, Peck LS (2012) Thermal acclimation capacity for four Arctic marine benthic species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 424: 38-43
- Riebesell U, Fabry VJ, Hansson L, Gattuso J-P (2010) Guide to best practices for ocean acidification research and data reporting, Luxembourg: Publications Office of the European Union, pp 258
- Riebesell U, Gattuso J-P, Thingstad TF, Middelburg JJ (2013) Preface" Arctic ocean acidification: pelagic ecosystem and biogeochemical responses during a mesocosm study". *Biogeosciences* 10: 5619-5626
- Riebesell U, Schulz KG, Bellerby RGJ, Botros M, Fritsche P, Meyerhofer M, Neill C, Nondal G, Oschlies A, Wohlers J, Zollner E (2007) Enhanced biological carbon consumption in a high CO₂ ocean. *Nature* 450: 545-U510
- Ries JB (2011a) Skeletal mineralogy in a high-CO₂ world. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 403: 54-64
- Ries JB (2011b) A physicochemical framework for interpreting the biological calcification response to CO₂-induced ocean acidification. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 75: 4053-4064

- Ries JB, Cohen AL, McCorkle DC (2009) Marine calcifiers exhibit mixed responses to CO₂-induced ocean acidification. *Geology* 37: 1131-1134
- Rigal F (2009) Dynamique spatio-temporelle du nuage larvaire du gastéropode introduit *Crepidula fornicata* au sein d'une baie mégatidale, la baie de Morlaix (France), PhD thesis. Paris: Université Pierre et Marie Curie. 160p
- Ritchie RJ (2008) Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica* 46: 115-126
- Ross PM, Parker LM, O'Connor WA, Bailey EA (2011) The impact of ocean acidification on reproduction, early development and settlement of marine organisms. *Water* 3: 1005-1030
- Roy S, Llewellyn C, Egelan E, Johnsen G (2011) Phytoplankton pigments, characterization, chemotaxonomy and applications oceanography. In: Series CEC (ed). Cambridge, pp 874
- Rumrill SS (1990) Natural mortality of marine invertebrate larvae. *Ophelia* 32: 163-198
- Russell BD, Thompson JA, Falkenberg LJ, Connell SD (2009) Synergistic effects of climate change and local stressors: CO₂ and nutrient-driven change in subtidal rocky habitats. *Global Change Biology* 15: 2153-2162

-S-

- Sabine CL, Feely RA, Gruber N, Key RM, Lee K, Bullister JL, Wanninkhof R, Wong CS, Wallace DWR, Tilbrook B, Millero FJ, Peng TH, Kozyr A, Ono T, Rios AF (2004) The oceanic sink for anthropogenic CO₂. *Science* 305: 367-371
- Sandrini-Neto L, Camargo MG (2012) GAD: an R package for ANOVA designs from general principles, Available on CRAN
- Schalkhauser B, Bock C, Stemmer K, Brey T, Pörtner H-O, Lannig G (2012) Impact of ocean acidification on escape performance of the king scallop, *Pecten maximus*, from Norway. *Marine Biology*: 1-12
- Schoenn J (2013) Définitions et quantification des fonctions écologiques dans le golfe Normano-Breton. Une étape dans l'évaluation des biens et services écosystémiques d'une future Aire Marine Protégée.
- Schönitzer V, Weiss IM (2007) The structure of mollusc larval shells formed in the presence of the chitin synthase inhibitor Nikkomycin Z. *BMC structural biology* 7: 71
- Schubert N, Garcia-Mendoza E, Pacheco-Ruiz I (2006) Carotenoid composition of marine red algae. *Journal of Phycology* 42: 1208-1216

- Schulte EH (1975) Influence of algal concentration and temperature on the filtration rate of *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 30: 331-341
- Semesi IS, Kangwe J, Bjork M (2009a) Alterations in seawater pH and CO₂ affect calcification and photosynthesis in the tropical coralline alga, *Hydrolithon* sp (Rhodophyta). *Estuarine Coastal and Shelf Science* 84: 337-341
- Semesi IS, Beer S, Bjork M (2009b) Seagrass photosynthesis controls rates of calcification and photosynthesis of calcareous macroalgae in a tropical seagrass meadow. *Marine Ecology-Progress Series* 382: 41-47
- Shirayama Y, Thornton H (2005) Effect of increased atmospheric CO₂ on shallow water marine benthos. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 110 (C09S08): 1-8
- Six C, Worden AZ, Rodriguez F, Moreau H, Partensky F (2005) New insights into the nature and phylogeny of prasinophyte antenna proteins: *Ostreococcus tauri*, a case study. *Molecular Biology and Evolution* 22: 2217-2230
- Smith AD, Roth AA (1979) Effect of carbon-dioxide concentration on calcification in the red coralline alga *Bossiella orbigniana*. *Marine Biology* 52: 219-225
- Smith AM, Sutherland JE, Kregting L, Farr TJ, Winter DJ (2012) Phylomineralogy of the coralline red algae: correlation of skeletal mineralogy with molecular phylogeny. *Phytochemistry* 81: 97-108
- Smith SV, Key GS (1975) Carbon-dioxide and metabolism in marine environments. *Limnology & Oceanography* 20: 493-495
- Sokolova IM, Pörtner H-O (2003) Metabolic plasticity and critical temperatures for aerobic scope in a eurythermal marine invertebrate (*Littorina saxatilis*, Gastropoda : Littorinidae) from different latitudes. *Journal of Experimental Biology* 206: 195-207
- Solomon S, Quin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt K, Tignor M, Miller H (2007) Contribution of working group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge, pp 996
- Solorzano L (1969) Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnology & Oceanography* 14: 799-801
- Somero G (2010) The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine "winners" and "losers". *Journal of Experimental Biology* 213: 912-920
- Speijer RP, Scheibner C, Stassen P, Morsi AMM (2012) Response of marine ecosystems to deep-time global warming: a synthesis of biotic patterns across the Paleocene-Eocene thermal maximum (PETM). *Austrian Journal of Earth Sciences* 105: 6-16
- Staehr P, Testa J, Kemp WM, Cole J, Sand-Jensen K, Smith S (2012) The metabolism of aquatic ecosystems: history, applications, and future challenges. *Aquatic Sciences* 74: 15-29

- Steller DL, Hernandez-Ayon JM, Riosmena-Rodriguez R, Cabello-Pasini A (2007) Effect of temperature on photosynthesis, growth and calcification rates of the free-living coralline alga *Lithophyllum margaritae*. *Ciencias Marinas* 33: 441-456
- Steneck RS (1986) The ecology of coralline algal crusts - convergent patterns and adaptative strategies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17: 273-303
- Stillman JH (2003) Acclimation capacity underlies susceptibility to climate change. *Science* 301: 65-65
- Stumpff M, Wren J, Melzner F, Thorndyke MC, Dupont ST (2011) CO₂ induced seawater acidification impacts sea urchin larval development I: Elevated metabolic rates decrease scope for growth and induce developmental delay. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* 160: 331-340
- Sunday JM, Crim RN, Harley CDG, Hart MW (2011) Quantifying rates of evolutionary adaptation in response to ocean acidification. *Plos One* 6: e22881
- Sylvester F, Dorado J, Boltovskoy D, Juarez A, Cataldo D (2005) Filtration rates of the invasive pest bivalve *Limnoperna fortunei* as a function of size and temperature. *Hydrobiologia* 534: 71-80

-T-

- Talmage SC, Gobler CJ (2009) The effects of elevated carbon dioxide concentrations on the metamorphosis, size, and survival of larval hard clams (*Mercenaria mercenaria*), bay scallops (*Argopecten irradians*), and Eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Limnology & Oceanography* 54: 2072-2080
- Talmage SC, Gobler CJ (2010) Effects of past, present, and future ocean carbon dioxide concentrations on the growth and survival of larval shellfish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 17246-17251
- Talmage SC, Gobler CJ (2011) Effects of elevated temperature and carbon dioxide on the growth and survival of larvae and juveniles of three species of northwest Atlantic bivalves. *Plos One* 6: 12
- Talmage SC, Gobler CJ (2012) Effects of past, present, and future ocean carbon dioxide concentrations on the growth and survival of larval shellfish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 17246-17251
- Teichert S, Woelkerling W, Rugeberg A, Wisshak M, Piepenburg D, Meyerhofer M, Form A, Budenbender J, Freiwald A (2012) Rhodolith beds (Corallinales, Rhodophyta) and their physical and biological environment at 80 degrees 31 ' N in Nordkappbukta (Nordaustlandet, Svalbard Archipelago, Norway). *Phycologia* 51: 371-390
- TheRoyalSociety (2005) Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. Policy document 12/05, June 2005, The Royal Society, London, 60 pp., <http://www.royalsoc.ac.uk/document.asp?tip=0&id=3249>.

- Thieltges DW, Strasser M, Reise K (2006) How bad are invaders in coastal waters? The case of the American slipper limpet *Crepidula fornicata* in western Europe. *Biological Invasions* 8: 1673-1680
- Thieltges DW, Strasser M, van Beusekom JE, Reise K (2004) Too cold to prosper: winter mortality prevents population increase of the introduced American slipper limpet *Crepidula fornicata* in northern Europe. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 311: 375-391
- Thiyagarajan V, Ko GWK (2012) Larval growth response of the Portuguese oyster (*Crassostrea angulata*) to multiple climate change stressors. *Aquaculture* 370-371: 90-95
- Thomsen J, Melzner F (2010) Moderate seawater acidification does not elicit long-term metabolic depression in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 157: 2667-2676
- Thomsen J, Casties I, Pansch C, Kortzinger A, Melzner F (2013) Food availability outweighs ocean acidification effects in juvenile *Mytilus edulis*: laboratory and field experiments. *Global Change Biology* 19: 1017-1027
- Thomsen J, Gutowska MA, Saphorster J, Heinemann A, Trubenbach K, Fietzke J, Hiebenthal C, Eisenhauer A, Kortzinger A, Wahl M, Melzner F (2010) Calcifying invertebrates succeed in a naturally CO₂-rich coastal habitat but are threatened by high levels of future acidification. *Biogeosciences* 7: 3879-3891
- Thorson G (1950) Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biological Reviews* 25: 1-45
- Thouzeau G, Chauvaud L, Grall J, Guérin L (2000) Rôle des interactions biotiques sur le devenir du pré-recrutement et la croissance de *Pecten maximus* (L.) en rade de Brest. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 323: 815-825
- Timmins-Schiffman E, O'Donnell MJ, Friedman CS, Roberts SB (2012) Elevated pCO₂ causes developmental delay in early larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*: 1-10
- Todgham AE, Hofmann GE (2009) Transcriptomic response of sea urchin larvae *Strongylocentrotus purpuratus* to CO₂-driven seawater acidification. *Journal of Experimental Biology* 212: 2579-2594
- Tomanek L, Zuzow MJ, Ivanina AV, Beniash E, Sokolova IM (2011) Proteomic response to elevated pCO₂ level in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: evidence for oxidative stress. *Journal of Experimental Biology* 214: 1836-1844
- Tribollet A (2008) The boring microflora in modern coral reef ecosystems: a review of its roles. In: Tapanila W (ed) *Current Developments in Bioerosion*. Springer Berlin Heidelberg, pp 67-94

- Tribollet A, Payri C (2001) Bioerosion of the coralline alga *Hydrolithon onkodes* by microborers in the coral reefs of Moorea, French Polynesia. *Oceanologica Acta* 24: 329-342
- Tribollet A, Godinot C, Atkinson M, Langdon C (2009) Effects of elevated $p\text{CO}_2$ on dissolution of coral carbonates by microbial euendoliths. *Global Biogeochemical Cycles* 23: GB3008
- Truchot JP, Duhameljouve A (1980) Oxygen and carbon-dioxyde in the marine inter-tidal environment - diurnal and tidal changes in rockpools. . *Respiration Physiology* 39: 241-254

-U-

- Underwood AJ, Jernakoff P (1981) Effects of interactions between algae and grazing gastropods on the structure of a low-shore inter-tidal algal community. *Oecologia* 48: 221-233

-V-

- Van Colen C, Debusschere E, Braeckman U, Van Gansbeke D, Vincx M (2012) The early life history of the clam *Macoma balthica* in a high CO_2 world. *Plos One* 7: e44655
- Vargas CA, de la Hoz M, Aguilera V, San Martin V, Manriquez PH, Navarro JM, Torres R, Lardies MA, Lagos NA (2013) CO_2 -driven ocean acidification reduces larval feeding efficiency and change food selectivity in the mollusk *Concholepas concholepas*. *Journal of Plankton Research* in press
- Vaz-Pinto F, Olabarria C, Gestoso I, Cacabelos E, Incera M, Arenas F (2013) Functional diversity and climate change: effects on the invasibility of macroalgal assemblages. *Biological Invasions* 15: 1833-1846
- Vehmaa A, Brutemark A, Engström-Öst J (2012) Maternal effects may act as an adaptation mechanism for copepods facing pH and temperature changes. *Plos One* 7: e48538
- Viard F, Ellien C, Dupont L (2006) Dispersal ability and invasion success of *Crepidula fornicata* in a single gulf: insights from genetic markers and larval-dispersal model. *Helgoland Marine Research* 60: 144-152
- von Bertalanffy L (1951) Metabolic types and growth types. *The American Naturalist* 85: 111-117
- von Bertalanffy L (1964) Basic concepts in quantitative biology of metabolism. *Helgoland Marine Research* 9: 5-37

-W-

- Waldbusser GG, Salisbury JE (2013) Ocean acidification in the coastal zone from an organism's perspective: multiple system parameters, frequency domains, and habitats. Annual Review of Marine Science in press
- Waldbusser GG, Powell EN, Mann R (2013a) Ecosystem effects of shell aggregations and cycling in coastal waters: an example of Chesapeake Bay oyster reefs. Ecology 94: 895-903
- Waldbusser GG, Voigt EP, Bergschneider H, Green MA, Newell RI (2011) Biocalcification in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) in relation to long-term trends in Chesapeake Bay pH. Estuaries and Coasts 34: 221-231
- Waldbusser GG, Brunner EL, Haley BA, Hales B, Langdon CJ, Pahl FG (2013b) A developmental and energetic basis linking larval oyster shell formation to acidification sensitivity. Geophysical Research Letters 40: 2171-2176
- Watson S-A, Southgate PC, Tyler PA, Peck LS (2009) Early larval development of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* under near-future predictions of CO₂-driven ocean acidification. Journal of Shellfish Research 28: 431-437
- Watson S-A, Southgate PC, Miller GM, Moorhead JA, Knauer J (2012a) Ocean acidification and warming reduce juvenile survival of the fluted giant clam, *Tridacna squamosa*. Molluscan Research 32: 177-180
- Watson S-A, Peck LS, Tyler PA, Southgate PC, Tan KS, Day RW, Morley SA (2012b) Marine invertebrate skeleton size varies with latitude, temperature and carbonate saturation: implications for global change and ocean acidification. Global Change Biology 18: 3026-3038
- Weiss IM, Tuross N, Addaddi I, Weiner S (2002) Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. Journal of Experimental Zoology 293: 478-491
- White MM, McCorkle DC, Mullineaux LS, Cohen AL (2013) Early exposure of bay scallops (*Argopecten irradians*) to high CO₂ causes a decrease in larval shell growth. Plos One 8: e61065
- Whiteley NM (2011) Physiological and ecological responses of crustaceans to ocean acidification. Marine Ecology-Progress Series 430: 257-271
- Widdicombe S, Spicer JI (2008) Predicting the impact of ocean acidification on benthic biodiversity: what can animal physiology tell us? Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 366: 187-197
- Wilbur KM (1976) Recent studies of invertebrate mineralization In: Wilbur Wa (ed) The mechanisms of mineralization in invertebrates and plants. University of South Carolina Press, Columbia, pp 79-108

- Wilbur KM, Yonge CM (1964) *Physiology of Mollusca*. Academic Press, New York and London
- Willson LL, Burnett LE (2000) Whole animal and gill tissue oxygen uptake in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*: effects of hypoxia, hypercapnia, air exposure, and infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 246: 223-240
- Wilson S, Blake C, Berges JA, Maggs CA (2004) Environmental tolerances of free-living coralline algae (maerl): implications for European marine conservation. *Biological Conservation* 120: 283-293
- Wolf-Gladrow DA, Zeebe RE, Klaas C, Kortzinger A, Dickson AG (2007) Total alkalinity: the explicit conservative expression and its application to biogeochemical processes. *Marine Chemistry* 106: 287-300
- Wood HL, Spicer JI, Widdicombe S (2008) Ocean acidification may increase calcification rates, but at a cost. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 275: 1767-1773
- Wood HL, Spicer JI, Lowe DM, Widdicombe S (2010) Interaction of ocean acidification and temperature; the high cost of survival in the brittlestar *Ophiura ophiura*. *Marine Biology* 157: 2001-2013
- Wootton JT, Pfister CA, Forester JD (2008) Dynamic patterns and ecological impacts of declining ocean pH in a high-resolution multi-year dataset. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 18848-18853
- Wu HY, Zou DH, Gao KS (2008) Impacts of increased atmospheric CO₂ concentration on photosynthesis and growth of micro- and macro-algae. *Science in China Series C-Life Sciences* 51: 1144-1150

-Z-

- Zachos JC, Röhl U, Schellenberg SA, Sluijs A, Hodell DA, Kelly DC, Thomas E, Nicolo M, Raffi I, Lourens LJ (2005) Rapid acidification of the ocean during the Paleocene-Eocene thermal maximum. *Science* 308: 1611-1615
- Zapata M, Garrido JL (1991) Influence of injection conditions in reversed phase high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids. *Chromatographia* 31: 589-594
- Zapata M, Rodriguez F, Garrido JL (2000) Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C-8 column and pyridine-containing mobile phases. *Marine Ecology-Progress Series* 195: 29-45
- Zar JH (1974) *Biostatistical analysis*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, pp 620

- Zeebe RE (2011) History of seawater carbonate chemistry, atmospheric CO₂, and ocean acidification. In: Jeanloz R (ed) Annual Review of Earth and Planetary Sciences, Vol 40. Annual Reviews, Palo Alto, pp 141-165
- Zippay ML, Hofmann GE (2010) Effect of pH on gene expression and thermal tolerance of early life history stages of red abalone (*Haliotis rufescens*). Journal of Shellfish Research 29: 429-439
- Zou DH, Gao KS (2009) Effects of elevated CO₂ on the red seaweed *Gracilaria lemaneiformis* (Gigartinales, Rhodophyta) grown at different irradiance levels. Phycologia 48: 510-517
- Zou DH, Gao KS, Luo HJ (2011) Short and long term effects of elevated CO₂ on photosynthesis and respiration in the marine macroalga *Hizikia fusiformis* (Sargassaceae, Pheophyta) grown at low and high N supplies. Journal of Phycology 47: 87-97

ANNEXES



ANNEXE 1 : Publications et communications scientifiques

1. Publications

Noisette F, Duong G, Six C, Davoult D, Martin S, (2013) Effects of elevated $p\text{CO}_2$ on the metabolism of a temperate rhodolith *Lithothamnion corallioides* under different temperature levels, *Journal of Phycology*, 49: 746-757

Noisette F, Egilsdottir H, Davoult D, Martin S, (2013) Physiological responses of three temperate coralline algae from contrasted habitats to near-future ocean acidification, *Journal of Experimental Marine Biology*, 448: 179-187

Egilsdottir H, Noisette F, Noël L, Olafsson J, Martin S, (2013) Effects of $p\text{CO}_2$ on physiology and skeletal mineralogy in a tidal pool coralline alga *Corallina elongata*. *Marine Biology*, 160 (8): 2103-2112

Noisette F, Richard J, Le Fur I, Martin S, Response of *Crepidula fornicata* metabolism to temperature stress under elevated $p\text{CO}_2$
(en révision dans *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*)

Noisette F, Comtet T, Legrand E, Bordeyne F, Davoult D, Martin S, Impact of near-future ocean acidification on *C. fornicata* larvae from $p\text{CO}_2$ -acclimated parents
(soumise dans *Plos One*)

Noisette F, Bordeyne F, Davoult D, Martin S, Species resist to climate change: through metabolic responses of *Crepidula fornicata* to elevated $p\text{CO}_2$ at different temperature levels
(en préparation)

2. Communications

Juin 2013 “Ocean Acidification Workshop for Marine Photosynthesisers”, *Plymouth, GB*

Mai 2013 Séminaire invité au Mediterranean Institute of Oceanography (MIO), *Marseille, Communication*

Déc. 2012 4^{ème} Journée des Jeunes Chercheurs *Roscoff, France*
Poster

Sept. 2012 “Third Symposium Ocean in a high CO_2 world”, *Monterey, Californie, Etats-Unis*
Poster

Mai 2012 Meeting final EPOCA (European Project on Ocean Acidification), *Nice, France*
Poster + communication courte

Nov. 2011 3^{ème} Journée des Jeunes Chercheurs, *Roscoff, France*
Communication

Sept. 2011 “World conference on Marine Biodiversity”, *Aberdeen, Ecosse, GB*
Digital object

- Sept. 2011 Meeting Centre des Sciences Marines (CSM), *Paris, France*
Poster + chairman session “Changement climatique et impacts”
- Juin 2011 1^{er} meeting Interreg Marinexus, *Plymouth, GB*
Poster
- Mai 2011 3^{ème} meeting EPOCA, *Bruxelles, Belgique*
Poster + communication courte
- Oct. 2010 2^{ème} meeting EPOCA, *Bremerhaven, Allemagne*

ANNEXE 2 : Poster relatif à l'article n°1 présenté au 3ème Symposium "Ocean in a High CO₂ World" (Monterey, Septembre 2012)



Photosynthesis, respiration and calcification responses to near future ocean acidification in three species of temperate coralline algae

Fanny NOISETTE^{1,2}, Hrom EGLSDOTTIR^{3,4}, Dominique DAVOULT^{1,2}, Sophie MARTIN^{1,2}
 1. CNRS, UMR 7144, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29682 Roscoff, France
 2. UPMC, UMR 7144, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29682 Roscoff, France
 3. UPR 1158, UMR 1158, Station Biologique de Roscoff, Place Georges Teissier, 29682 Roscoff, France
 4. University of Iceland, Faculty of Earth Sciences, Stungatan 7, 101 Reykjavik, Iceland



fanny.noissette@sb-roscoff.fr

INTRODUCTION

Coralline algae are widespread and play major ecological role in benthic marine habitats. They appear to be among the most sensitive calcifying organism to elevated pCO₂ due to the solubility of their high magnesium calcite structure. Coralline algae have different morphologies and live in contrasted environments. Some species (intertidal ones) experience strong physico-chemical variations whereas others (subtidal ones) live in more stable environments.

Hypothesis: coralline algae which experience high pCO₂/pH fluctuations in their living place may be more robust to elevated pCO₂ than other species.



Corallina elongata
 Intertidal rockpools
 pH_i in situ 7.69 - 8.61
 pCO₂ 1030 - 70 μatm



Lithothamnion incrustans
 Flow run channels
 pH_i in situ 7.56 - 8.62
 pCO₂ 1392 - 76 μatm

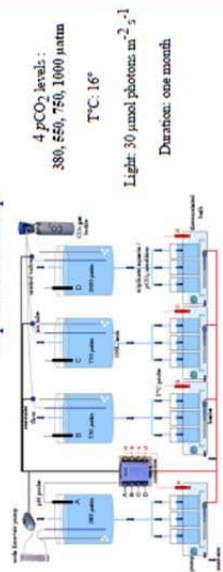


Lithothamnion corallioides
 Subtidal mussel beds
 pH_i in situ 8.08 - 8.18
 pCO₂ 377 - 286 μatm

How elevated pCO₂ can impact the metabolism of these 3 different coralline algal species?

MATERIEL & METHODS

Experimental set up



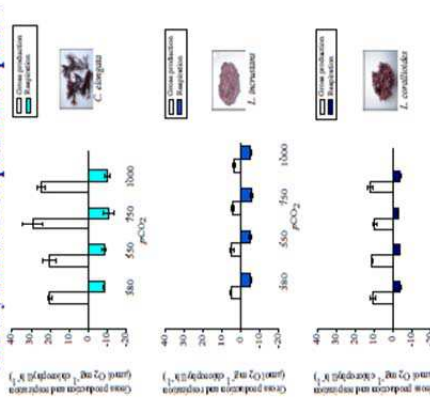
Measurements



Light and dark incubations in chambers

RESULTS & DISCUSSION

Photosynthesis & respiration responses



❖ No pCO₂ effect on GP and R in the 3 coralline algal species
 ❖ GP and R higher in *C. elongata* than in non geniculate species
 GP in *C. elongata* 2-6-fold higher than in *L. corallioides*
 GP in *C. elongata* 4-6-fold higher than in *L. incrustans*

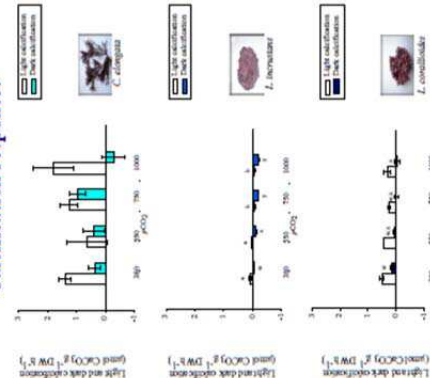
Bleaching



L. incrustans thallus at the end of the experiment

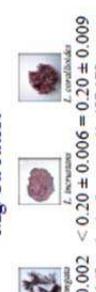
❖ Necroses appeared in *L. incrustans* at elevated pCO₂ (750, 1000 μatm)

Calcification responses



❖ No pCO₂ effect on light and dark calcification in *C. elongata*
 ❖ Strong decrease in light and dark calcification in *L. incrustans* with increasing pCO₂
 ❖ Slight decrease in light calcification and dark calcification at 750 and 1000 μatm in *L. corallioides*

Mg/Ca ratios



❖ Lowest Mg/Ca in *C. elongata*: less soluble Mg-calcite

CONCLUSIONS

Coralline algae have different pCO₂ sensitivity
C. elongata which experiences strong physico-chemical variations are more resistant to elevated pCO₂
 Lower Mg/Ca ratio in carbonate structure may confer resistance to elevated pCO₂
 Adaptive mechanisms may confer robustness to coralline populations living in variable environments

ANNEXE 3 : Poster relatif à l'article n°2 présenté au 3^{ème} meeting annuel d'EPOCA (European Project for Ocean Acidification) (Bruxelles, mai 2011) ainsi qu'aux doctoriales du Centre de Sciences de le Mer (Paris, septembre 2011)



EFFECTS OF ELEVATED pCO₂ ON PHOTOSYNTHESIS AND CALCIFICATION OF THE TEMPERATE CORALLINE ALGA *LITHOTHAMNION CORALLIODES* (MAERL)



Station Biologique Roscoff



Fanny Noisette, Gwendoline Duong, Dominique Davout, Sophie Martin

Laboratoire Adaptation et Diversité en Milieu Marin, CNRS & Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, Station Biologique, Roscoff, France

INTRODUCTION

Coralline algae (Rhodophyceae, Corallinales) are one of the most abundant and widespread calcifiers in benthic coastal ecosystems. They can be found in most marine habitats from intertidal to subtidal zones. They are of significant ecological importance and play a major role in the carbon and carbonate cycles. However, some recent publications demonstrate that they are among the calcifying organisms the most sensitive to ocean acidification. A few studies are dedicated to them, particularly in temperate waters.

Here, we studied the effects of elevated pCO₂ on the metabolic response (photosynthesis, respiration and calcification rates) and the interactions with seasonal change in temperature.

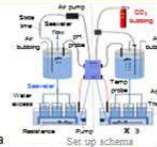
MATERIEL & METHODS



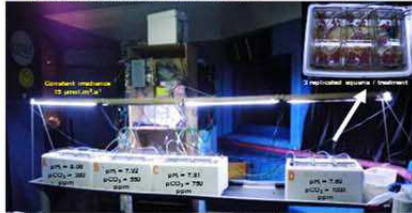
Lithothamnion corallioides (Rhodophyceae, Corallinales), named maerl, is a free living coralline alga. Very high concentrations over large areas form "maerl" beds in the subtidal zone. They form an habitat for high and peculiar biodiversity: their conservation is considered of international interest. In Brittany, maerl is used for decades by traditional farming and represents economical and patrimonial interests.

Thalli collection

Bay of Brest (Brittany, France)
December 2010
13 m depth



Random distribution in 12 aquaria



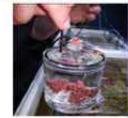
Experimental set up: 4 pH conditions

Experimental design

- 2 months experiment in mesocosms
- 4 pH (on the total scale) conditions: 8.1 (ambient pCO₂), 7.9, 7.8, 7.7 (elevated pCO₂)
- 3 temperature levels as seasonal change: 10°C (winter), 13°C (spring & autumn), 16°C (summer)
Acclimation: 10 days before incubations

Metabolic rates assessed in incubation chambers

- Photosynthesis and respiration
- Mesurements of [O₂]
- Optical fiber system
- Light and dark calcification
- Measurements of total alkalinity
- Alkalinity anomaly method



Incubation chamber with optical fiber

RESULTS

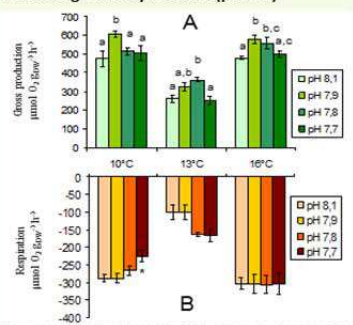
Photosynthesis & Respiration

pH: little effect on gross production (GP)

- At pH 7.9 (10-16°C) and pH 7.8 (13°C): GP affected positively
- A little decrease in pH could slightly rises the CO₂ concentration. Red algae use preferentially CO₂ form for photosynthesis. Therefore this reaction would be boosted and consequently, GP lightly increased.

- At lower pH 7.7: no effect on GP
- CO₂ excess stop being an advantage.

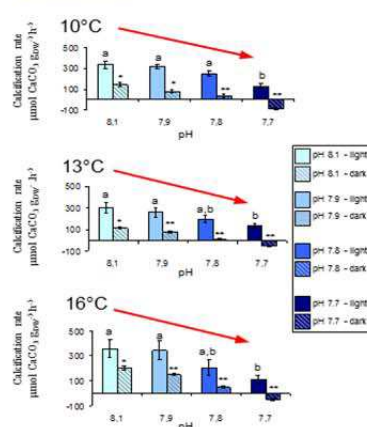
T: 13°C significantly different (p < 0.05)



pH: no effect on respiration (R)

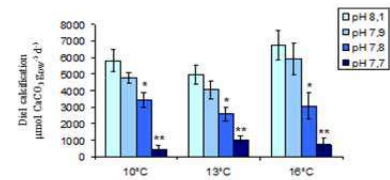
- T: 13°C significantly different (p < 0.05)

Calcification



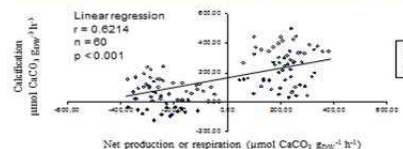
Light and dark calcification in response to decreasing pH at 3 temperatures - Different letters on bars indicate significant differences (permanova, p < 0.05) among means (mean ± SE, n = 3) - * p < 0.05, ** p < 0.01

- No temperature effect
- Calcification rates: light > dark (K-W test, p < 0.05)
- 1- to 3-fold higher in the light than in the dark
- General declining trend with decreasing pH
 - light: calcification only different at pH 7.7 (permanova, p < 0.05)
 - dark: all the calcification rates are different



Diel calcification = (light calcification + dark calcification) = skeletal growth per day

- No difference in calcification between pH 8.1 and 7.9
- maerl could support small pH variations
- At lower pH, calcification is highly affected
- reduced by 50% at pH 7.8 and 70% at pH 7.7.



- Significant relationship between primary production and calcification → The more photosynthesis produces energy, the more calcification occurs in maerl.

CONCLUSIONS

- Poor acclimation of maerl to elevated pCO₂
- Maintenance of photosynthetic activity at low pH but decrease in calcification rates
- Decrease in diel calcification by up to 70% in response to low pH
- Impact on maerl beds development and all the very peculiar biodiversity leaving among them



This work is a contribution to the "European Project on Ocean Acidification" (EPOCA) which received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 211384.



ANNEXE 4 : Poster relatif à l'article n°3 présenté à la 2^{ème} session plénière du programme Marinexus (Plymouth, juin 2011)



RESPONSE OF THE INVASIVE GASTROPOD *CREPIDULA FORNICATA* TO ELEVATED TEMPERATURE AND pCO₂

Fanny Noiset¹, Joëlle Richard², Ines Le Fur¹, Dominique Davoult¹, Sophie Martin¹
Corresponding author: fanny.noiset@sb-roscoff.fr

¹Laboratoire Adaptation et Diversité en Milieu Marin, CNRS & Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, Station Biologique, Roscoff, France
² British Antarctic Survey, High Cross, Madingley Road, Cambridge CB3 0ET, United Kingdom



Station Biologique Roscoff



INTRODUCTION

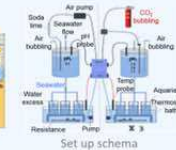


The American slipper limpet *Crepidula fornicata* (Calyptraeidae) has been an invasive species in European bays and estuaries since the 1950s. East American native, *C. fornicata* were carried on by oyster farming and spread on European coasts along the XX century. They tolerate high range of salinity and temperature and live in shallow waters (bays and estuaries). As a very tolerant species, it competes native species (space and food web), disturbs aquaculture and fishing and modifies carbonate and carbon fluxes.

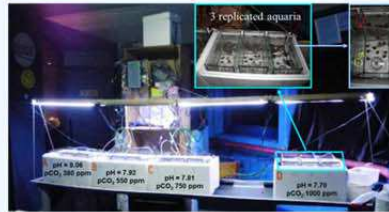
SET UP & PROTOCOL

Slipper limpet collection

Bay of Morlaix (Brittany, France)
February 2010
250 chains (5-10 individuals / chain)



- Separation into individual young males and females
- Random distribution in 12 aquaria



Experimental set up: 4 pH (pCO₂) conditions

Experimental design

- Mesocosm experiment
- 4 pH (pCO₂) conditions
 - 8.08 (380 ppm) → ambient pCO₂
 - 7.94 (550 ppm)
 - 7.81 (750 ppm)
 - 7.70 (1000 ppm)

Respiration assessed in incubation chambers by measurements of [O₂] using optical fiber system



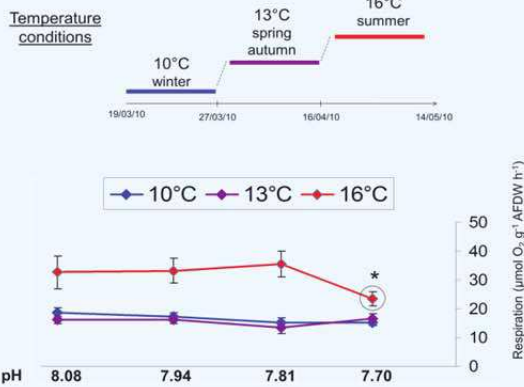
Incubation chamber



O₂ measurements

SEASONAL CHANGE IN TEMPERATURE

Objective
To test the response of *C. fornicata* respiration to seasonal change in temperature under different pCO₂ levels

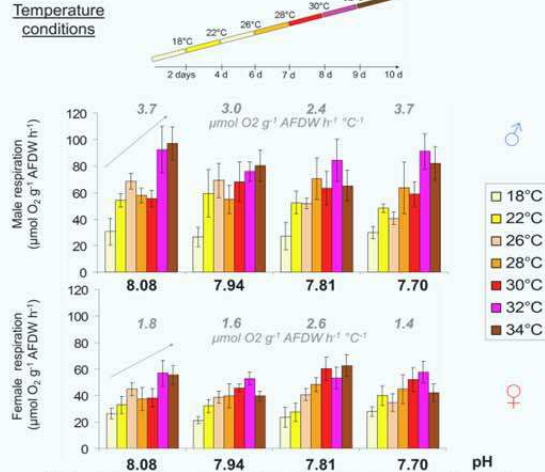


Respiration of *C. fornicata* young males in response to decreasing pH at 10, 13 and 16°C
* indicates a significant difference (ANOVA, p < 0.05)

- Respiration rates : from 11 to 35 μmol O₂ g⁻¹ AFDW h⁻¹
- T°C effect: respiration significantly higher at 16°C (1.4 to 2.6-fold higher)
- No pH effect except at 16°C (pH 7.7)

TEMPERATURE STRESS

Objective
To test the response of *C. fornicata* respiration to temperature stress under different pCO₂ levels



Respiration along a temperature gradient for *C. fornicata* male and female at 4 pH levels

- ♂ respiration > ♀ respiration
26 to 97 μmol O₂ g⁻¹ AFDW h⁻¹ / 21 to 62 μmol O₂ g⁻¹ AFDW h⁻¹
- T°C effect : increase of respiration with temperature
♂ : 3 μmol O₂ g⁻¹ AFDW h⁻¹ °C⁻¹ / ♀ : 2 μmol O₂ g⁻¹ AFDW h⁻¹ °C⁻¹
- No pH effect

CONCLUSIONS

- Increase of respiration with temperature
- High resistance to temperature stress
- High tolerance to elevated pCO₂
- Highly competitive species

ANNEXE 5 : Poster relatif à l'article n°4 présenté au meeting final d'EPOCA (St Jean Cap Ferrat, juin 2012) ainsi qu'aux Journées des Jeunes Chercheurs de la Station Biologique de Roscoff (décembre 2012).



EFFECTS OF ELEVATED pCO₂ ON THE METABOLISM OF THE INVASIVE SLIPPER LIMPET *CREPIDULA FORNICATA*



Fanny Noisette, François Bordeyne, Dominique Davoult, Sophie Martin

Laboratoire Adaptation et Diversité en Milieu Marin, CNRS & Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, Station Biologique, Roscoff, France

Corresponding author: fanny.noisette@sb-roscoff.fr

Introduction

The American slipper limpet *Crepidula fornicata* (Calypttraeidae) has been an invasive species in European bays and estuaries since the 1950s. North-East American native, *C. fornicata* was introduced in association with imported American oysters at the end of the 19th century. They spread in shallow waters along the European coast along the 20th century. They can reach very high densities in Brittany bays (Blanchard 1997, Chauvaud 1998) disturbing shellfish farming and fisheries. *C. fornicata* tolerates high range of salinity and temperature, out-competing local species for space and food (Beninger *et al.* 2007). They also have ecological impacts affecting carbon, carbonate and nitrogen cycles by enhanced respiration, calcification, filtration and excretion processes (Martin *et al.* 2006).



Seabed covered by slipper limpets

In an ocean acidification context, how *C. fornicata* physiology can be affected by decreasing pH?

Material & Methods

Organism collection



Morlaix Bay (Brittany, France)
11 m depth
December 2011



Small *C. fornicata*

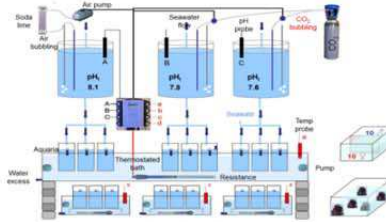


Large *C. fornicata*

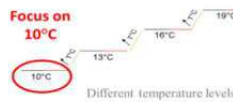
10 small individuals (< 3 cm length)
10 large individuals (> 4 cm length)

Aquarium

Experimental set up



Experimental set up
3 pH_T conditions
8.07 (380 μatm) / 7.81 (750 μatm) / 7.56 (1400 μatm)



Focus on 10°C

Different temperature levels

Metabolic rates

Assessed in incubation chambers



Respiration → [O₂] measurements
Optical fiber system

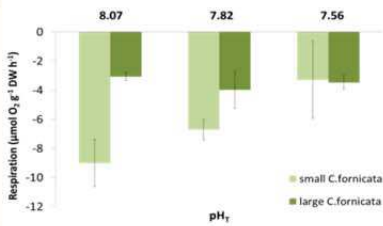
Calcification → Total alkalinity measurements
Alkalinity anomaly method

Excretion → [NH₄⁺] measurements
Spectrophotometry

Filtration → Cell counts
Flux cytometry

Results & Discussion

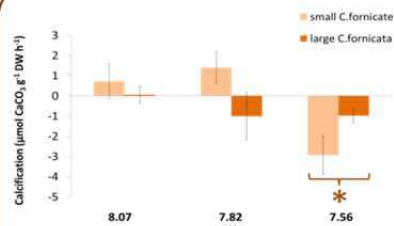
Respiration rates



Respiration rates (mean ± se) of small (light color) and large (dark color) *C. fornicata* at current and decreased pHs

No pH effect on respiration (KW test, p-value=0.657, n=6)
Respiration rates Small > Large
Small *C. fornicata* need higher energy (growth, motility...)

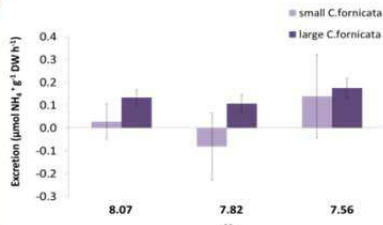
Calcification rates



Calcification rates (mean ± se) of small (light color) and large (dark color) *C. fornicata* at current and decreased pHs (*: p < 0.05)

Effect of pH on calcification only at pH 7.56 (2-way ANOVA, p-value=0.01, n=6)
At pH 7.56, Ω_{Ar} < 1: chemical dissolution favoured
Shell dissolution > calcification
Calcification rates Small > Large

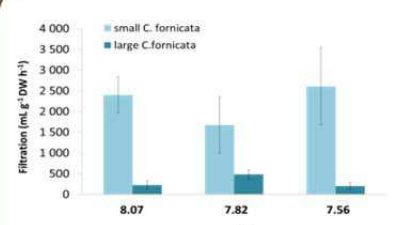
Excretion rates



Excretion rates (mean ± se) of small (light color) and large (dark color) *C. fornicata* at current and decreased pHs

No pH effect on excretion (KW test, p-value=0.721, n=6)
Low excretion at 10 °C
For small individuals, ammoniac fluxes were not different from zero

Filtration rates



Filtration rates (mean ± se) of small (light color) and large (dark color) *C. fornicata* at current and decreased pHs

No pH effect on filtration (2-way ANOVA, pH p-value > 0.05, n=3)
Filtration rates Small > Large (2-way ANOVA, Size p-value < 0.05, n=3)
Small *C. fornicata* have more active metabolism and need higher energy
Same order of magnitude than other bivalves



This work is a contribution to the European Project on Ocean Acidification (EPOCA) which received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 211344.

- Low winter metabolism (consistent with the litterature, Martin *et al.* 2006)
- High resistance of *C. fornicata* to near-future ocean acidification (pH_T 7.8/pCO₂ 750 μatm, as projected by 2100)
- Calcification affected (net dissolution) at lower pH (pH_T 7.56/pCO₂ 1400 μatm, 5-fold higher than preindustrial level)

References:
Blanchard M. (1997) Spread of the slipper limpet *Crepidula fornicata* (L.) 1874 in Europe. Current status and consequences. *Scientia Marina* 61: 109-114
Beninger P., Decottignies F., Guibeneuf F., Barille L., Rince V. (2007) Comparison of particle processing by two introduced suspension feeders: selection in *Crepidula fornicata* and *Chamaelea galeata*. *MEPS* 334: 165-177
Chauvaud L. (1998) La coquille "St Jacques" en danger: un modèle biologique d'étude des impacts de la faune benthique aux fluctuations de l'environnement. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France
Martín S., Thourou G., Chauvaud L., Juan F., Gratià L., Clavier J. (2006) Respiration, calcification and excretion of the invasive slipper limpet, *Crepidula fornicata* L.: Implications for carbon, carbonate and nitrogen fluxes in affected areas. *Limnol. Oceanogr.* 51:51

Remerciements

ou de l'importance des pauses-café

Un premier mot pour vous, Sophie et Dominique, qui m'avez fait confiance en me présentant comme candidate sur ce sujet de thèse. Merci de m'avoir encadré pendant ces trois ans tout en me laissant la liberté de développer librement mes idées et de gagner encore plus en autonomie.

Au début de la thèse, je ne prenais pas le temps de faire des pauses-café, trop pressée, trop débordée par le travail qui m'attendait. J'ai pourtant compris que ces instants permettaient parfois de souffler, de se détendre pour mieux repartir et que finalement, on n'en travaillait peut être que mieux. Parce qu'ils ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse jalonné de pauses-café, je remercie chaleureusement Rui Santos et Sam Dupont. Un grand merci aussi à Jacques Clavier et Jean-Pierre Gattuso pour leurs échanges constructifs lors des comités de thèse et pour leur participation au jury de soutenance.

La pause-café du couloir du 1^{er} étage de Lacaze-Duthiers, c'est avant tout un moment de vie du labo où l'on apprend à connaître ses collègues, où l'on rit avec eux (les blagues se dégradant au fur et à mesure que le vendredi se rapproche), somme toute, un vrai moment de cohésion. C'est un moment d'échange autour de sujets d'actualité ou encore de références culturelles communes mais aussi de discussion et réflexions scientifiques. C'est parfois une mini réunion d'équipe permettant de faire circuler efficacement l'information et de régler certains problèmes administratifs. C'est aussi l'occasion de présenter les nouveaux venus, de fêter un anniversaire, de dire au revoir à ceux qui s'en vont. Je tenais à remercier chaleureusement et sincèrement tous les participants de ces pauses-café pour les 3 ans passés en leur compagnie, pour tout ce qu'ils m'ont apporté aussi bien humainement que scientifiquement, leurs rires, leurs coups de gueule et leur soutien. Parmi eux,

Les buveurs de café :

- Dominique, en plus d'être l'un de mes deux directeurs de thèse, c'est à toi qu'à échue la lourde tâche de partager ton bureau avec moi et de me supporter au quotidien. Promis, avant de partir, je te laisserai le mode d'emploi du nouveau téléphone.
- Jean-Charles, mon collègue thésard, aficionado de la musique manouche, qui sait mieux que personne imiter Amélie et Amélia Jacasse et connaît toujours la réplique de film culte qui fait mouche.
- Thierry, spécialiste de l'étude des larvounettes, puits de références bibliographiques, et accessoirement grand animateur en chef des pauses-café. Merci pour toutes les discussions scientifiques (ou non !) qu'on a pu avoir et pour tes corrections pertinentes. La pause-café de LD va perdre un peu de son animation, emballée dans tes cartons.
- Doriane pour sa bonne humeur et ses tournures d'enfer pour les lettres de motivation.
- Pascal qui ne prend que des minigouttes de café et qui m'a appris que "le vrai pouvoir n'est pas hiérarchique".
- Renaud le santécois, conducteur de carette en chef.
- François G. pour ses chorégraphies et sa connaissance de Patrick Sébastien.

Les buveurs de café du matin :

- Aline, meilleur public des pauses-café au rire communicatif. Merci de venir me sortir de mon bureau quand c'est l'heure de la pause et que je traîne un peu.
- François B., le p'tit, qui depuis son stage de M2 en a fait un bout de chemin. Pour ton investissement et toute l'aide que tu m'as apportée, pour ta bonne humeur quotidienne, pour la patience qu'il te faut parfois pour partager notre bureau, merci !

- Thomas que j'ai souvent embêté pour des problèmes avec R et avec qui le brainstorming statistique est toujours fructueux.

Les buveuses de déca, (bastions de la taxonomie roscovite) :

- Caro (qui préférerait vraiment boire du vrai café si elle le pouvait), plus j'apprends à mieux te connaître et plus je regrette de ne pas l'avoir fait plus tôt. Merci pour ton écoute, tes encas de force majeur et ta philosophie "step by step".
- Céline (qui reste souvent à sa paillasse lors des pauses-café) pour prendre soin de nous et toujours nous prêter une oreille attentive.

Les buveurs de thé (beaucoup plus rares) :

- Sophie, ma seconde directrice de thèse, pour ton encadrement et tes multiples corrections permettant de toujours m'améliorer.
- Franck qui en rentrant d'un TP à Concarneau m'a fait découvrir toutes les petites routes de Bretagne pour rentrer jusqu'à Landivisiau.
- Agnès pour ses ouvertures de cloisons inopinées et sa façon différente de voir les choses.

Les buveurs de café ponctuels (souvent en déplacement ou résidants du bâtiment d'en face) :

- Sarah, pour ton grain de folie, nos visionnages du "Meilleur pâtissier", tes supers macarons et tes capacités de travail et d'endurance impressionnantes. Ta thèse, elle va déchirer jeune padawan !
- Eric pour ta grosse voix et tes conseils statistiques.
- Charlotte qui se soucie toujours de savoir si "ça va toi ?"
- Fred pour tes conseils avisés et tes remarques constructives.

Les buveurs de café de passage :

Stagiaires, vacataires et CDD qui sont passés par le couloir au cours de ces 3 ans. Parmi eux, un grand merci aux stagiaires qui se sont investis dans mes manips de thèse, par ordre chronologique Gwendoline, François B., Jordan, Erwann et François-Elie. Ce travail n'aurait pas pu se faire sans votre aide et c'est avec beaucoup de plaisir que je vous ai encadré et que j'ai travaillé avec chacun d'entre vous.

Les anciens buveurs de café :

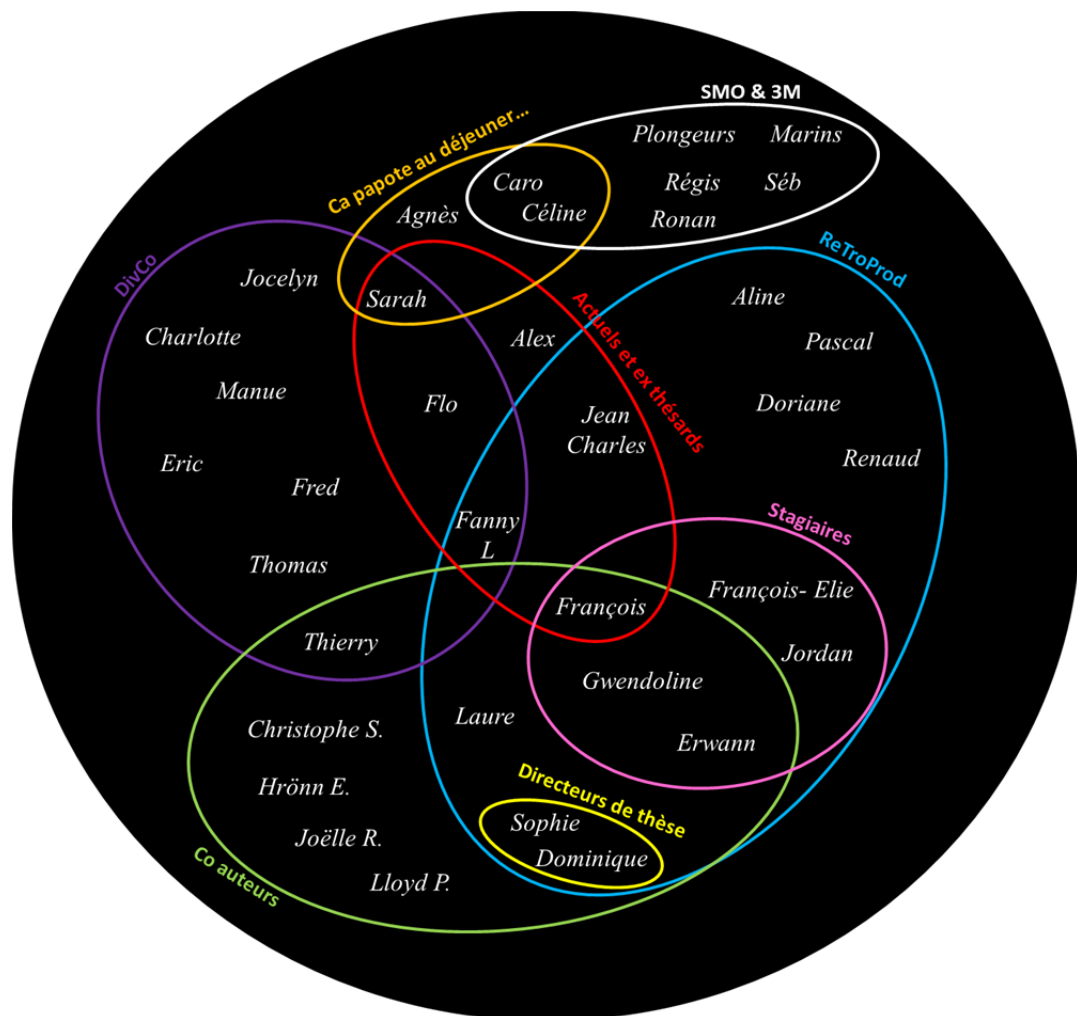
- Laure, pour nos montages de set-up expérimentaux, les virées chez ces "cochons d'anglais", la gym des mémés, les blagues racontées à l'envers, et tellement d'autres choses encore... merci la mère Noël !
- Jocelyn, notre chevalier des temps modernes. Messire Eguerrand le Vertueux, je vous remercie d'avoir amené un peu de douceur médiévale dans notre monde de brutes actuel.
- Alex, et son interprétation mémorable du "gros ours" lors du congrès en Ecosse. C'est à toi que je dois l'ajout de "olivette" et "cabsoute" à mon vocabulaire.
- Flo, fan inconditionnelle de Kate et Williams et une des meilleures radio-potins de la station.
- Fanny L., la pro du Just dance pour son sourire et sa gaieté.

S'il y a bien une pause privilégiée que j'ai eu le plaisir de partager avec le groupe des papoteuses du déjeuner, c'est celle commençant par un "j'fais chauffer d' l'eau !" en fin de repas. Au grand dam d'Aline, je n'ai pas beaucoup fréquenté les tables du Gulf Stream au cours de ces trois ans. Cependant j'ai rarement mangé seule, partageant nombre de mes repas avec Fanny L., Agnès, Sarah, Jennifer, Céline et Caro. Merci les filles pour ces moments de détente, de discussion parfois très instructives ("Mais ça vient d'où les aphtes ?"), de commérage ("Oh tu sais pas, y'a déjà un couple dans les nouveaux licences") mais toujours d'échanges amicaux.

Je tenais aussi à remercier ceux avec qui je n'ai pas partagé ces pauses-café mais qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse, aussi bien d'un point de vue logistique et technique (les gars des équipes 3M, du SMO et des ateliers) qu'administratif (les filles du pôle RH, de l'administration + Gugu, Brigitte), ainsi que les collègues thésards pour les tuyaux sur le fonctionnement bizarre des ED (Aliou, Fred, Domi, Florian...).

Une pensée pour ceux avec qui je bois des cafés en dehors de la station, les loulous à Carentan, les "coupains" bretons, les expatriés à Marseille (Pierre, Aurélie, Marine), les amis du Pays Basque et ma famille. Même si vous n'avez pas toujours bien cerné en quoi consistait cette thèse, pourquoi je passais autant de week-end au labo et rentrais aussi tard à la maison, merci de m'avoir toujours assurée de votre soutien.

Un dernier mot pour celui avec qui je bois mon café à la maison. Romain, merci pour ton soutien indéfectible et ta patience. Merci pour tout...



Impacts de l'acidification des océans sur les organismes benthiques calcifiants des milieux côtiers tempérés

RESUME

L'acidification des océans (AO) est un phénomène induit par l'augmentation de la pression partielle en CO_2 ($p\text{CO}_2$) atmosphérique d'origine anthropique caractérisé par une diminution du pH de l'eau de mer et une modification des paramètres de la chimie des carbonates. L'AO est susceptible d'impacter toutes les espèces marines mais les organismes calcifiants y seraient les plus sensibles. Dans le cadre de cette thèse, les réponses physiologiques des algues Corallinacées (algues rouges calcaires) et de la crépidule (mollusque gastéropode) ont été étudiées sous des conditions de $p\text{CO}_2$ actuelles et prévues pour la fin du siècle. Les réponses des Corallinacées à l'AO en termes de production primaire et de calcification ont varié suivant les espèces, d'une absence de réponse chez *Corallina elongata* à une diminution de 80% de la calcification nette journalière chez le maërl *Lithothamnion corallioides*. La crépidule est en revanche une espèce très tolérante à l'augmentation de la $p\text{CO}_2$. Aucune dépression métabolique n'a été observée chez les adultes malgré une diminution de la calcification nette induite par l'augmentation de la dissolution de la coquille externe. La taille des jeunes stades de son cycle de vie (embryons et larves) a été réduite sous conditions de $p\text{CO}_2$ élevées mais aucune diminution de la respiration ou mortalité importante n'a été observée. Ces espèces calcifiantes ont une importance écologique majeure au sein des écosystèmes côtiers de Manche et Atlantique nord-est. Les changements physiologiques induits par l'AO sur ces espèces clé sont susceptibles de modifier les flux de matière et d'énergies au sein des écosystèmes dans lesquels elles sont des espèces ingénieures.

Mots clés : acidification des océans, calcification, crépidule, écosystèmes côtiers, maërl, métabolisme

ABSTRACT

The anthropogenic increase in atmospheric CO_2 partial pressure ($p\text{CO}_2$) causes a decrease in seawater pH and changes in carbonate chemistry called ocean acidification (OA). All the marine species could be impacted by OA but calcifying organisms are known to be the most sensitive. This PhD thesis focused on the physiological responses of coralline algae (red calcareous algae) and the slipper limpet *Crepidula fornicata* (gastropod mollusc) exposed to current and future $p\text{CO}_2$ conditions. Coralline algae showed variable species-specific responses to OA with a lack of effect in *Corallina officinalis* and a 80 % decrease in diel net calcification in *Lithothamnion corallioides* (maerl). Conversely, *C. fornicata* was highly tolerant to OA. Although net calcification decreased due to external shell dissolution, no metabolic depression has been shown under high $p\text{CO}_2$. Size of early life stages (embryos and larvae) decreased with increasing $p\text{CO}_2$ but there were no effect on larval respiration and survival. These calcifying species are of major ecological importance in coastal ecosystems from the Channel and Northeastern Atlantic. Changes induced by OA on the physiology of these key species are likely to impact energy and matter fluxes in the ecosystems they dominate.

Keywords: calcification, coastal ecosystem, maerl, metabolism, ocean acidification, slipper limpet