



**HAL**  
open science

# Impact de la pollution lumineuse nocturne sur l'huitre creuse *Crassostrea gigas* : étude de la perturbation des rythmes biologiques et des conséquences physiologiques

Audrey Botté

## ► To cite this version:

Audrey Botté. Impact de la pollution lumineuse nocturne sur l'huitre creuse *Crassostrea gigas* : étude de la perturbation des rythmes biologiques et des conséquences physiologiques. *Zoologie des invertébrés*. Université de Bordeaux, 2023. Français. NNT : 2023BORD0494 . tel-04416121

**HAL Id: tel-04416121**

**<https://theses.hal.science/tel-04416121v1>**

Submitted on 25 Jan 2024

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS  
SPÉCIALITÉ GEOCHIMIE ET ECOTOXICOLOGIE

Par Audrey BOTTÉ

**Impact de la pollution lumineuse nocturne  
sur l'huitre creuse *Crassostrea gigas*.  
Etude de la perturbation des rythmes biologiques  
et des conséquences physiologiques.**

Sous la direction de : Damien TRAN

Soutenue le 20/12/2023

Membres du jury :

Mme BAUDRIMONT, Magalie  
Mme MOUNEYRAC, Catherine  
M. GEFFARD, Olivier  
M. POUVREAU, Stéphane  
M. DE MONTAUDOUIN, Xavier  
M. TRAN, Damien  
Mme PAYTON, Laura

Professeure, Université de Bordeaux, Présidente  
Professeure, Université Catholique de l'Ouest, Rapportrice  
Directeur de Recherche, INRAE, Rapporteur  
Chargé de Recherche (HDR), Ifremer, Examineur  
Professeur, Université de Bordeaux, Examineur  
Chargé de Recherche (HDR), CNRS, Directeur de thèse  
Chargée de Recherche, CNRS, Invitée



# **Impact de la pollution lumineuse nocturne sur l'huitre creuse *Crassostrea gigas*. Etude de la perturbation des rythmes biologiques et des conséquences physiologiques.**

## **Résumé**

La lumière artificielle nocturne (LAN) masque les cycles naturels lumineux utilisés par les organismes pour synchroniser leurs rythmes biologiques avec l'environnement. En perturbant ces rythmes, LAN peut avoir de graves conséquences physiologiques. LAN touche fortement les environnements côtiers du fait de l'importante et croissante densité de population humaine. Cependant, malgré cette menace grandissante, les effets de LAN sur ces écosystèmes sont peu étudiés. L'huitre *Crassostrea gigas* est une espèce clé des environnements côtiers susceptible d'être exposée à LAN. Ce travail évalue les effets de LAN à des intensités faibles et réalistes sur le rythme journalier comportemental et l'horloge interne de l'huitre en fonction de l'intensité, de la composition spectrale et de la modalité d'exposition. Par ailleurs, est aussi étudié l'impact de LAN sur la croissance coquillière et le microbiote branchial de l'huitre. Les résultats indiquent que LAN affecte le rythme journalier comportemental de *C. gigas* et son horloge moléculaire dès 0.1 lx avec les effets les plus forts en lumière bleue et les moins forts en lumière verte. De plus, cette étude suggère que couper les éclairages directs en milieu de nuit mais en présence d'éclairage indirect (« skyglow ») peut aggraver certains effets néfastes. Enfin, LAN diminue la croissance coquillière et entraîne une dysbiose du microbiote branchial. Ces effets sont directement corrélés à la robustesse du rythme journalier.

**Mots clés :** Lumière artificielle nocturne ; *Crassostrea gigas* ; rythme journalier ; horloge circadienne ; comportement ; processus physiologiques

---

## **Nocturnal light pollution impact on the oyster *Crassostrea gigas*. Study of the biological rhythm disruption and physiological consequences.**

### **Abstract**

Artificial Light At Night (ALAN) masks natural light cycles used by organisms to synchronize their biological rhythm with the environment. By disrupting these rhythms, ALAN can have harmful physiological consequences. Coastal environments are largely affected by ALAN due to the high and growing human population density. However, despite this growing threat, ALAN effects on these ecosystems are poorly studied. The oyster *Crassostrea gigas* is a key species of these ecosystems likely exposed to ALAN. This work evaluates ALAN effects at low and realistic intensities on the oyster's behavioral daily rhythm and on its internal clock according to its intensity, spectral composition and exposure modality. Furthermore, the impact of ALAN is also studied on the oyster's shell growth and gill's microbiota. Results show that ALAN affects the oyster behavioral daily rhythm and its molecular clock, suggesting a disruption of its functioning, starting from 0.1 lx with the strongest effects in blue light and the least strong in green light. In addition, this study suggests that cutting off direct lighting in the middle of the night but in the presence of skyglow could increase harmful effects. Finally, ALAN reduces shell growth and leads to dysbiosis of the gill's microbiota. These adverse effects are directly correlated with the daily rhythm robustness.

**Keywords:** Artificial Light at Night; *Crassostrea gigas*; daily rhythm; circadian clock; behavior; physiological processes

---

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse Damien Tran pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail ainsi que pour sa disponibilité et pour m'avoir apporté les connaissances nécessaires à l'aboutissement de ce travail. Je remercie également Laura Payton et Laure Bellec de m'avoir encadrée notamment pour la partie biologie moléculaire et microbiote mais aussi pour les échanges scientifiques que nous avons pu avoir au cours de ces trois années.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse, Elodie Fleury, Christel Lefrançois et Patrice Gonzalez, pour les retours sur le travail réalisé, celui restant à effectuer et pour les échanges enrichissants à l'occasion de ces comités.

Je remercie tout particulièrement Catherine Mouneyrac et Olivier Geffard d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et également Magalie Baudrimont, Stéphane Pouvreau, Xavier de Montaudouin et Laura Payton de faire partie de mon jury.

Merci à Yannick Geerebaert et Pierre Ciret de m'avoir apportée leur aide et leur expertise dans le domaine de l'électronique, qui est maintenant un peu moins mystique pour moi. Merci également à Cerise Daffe et Flore Daramy d'avoir répondu à mes questions et de m'avoir apportée leur aide lors des manip de biologie moléculaire.

Je tiens également à remercier le laboratoire EPOC ainsi que les membres de la station marine d'Arcachon et de l'équipe Ecotoxicologie Aquatique de m'avoir accueillie pendant ces trois années de doctorat et permis de réaliser ce travail.

Merci à Christelle Teillet, Thierry Garnier, Jean-louis Pigeon et Christian Portier pour l'aide avant, pendant et après les manip. Je remercie également l'équipe du gras (Adeline Arini, Alexandre Le Moal, Christelle Teillet et surtout Son Altesse Dassié) pour les pauses Domac et les cafés. Merci également à Marine Suchet et Margot Grimmelpont, amatrices de chips, à ma famille, mes amis, et Erwan pour leur soutien.

# Sommaire

<b>Lexique</b> .....	1
<b>Liste des acronymes</b> .....	2
<b>Préambule</b> .....	3
<b>Chapitre I Introduction</b> .....	9
<b>1. Objectifs de l'étude</b> .....	10
<b>2. Les rythmes biologiques</b> .....	15
<b>2.1. Que sont les rythmes biologiques ?</b> .....	15
<b>2.2. L'horloge moléculaire</b> .....	17
<b>3. La pollution lumineuse nocturne</b> .....	19
<b>3.1. Qu'est-ce que LAN ?</b> .....	19
<b>3.2. Répartition géographique de LAN</b> .....	21
<b>3.3. Mesurer LAN</b> .....	23
<b>4. LAN : une menace pour les écosystèmes marins</b> .....	26
<b>4.1. LAN : une menace écologique</b> .....	26
<b>4.2. Présence de LAN dans le milieu marin</b> .....	27
<b>4.3. Impacts chez les organismes marins</b> .....	29
<b>4.4. Stratégies d'atténuation des effets de LAN</b> .....	32
<b>5. L'huitre <i>Crassostrea gigas</i></b> .....	35
<b>5.1. Ecologie et aquaculture</b> .....	35
<b>5.2. Physiologie de l'huitre</b> .....	36
<b>5.3. Rythmes biologiques de l'huitre</b> .....	38
<b>5.4. Effets potentiels de LAN sur l'huitre <i>C. gigas</i>, un candidat idéal comme espèce bioindicatrice des effets de LAN en zones côtières ?</b> .....	42
<b>Chapitre II Matériels et méthodes</b> .....	43
<b>1. Huitres et micro-algues</b> .....	44
<b>2. Généralités sur l'expérimentation</b> .....	45
<b>2.1. Dispositif expérimental</b> .....	45
<b>2.2. Conditions d'exposition à la lumière</b> .....	46
<b>2.3. Mesure de la lumière</b> .....	49
<b>2.4. Expérimentation</b> .....	52
<b>3. Etude du comportement valvaire par valvométrie HFNI</b> .....	53
<b>3.1. Fonctionnement de la valvométrie HFNI</b> .....	53
<b>3.2. Paramètres étudiés à l'aide de la valvométrie HFNI</b> .....	54

<b>4. Analyses chronobiologiques</b> .....	57
<b>4.1. Vérification de la qualité des données comportementales</b> .....	59
<b>4.2. Recherche de périodicités significatives</b> .....	60
<b>4.3. Modélisation des données comportementales (modèle Cosinor)</b> .....	60
<b>5. Analyses moléculaires</b> .....	61
<b>5.1. Prélèvement des organismes et conditionnement des tissus</b> .....	63
<b>5.2. Extraction d'ARN</b> .....	63
<b>5.3. Rétro-transcription en ADNc</b> .....	64
<b>5.4. PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)</b> .....	64
<b>6. Etude du microbiote branchial par métagénomique ciblée</b> .....	65
<b>6.1. Prélèvement et conditionnement des échantillons</b> .....	67
<b>6.2. Extraction de l'ADN total</b> .....	67
<b>6.3. Réaction de Polymérisation en chaine (PCR)</b> .....	68
<b>6.4. Séquençage</b> .....	69
<b>6.5. Traitement bio-informatique</b> .....	69
<b>6.6. Traitement bio-statistique</b> .....	70
<b>Chapitre III Effet de l'intensité de la photophase sur l'entraînement du rythme journalier de l'huitre <i>C. gigas</i></b> .....	73
<b>1. Introduction</b> .....	74
<b>2. Matériels et méthodes</b> .....	75
<b>2.1. Protocole expérimental</b> .....	75
<b>2.2. Etude du comportement valvaire</b> .....	78
<b>2.3. Analyses chronobiologiques</b> .....	78
<b>2.4. Analyses statistiques</b> .....	79
<b>3. Résultats</b> .....	79
<b>4. Discussion et conclusion</b> .....	84
<b>5. Références</b> .....	85
<b>6. Annexes du chapitre III : Effet de l'intensité de la photophase sur l'entraînement du rythme journalier de l'huitre <i>C. gigas</i></b> .....	88
<b>Chapitre IV Effets de la pollution lumineuse nocturne sur le rythme journalier de <i>C. gigas</i> en fonction de son intensité</b> .....	91
<b>1. Préambule</b> .....	92
<b>2. Article: Artificial light at night at environmental intensities disrupts daily rhythm of the oyster <i>Crassostrea gigas</i></b> .....	94
<b>3. Annexes</b> .....	117
<b>4. Conclusion</b> .....	125

<b>Chapitre V Effets de la pollution lumineuse nocturne sur le rythme journalier de <i>C. gigas</i> en fonction de ses longueurs d'ondes</b> .....	126
1. Préambule .....	127
2. Article: The effects of Artificial Light at Night on behavioral rhythm and related gene expression are wavelength dependent in the oyster <i>Crassostrea gigas</i> .....	129
3. Annexes .....	156
4. Conclusion.....	163
<b>Chapitre VI Effets de la pollution lumineuse nocturne sur le rythme journalier de <i>C. gigas</i> en fonction de sa modalité d'exposition</b> .....	165
1. Préambule .....	166
2. Article: Is part-night lighting a suitable mitigation strategy to limit Artificial Light at Night effects on the biological rhythm at the behavioral and molecular scales of the oyster <i>Crassostrea gigas</i> ? .....	168
3. Annexes .....	202
4. Conclusion.....	212
<b>Chapitre VII Conséquences physiologiques de la lumière artificielle nocturne chez <i>Crassostrea gigas</i> : Etude de la relation entre perturbation du rythme journalier, microbiote et croissance</b> .....	213
1. Préambule .....	214
2. Article: Link between the robustness of diurnal behavior, disruption of the gills microbiota, and the shell growth of the oyster <i>Crassostrea gigas</i> exposed to artificial light at night .....	215
3. Annexes .....	251
4. Conclusion.....	273
<b>Conclusion générale et perspectives</b> .....	274
1. Discussion et conclusion générale .....	275
1.1. Les effets de LAN sur le rythme journalier et la physiologie de <i>C. gigas</i> .....	275
1.2. Comment limiter efficacement l'impact de LAN chez <i>C. gigas</i> ? .....	277
2. Perspectives.....	279
<b>Références bibliographiques</b> .....	282
<b>Annexes</b> .....	303
Liste des articles scientifiques.....	304
Présentations orales et posters.....	305
Activités complémentaires au travail de recherche pendant la thèse .....	306



## Lexique

*Free-running* : terme anglo-saxon signifiant « libre-cours », désignant un rythme qui fonctionne librement avec sa propre période en l'absence de stimuli externes sans être synchronisé par des facteurs environnementaux périodiques.

*Full-night lighting* : terme anglo-saxon signifiant « éclairage nocturne complet » et désignant la présence d'un éclairage artificiel actif tout au long de la nuit.

*Part-night lighting* : terme anglo-saxon signifiant « éclairage nocturne partiel » et désignant le fait de couper l'éclairage artificiel nocturne pendant une partie de la nuit.

Photophase : période lumineuse du cycle jour / nuit.

Scotophase : période d'obscurité du cycle jour / nuit.

*Skyglow* : terme anglo-saxon désignant la lumière artificielle diffusée dans l'atmosphère, provoquant un halo lumineux dans le ciel nocturne.

*Snowglow* : terme anglo-saxon désignant l'amplification du *skyglow* par la présence de neige.

*Zeitgeber* : terme allemand qui signifie « donneur de temps ». Les *zeitgebers* sont des facteurs périodiques de l'environnement permettant de synchroniser l'horloge interne avec la rythmicité du milieu.

## Liste des acronymes

ALAN : *Artificial Light at Night*

ASV : *Amplicon Sequence Variant*

DMSP-OLS : *Defense Meteorological Satellite Program Operational Linescan System*

LAN : *Lumière Artificielle Nocturne*

CCT : *Correlated Color Temperature*

Ct : *Cycle Threshold*

DNB : *Day Night Band*

FNL : *Full-Night Lighting*

HFNI : *Haute-Fréquence Non-Invasive*

HPS : *High Pressure Sodium*

LED : *Light Emitting Diode*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

POMS : *Pacific Oyster Mortality Syndrome*

RT-qPCR : *Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction*

PIB : *Produit Intérieur Brut*

PNL : *Part-Night Lighting*

PNL+S : *Part-Night Lighting + Skyglow*

VIIRS : *Visible/Infrared Imaging/Radiation Suite*

VOD : *Valve Opening Duration*

# Préambule

L'objectif de ce travail est d'évaluer les potentiels effets néfastes de la pollution lumineuse nocturne, LAN (correspondant au terme consacré anglo-saxon ALAN pour *Artificial Light at Night*), en zone littorale, via un organisme clé des écosystèmes côtiers, l'huitre creuse *Crassostrea gigas*. Aujourd'hui, LAN n'épargne aucune région du monde puisqu'environ 83 % de la population mondiale vit sous un ciel exposé à LAN (Falchi et al., 2016). C'est un phénomène qui ne cesse de s'étendre puisque la luminosité du ciel augmente d'environ 9.6 % par an, ce qui fait de LAN une thématique d'étude qui prend de plus en plus d'importance dans la littérature scientifique (Falchi et al., 2016; Kyba et al., 2023). Les environnements côtiers sont particulièrement exposés à ce type de pollution notamment du fait qu'ils abritent une grande partie de la population humaine (Davies et al., 2014). Aujourd'hui, 22.2 % des côtes mondiales sont touchées par LAN, et plus précisément 840 000 km<sup>2</sup> de côtes à travers le monde sont exposés à LAN sur 20 m de profondeur, une surface qui tend à augmenter dû à la croissance rapide de la densité humaine sur le littoral (Davies et al., 2014; Kummu et al., 2016; Smyth et al., 2021). L'étude de l'impact de LAN sur les environnements marins s'est accélérée ces cinq dernières années et révèle une large diversité d'effets néfastes (impacts sur le comportement, la croissance, les interactions proies/prédateurs...) (Brayley et al., 2022; Marangoni et al., 2022). Cependant, malgré la menace que représente LAN pour ces écosystèmes, ses effets sur les organismes marins et plus particulièrement sur les organismes côtiers restent peu étudiés comparés aux organismes terrestres.

Chez les bivalves, les effets de LAN sont particulièrement peu caractérisés. A ce jour, excepté les travaux réalisés ici (Chapitres IV, V, VI et VII), une seule étude traite de l'impact de LAN chez les mollusques bivalves. Cette étude est celle de Christoforou et al. (2023) qui ont récemment mis en évidence quelques effets néfastes de LAN sur le comportement de la moule *Mytilus edulis*. Le travail présenté ici permet d'initier la connaissance des effets de LAN chez un autre bivalve d'importance économique et écologique, l'huitre *C. gigas*, à l'aide d'analyses chronobiologiques, moléculaires et physiologiques plus poussées. *C. gigas* est une espèce benthique présente dans de multiples régions du monde touchées par LAN (Falchi et al., 2016; Miossec et al., 2009). Etant un bivalve sessile, elle n'est pas capable de fuir les sources de LAN et est donc très susceptible d'y être exposée (FAO, 2016). L'hypothèse de ce travail de recherche est que LAN pourrait perturber la synchronisation des rythmes biologiques de *C. gigas*, en brouillant les signaux lumineux envoyés à l'organisme, et de ce fait perturber toute l'organisation temporelle des fonctions physiologiques et avoir des répercussions délétères sur la vie de l'huitre. Ces rythmes sont ubiquitaires et endogènes. Ils ont pour origine une horloge

moléculaire interne, présente dans chaque cellule de l'organisme. Cette horloge se synchronise avec son environnement en utilisant des signaux environnementaux tels que les cycles naturels de la lumière (Bradshaw and Holzapfel, 2010; Gaston et al., 2017). Cette synchronisation est essentielle puisqu'elle permet aux organismes de coordonner leur comportement et leur physiologie avec la rythmicité de leur milieu afin d'anticiper ses changements, leur conférant des avantages adaptatifs (Cermakian and Sassone-Corsi, 2000; Partch et al., 2014). Les cycles lumineux naturels (journalier, lunaire, annuel) sont des cycles physiques robustes et prédictibles présents depuis des milliards d'années dans l'environnement (Andreatta and Tessmar-Raible, 2020; Gaston et al., 2017). Ainsi, ils sont devenus au fil de l'évolution les principaux signaux environnementaux synchronisant l'horloge endogène des organismes avec leur environnement afin d'y être le mieux adapté (Goldbeter, 2008). Au contraire, les autres cycles tels que les cycles de température sont beaucoup plus variables, notamment dans le contexte actuel de réchauffement climatique. Ces signaux robustes et prédictibles ne sont perturbés que depuis peu par les activités humaines avec l'arrivée massive de LAN (Schubert and Kim, 2005). Chez l'huitre, des rythmes comportementaux journaliers, tidaux, lunaires ou encore annuels ont été préalablement décrits (Mat et al., 2012; Payton et al., 2017a; Payton and Tran, 2019; Tran et al., 2011). Ce travail se concentre sur le rythme journalier de *C. gigas*, qui a été étudié au laboratoire et sur le terrain. Ce rythme est généré par une horloge moléculaire dont le fonctionnement a également été étudié (Mat et al., 2014; Mat et al., 2016; Payton et al., 2017b; Perrigault and Tran, 2017; Tran et al., 2020a). Une des caractéristiques de ce rythme journalier est qu'il présente une importante plasticité permettant aux huitres de s'adapter facilement à de nouveaux environnements (Mat et al., 2012). Cependant, cette particularité pourrait aussi les rendre plus vulnérables à une perturbation par LAN. En modifiant l'intensité naturelle nocturne, LAN peut perturber la perception des variations naturelles de la lumière (journalières, lunaires, annuelles) par les organismes tels que l'huitre et ainsi empêcher leur synchronisation avec les événements cycliques de l'environnement (Falchi et al., 2011; Gaston and Bennie, 2014). Les rythmes biologiques étant essentiels à l'organisation temporelle de nombreux processus physiologiques, leur perturbation par LAN peut engendrer de graves conséquences chez *C. gigas*, une espèce clé des écosystèmes côtiers, suggérant alors d'importantes conséquences écologiques.

Ce travail de recherche s'inscrit dans le projet LUCIOLE (*Light pollution impacts on organisms living in coastal environments*) financé par l'Agence nationale de la recherche (ANR) et dont le but est de caractériser l'effet de LAN sur les écosystèmes cotiers. Ce projet se divise en quatre

tâches. La première consiste à cartographier et caractériser la présence de LAN sur le bassin d’Arcachon. La seconde s’attache à évaluer les effets de LAN chez l’huitre *in situ* (Ile aux oiseaux, bassin d’Arcachon). La troisième tâche consiste à caractériser ces effets sur les rythmes biologiques de l’huitre en laboratoire. Enfin, l’objectif de la quatrième tâche est d’évaluer l’impact de LAN sur la physiologie et les pathologies de *C. gigas*. Le travail réalisé ici s’inscrit dans les tâches 3 et 4 et est résumé dans la Figure 1.

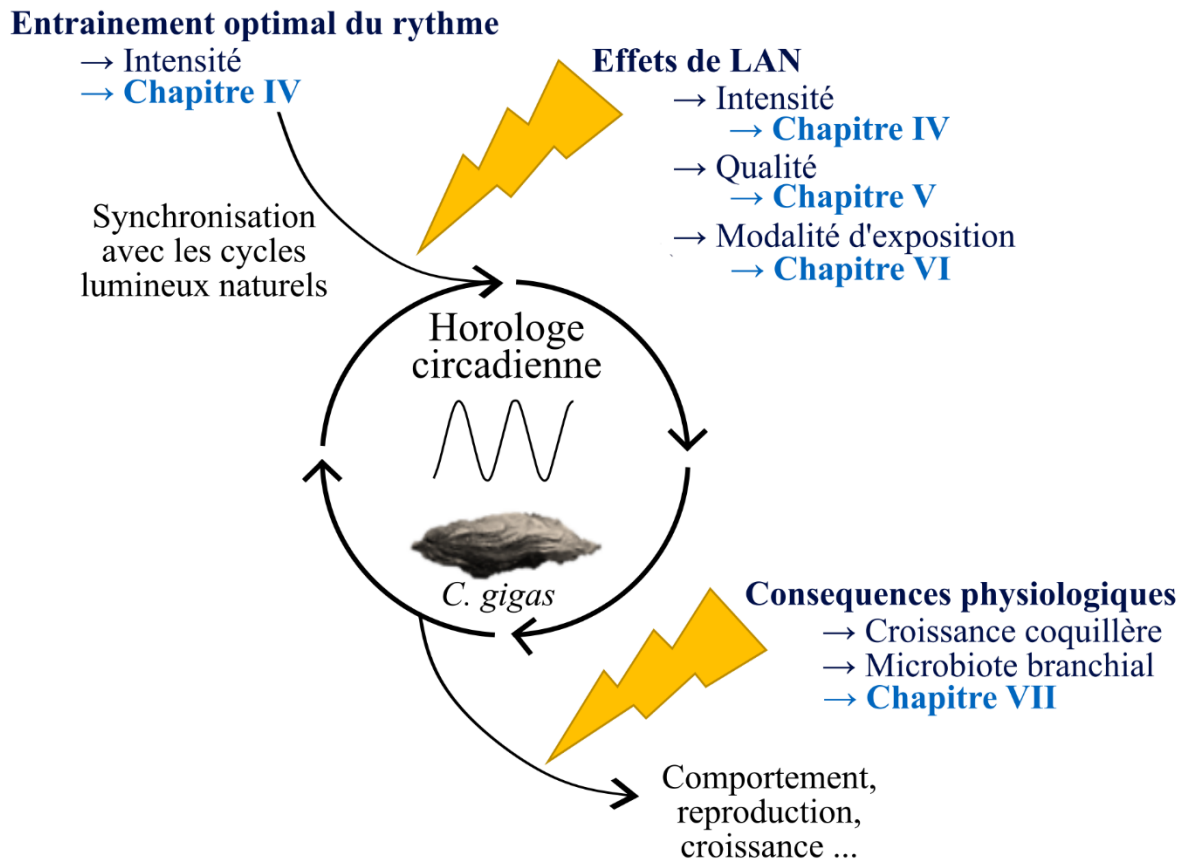
Avant d’évaluer l’impact de LAN sur le rythme journalier de l’huitre, la première partie (chapitre III) s’attache à caractériser l’entraînement de ce dernier par l’alternance jour / nuit en fonction de l’intensité lumineuse (de 1 à 10 000 lx) de la photophase (période lumineuse du cycle jour / nuit). Ce premier travail permet de trouver la gamme d’intensités lumineuses optimale de la photophase pour entraîner le rythme journalier comportemental de *C. gigas* afin de pouvoir évaluer au mieux les effets de LAN sur un rythme qui est initialement bien robuste.

Les études suivantes cherchent ensuite à évaluer l’impact de LAN sur le rythme journalier de l’huitre. Tout d’abord, les effets de différentes intensités faibles et réalistes de LAN allant de 0.1 à 25 lx sur le rythme journalier de l’huitre ont été évalués au niveau comportemental et moléculaire (chapitre IV). Le but de ce travail est de mettre pour la première fois en évidence les effets de LAN chez l’huitre et de déterminer quelle est l’intensité lumineuse de LAN la plus faible entraînant un maximum d’effets. Cette intensité a ensuite été utilisée pour les expérimentations suivantes (chapitre V et VII). Ce travail fait l’objet d’une publication dans le journal *Marine Pollution Bulletin* avec comme titre : “*Artificial light at night at environmental intensities disrupts daily rhythm of the oyster Crassostrea gigas*” par Botté et al. 2023 (doi : 10.1016/j.marpolbul.2023.114850).

Après avoir caractérisé les effets de LAN sur le rythme journalier de *C. gigas* en fonction de son intensité, la troisième partie (chapitre V) consiste à évaluer l’impact de LAN en fonction de sa composition spectrale (lumière blanche, bleue, verte, rouge) au niveau comportemental et moléculaire. En plus d’apporter des informations sur la sensibilité spectrale de l’huitre, l’objectif de cette étude est de tester l’efficacité d’une stratégie d’atténuation de LAN consistant à utiliser un spectre restreint entraînant le moins d’effets néfastes chez les organismes d’un environnement donné (Gaston et al., 2012). Cette étude s’intitule “*The effects of Artificial Light at Night on behavioral rhythm and related gene expression are wavelength dependent in the oyster Crassostrea gigas*” par Botté et al., et a été acceptée par le journal *Environmental Science and Pollution Research* (doi : 10.1007/s11356-023-30793-1).

Ensuite, l'effet de LAN a été caractérisé en fonction de sa modalité d'exposition (chapitre VI). Il s'agit ici de mimer en laboratoire la politique d'éclairage de certaines communes qui consiste à couper LAN pendant une partie de la nuit. Cette stratégie d'atténuation des effets de LAN, l'éclairage nocturne partiel ou *part-night lighting* (PNL) en anglais, est largement proposée dans la littérature et est déjà appliquée dans près de 40 % des communes françaises selon un rapport de 2021 (Gaston et al., 2012; Syndicat de l'éclairage and ADEME, 2021). Dans cette quatrième étude, c'est la politique d'éclairage de la ville de Lanton qui est mimée, une commune du bassin d'Arcachon (France), zone importante d'ostréiculture très touchée par LAN. Tester l'impact de cette stratégie d'atténuation est très rarement fait dans la littérature et participe au caractère novateur de cette étude. Ce travail est publié dans le journal *Science of the Total Environment* sous le titre de “*Is part-night lighting a suitable mitigation strategy to limit ALAN's effects on the biological rhythm at the behavioral and molecular scales of the oyster Crassostrea gigas?*” par Botté et al. 2023 (doi : 10.1016/j.scitotenv.2023.167052).

Les trois précédentes études (chapitres IV, V et VI) évaluent l'impact de LAN sur le rythme journalier de l'huître, qui, avec les rythmes biologiques en général, permettent l'organisation temporelle des processus physiologiques qui s'en trouvent alors optimisés. L'impact de LAN sur le rythme journalier de *C. gigas* pourrait alors affecter sa physiologie (Golombek and Rosenstein, 2010). Ainsi, la dernière partie de ce travail (chapitre VII) consiste à évaluer les potentielles conséquences physiologiques de LAN chez l'huître en s'intéressant à deux processus biologiques distincts : la croissance coquillière journalière et le microbiote branchial. Le lien entre la perturbation de ces deux fonctions physiologiques et la perturbation du rythme journalier de l'huître par LAN est également évaluée. Ce travail est soumis dans le journal *Science of the Total Environment* et s'intitule “*Link between the robustness of diurnal behavior and disruption of the gills microbiota and the shell growth of the oyster Crassostrea gigas exposed to artificial light at night*” par Botté et al.



**Figure 1.** Problématiques abordées lors de ce travail de recherche. En bleu les chapitres traitant de chaque problématique.



# **Chapitre I**

## **Introduction**

## 1. Objectifs de l'étude

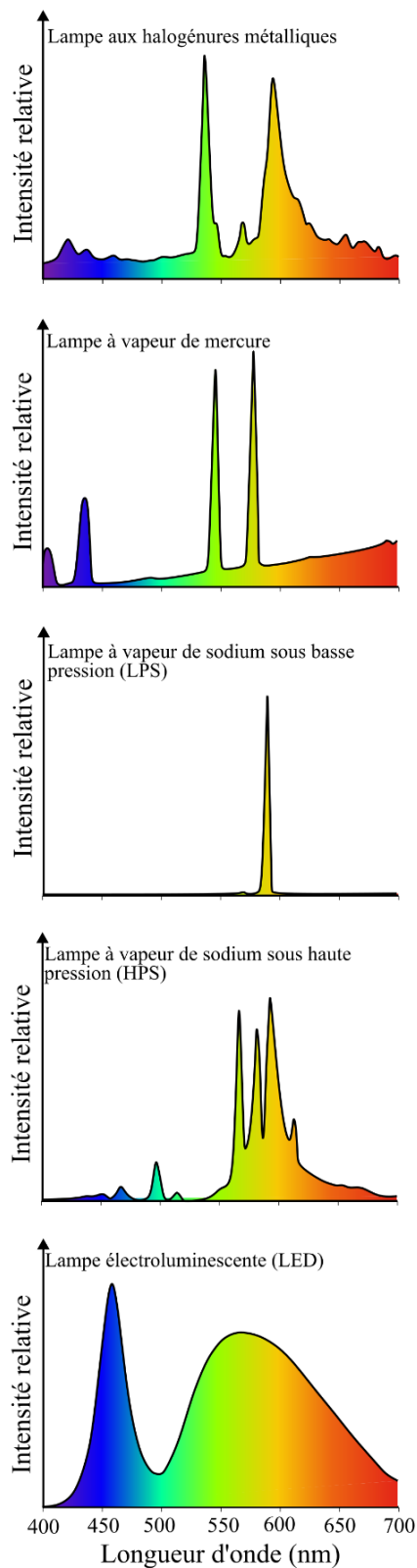
L'objectif de ce travail de recherche est de caractériser l'impact de LAN sur le rythme journalier de l'huitre creuse *Crassostrea gigas*, ainsi que les potentielles conséquences physiologiques de cette perturbation du rythme. Depuis plusieurs années, l'intérêt pour l'étude des effets de LAN chez les organismes côtiers est grandissant. Cependant, il reste encore beaucoup de connaissances à acquérir afin de comprendre l'impact global de LAN sur les environnements côtiers, qui en plus d'être des hot-spots de la biodiversité, supportent d'importantes activités économiques (pêche, tourisme). Ce travail s'intéresse au bivalve *C. gigas*, un mollusque benthique d'importance écologique et économique. Bien qu'inévitablement exposée à LAN du fait de son caractère sessile, son impact chez l'huitre n'avait encore jamais été étudié.

La première question posée lors de ce travail en amont des effets de LAN sur le rythme journalier de *C. gigas*, est : quel est l'effet de l'intensité de la photophase sur l'entraînement du rythme journalier de l'huitre ? L'objectif de cette première étude est de trouver l'intensité lumineuse optimale de la photophase pour entraîner le rythme journalier comportemental de *C. gigas*, afin de pouvoir ensuite évaluer l'effet de LAN sur un rythme journalier robuste. Ensuite, l'effet de LAN sur le rythme journalier de l'huitre est évalué. Pour cela, deux approches complémentaires ont été utilisées : l'approche comportementale et l'approche moléculaire. L'approche comportementale consiste à enregistrer en continue l'activité valvaire de *C. gigas* à l'aide de la valvométrie Haute Fréquence Non-Invasive (HFNI). Ce comportement valvaire fait ensuite l'objet d'analyses chronobiologiques qui permettent, à l'aide d'analyses spectrales et du modèle cosinor, d'étudier de manière très détaillée les caractéristiques du rythme journalier de *C. gigas* qui est contrôlé par l'horloge circadienne, déjà décrit à plusieurs reprises (Mat et al., 2012; Mat et al., 2014). Ces analyses déterminent la présence ou l'absence d'un rythme comportemental journalier chez l'huitre et permettent d'en déterminer les paramètres qui peuvent être affectés par LAN. L'approche moléculaire, quant à elle, s'intéresse à l'effet de LAN sur l'expression des gènes de l'horloge circadienne de *C. gigas* dont le fonctionnement a été préalablement décrit (Perrigault and Tran, 2017). Cette horloge est entraînée par l'alternance jour / nuit, permettant la synchronisation des processus physiologiques et du comportement des organismes avec les cycles de lumière journaliers (Pilorz et al., 2018). Cette approche moléculaire ne concerne pas seulement l'étude des gènes de l'horloge circadienne de l'huitre mais également l'expression de gènes impliqués dans la perception de la lumière directement en lien ou non avec les rythmes et de gènes sous contrôle de l'horloge. Bien que l'huitre soit dépourvue de structure oculaire, elle est capable de détecter la luminosité ambiante, même à de

faibles intensités, ainsi que ses variations (Payton and Tran, 2019). L’huitre peut percevoir son environnement lumineux de façon non visuelle, par le biais de photorécepteurs qui font notamment partie de la famille des cryptochromes et des opsines. Chez l’huitre, trois gènes codant pour des rhodopsines, appartenant à la famille des opsines, et un gène codant pour un cryptochrome 1 ont déjà été identifiés et séquencés (Cronin and Johnsen, 2016; Falcon et al., 2020; Tran et al., 2015; Wu et al., 2018). L’expression de deux autres gènes impliqués dans des processus physiologiques en lien avec les rythmes est étudiée, nous apportant des indices concernant le potentiel impact physiologique de LAN chez *C. gigas*, ce qui correspond à la seconde problématique de ce travail : quelles sont les conséquences physiologiques de l’exposition à LAN chez l’huitre ? Le premier gène étudié est *CgHiomt-like*, un homologue du gène *Hiomt* des mammifères impliqué dans la synthèse de mélatonine, l’hormone du sommeil, et le second est le gène *CgOctβ2*, codant pour un récepteur à l’octopamine impliqué dans les fonctions d’éveil et de repos (Pevet et al., 1980; Tran et al., 2020a). L’octopamine et la mélatonine sont aussi deux molécules impliquées dans de nombreuses fonctions physiologiques (immunité, reproduction, croissance ...) (Roeder, 2020; Tan et al., 2010). En plus de l’expression de ces deux gènes, l’impact de LAN sur deux fonctions physiologiques importantes de l’huitre est étudié : la croissance coquillère et le microbiote branchial. Ce dernier correspond à l’ensemble des micro-organismes vivant dans les branchies et même si ses fonctions précises chez l’huitre ne sont pas connues, il remplit des fonctions essentielles chez divers organismes (nutrition, développement, immunité ...) (Hou et al., 2022; McFall-Ngai et al., 2013). Ces deux processus physiologiques sont liés aux cycles journaliers dont la perception peut être altérée par LAN (de Winter et al., 2023; Liang et al., 2015; Louis et al., 2022; Voigt et al., 2016).

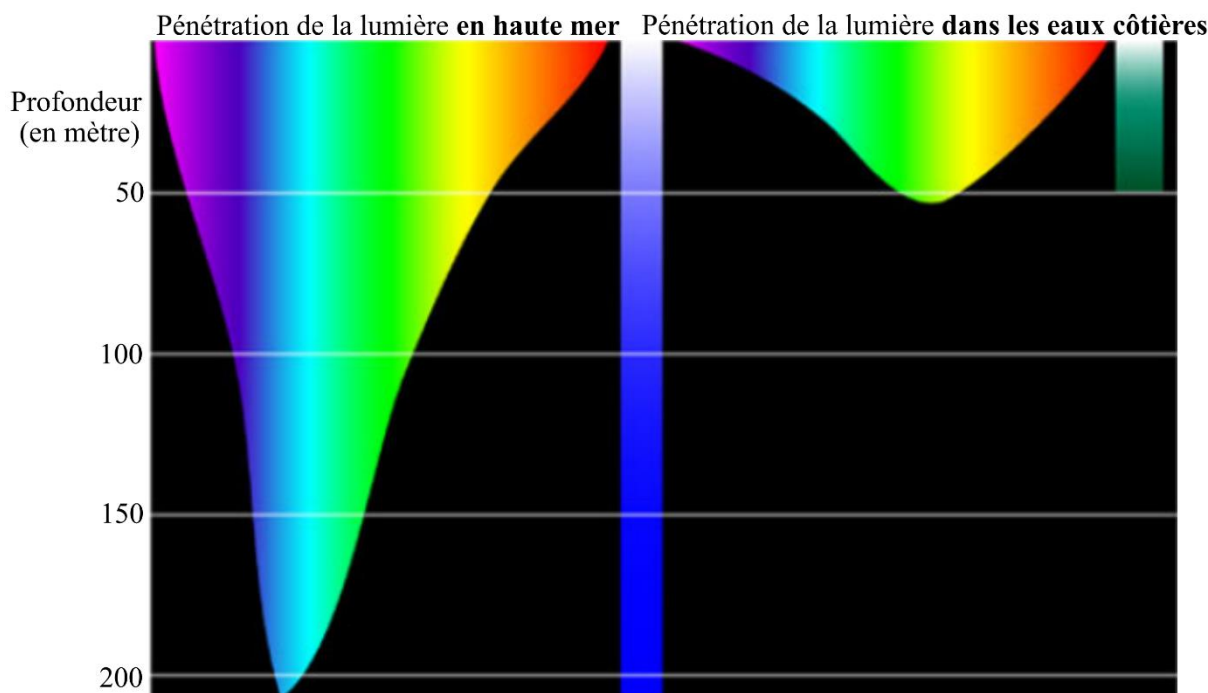
Lors de ce travail en laboratoire, il était primordial de se rapprocher au plus près des conditions d’exposition des huitres à LAN dans leur milieu naturel. Pour cela, LAN a été mimé à l’aide de rubans de lampes électroluminescentes (*Light Emitting Diode*, LED), un type d’éclairage dont l’utilisation augmente rapidement dans les domaines de l’éclairage public et domestique (Zissis and Bertoldi, 2018). Par exemple, le nombre de LEDs vendues pour l’éclairage résidentiel a augmenté de 46 % de 2016 à 2017 en France (Zissis et al., 2021). Mimer ce type d’éclairage en particulier est d’autant plus important que son arrivée massive pourrait amplifier l’effet de LAN sur les environnements côtiers du fait de sa composition spectrale. Contrairement aux technologies d’éclairage plus anciennes, telles que les lampes à vapeur de

sodium sous haute pression (*High Pressure Sodium, HPS*), le spectre des LEDs est riche en courtes longueurs d'onde (Figure 2).



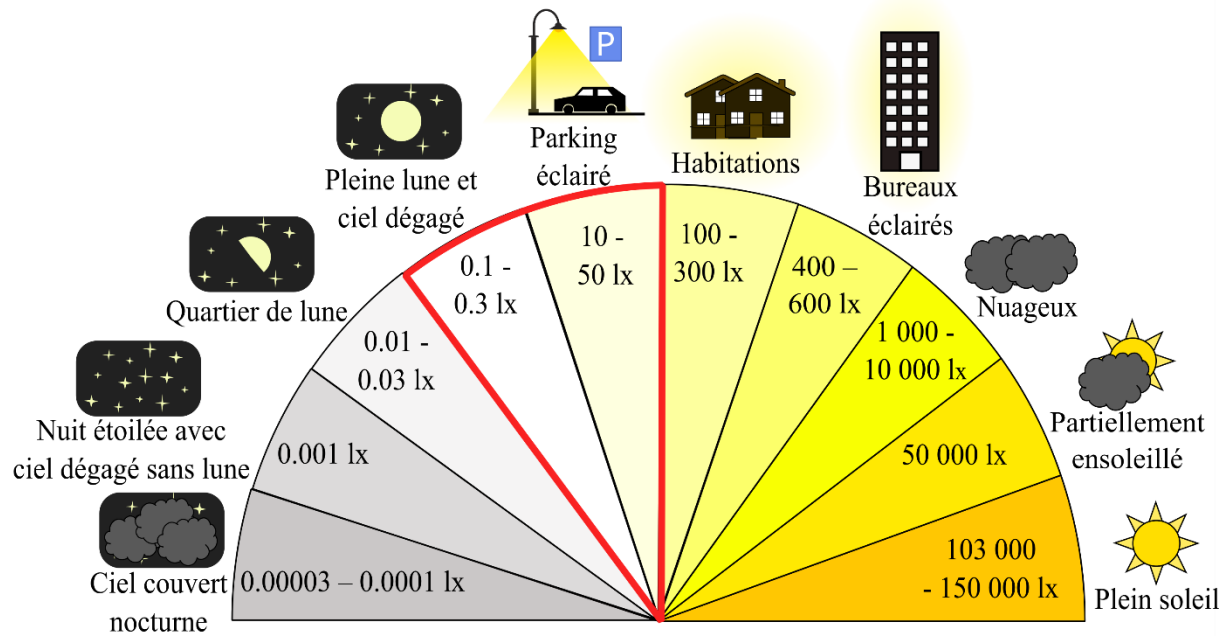
**Figure 2.** Composition spectrale de différentes technologies d'éclairage. Les données sont issues de <http://www.ngdc.noaa.gov/dmsp/spectra.html>

Ces courtes longueurs d’onde, plus énergétiques, sont capables de pénétrer plus loin dans la colonne d’eau (Figure 3) et sont également décrites comme étant les mieux perçues par les organismes aquatiques et donc susceptibles d’engendrer plus d’effets (Grubisic, 2018; Grubisic et al., 2019; Longcore et al., 2018).



**Figure 3.** Pénétration des différentes longueurs d’onde de la lumière en fonction de la profondeur en haute mer et dans les eaux côtières. Diagramme modifié à partir de celui issu du site de l’Agence américaine d’observation océanique et atmosphérique (NOAA-OE) : <https://oceanexplorer.noaa.gov/explorations/04deepscope/background/deeplight/media/diagram3.html>

En plus de la nature de l’éclairage, ce travail cherche à reproduire des intensités de LAN qu’il est possible de rencontrer dans l’environnement. Ainsi, les intensités d’exposition choisies vont de 0.1 à 25 lx, qui peuvent être qualifiées d’intensités faibles et réalistes (Figure 4).



**Figure 4.** Valeurs d'intensités lumineuses naturelles et artificielles tirées de Rich and Longcore (2006). En rouge apparaît la gamme d'intensités lumineuses de LAN utilisée dans ce travail.

La plus faible intensité testée correspond au « *skyglow* » terme anglo-saxon qui désigne la lumière artificielle diffusée dans l'atmosphère, provoquant un éclaircissement du ciel nocturne (Hänel et al., 2018; Luginbuhl et al., 2014). L'intensité la plus importante correspond à celle émise par un parking éclairé (Rich and Longcore, 2006). Lors de ce travail, il s'agissait également de refléter les conditions d'exposition à LAN les plus représentées aujourd'hui à savoir un éclairage continu pendant toute la durée de la nuit en lumière blanche. Cependant, différentes stratégies d'atténuation de l'impact de LAN sont proposées dans la littérature et commencent à être appliquées (Gaston et al., 2012). Ces stratégies jouent sur différentes caractéristiques de LAN dans le but d'en limiter les effets : son intensité, sa longueur d'onde et sa modalité d'exposition. Ici, nous avons donc cherché à évaluer l'impact de LAN sur le rythme journalier de l'huitre en fonction de son intensité (0.1 – 25 lx), sa longueur d'onde (lumière blanche, bleue, verte, rouge) et sa modalité d'exposition (coupure de l'éclairage nocturne pendant une partie de la nuit).

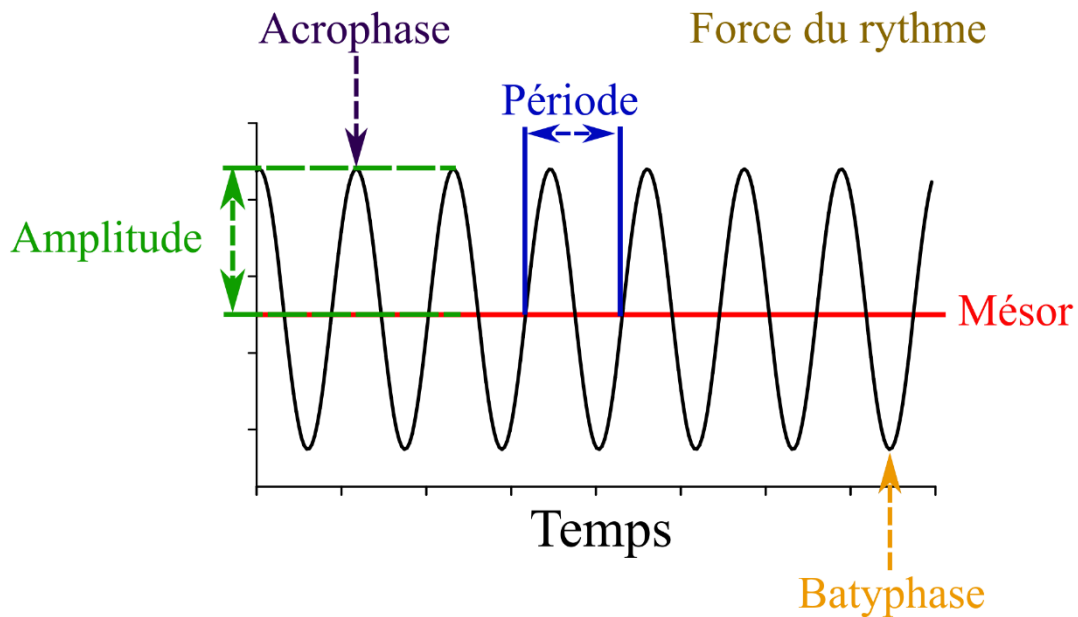
## **2. Les rythmes biologiques**

### **2.1. Que sont les rythmes biologiques ?**

Depuis des milliards d'années, la vie a évolué sous l'influence de la lune et du soleil (Andreatta and Tessmar-Raible, 2020). Dans l'environnement, trois principaux cycles de lumière sont présents (Andreatta and Tessmar-Raible, 2020; Gaston et al., 2014; Gaston et al., 2017). Tout d'abord, le cycle journalier est caractérisé par un cycle jour / nuit de 24 h, créé par la rotation de la terre autour de son axe. Ensuite, le cycle annuel est engendré par le mouvement orbital de la terre et l'inclinaison de son axe par rapport au soleil, entraînant des variations saisonnières de la longueur du jour, de l'intensité lumineuse et de la durée du crépuscule. Enfin, il y a le cycle lunaire et plus particulièrement le mois synodique d'une durée de 29.5 jours, temps que la lune met pour achever une révolution autour de la Terre entre deux pleines lunes. Ces variations naturelles et prédictibles de lumière sont utilisées comme signaux par les organismes et permettent d'entraîner et de synchroniser leurs rythmes biologiques (Gaston et al., 2017; Longcore and Rich, 2016).

Ces rythmes peuvent être définis comme des changements physiologiques cycliques (Halberg, 1969). Ils sont présents chez une large variété d'organismes qu'ils soient terrestres ou aquatiques : les cyanobactéries, les champignons, les plantes, les insectes, les poissons, ou encore les mammifères (Bhadra et al., 2017; Froland Steindal and Whitmore, 2019). Les rythmes se définissent par les caractéristiques suivantes (Figure 5) :

- Une période : intervalle de temps séparant deux évènements identiques.
- Le méso : niveau moyen du rythme.
- L'amplitude : différence entre la valeur la plus élevée du paramètre étudié et celle du méso.
- L'acrophase : valeur sur l'échelle de temps correspondant à la valeur la plus élevée du paramètre étudié.
- La batyphase : valeur sur l'échelle de temps correspondant à la valeur la plus basse du paramètre étudié.



**Figure 5.** Paramètres caractérisant un rythme.

Beaucoup de processus biologiques sont cycliques avec des périodes allant d'une fraction de seconde à des dizaines d'années (Goldbeter, 2008). Ces processus sont coordonnés entre eux à l'aide de l'horloge moléculaire interne et ils sont également synchronisés avec des facteurs environnementaux. Ces derniers sont appelés *zeitgeber* (« donneur de temps » en allemand) et sont définis comme des facteurs périodiques de l'environnement, tels que les cycles lumineux, permettant de synchroniser l'horloge interne avec la rythmicité du milieu (Aschoff, 1960). Une fois synchronisée avec son environnement, l'horloge endogène coordonne les processus biologiques avec les cycles environnementaux (Bell-Pedersen et al., 2005). Cette coordination est primordiale pour la fitness des organismes, mais également pour leur survie (Bell-Pedersen et al., 2005; Bradshaw and Holzapfel, 2010; Emerson et al., 2008; Gaston et al., 2017). Elle leur permet d'anticiper les changements cycliques de l'environnement et d'organiser temporellement leur physiologie ainsi que leur comportement en fonction de cette rythmicité (journalière, lunaire, annuelle, ...) (Goldbeter, 2008; Golombek and Rosenstein, 2010). Cela permet d'optimiser des processus essentiels tels que se nourrir, la respiration, l'immunité, la croissance ou encore la reproduction (Helm et al., 2017; Yerushalmi and Green, 2009). Ainsi, la synchronisation des organismes avec leur environnement joue un rôle primordial dans le fonctionnement et le maintien des écosystèmes (Helm et al., 2017; Mougi, 2021).

Il existe différents types de rythmes caractérisés en fonction de leur période. Un rythme ayant une période de  $24 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$  est un rythme « circadien » (Gachon et al., 2004). Ces rythmes



circadiens sont synchronisés avec l'alternance jour / nuit et organisent les processus physiologiques (systèmes immunitaire, endocrine, cardiovasculaire, ...) ainsi que le comportement autour de ce cycle lumineux (Pilorz et al., 2018). Les rythmes ayant une période inférieure à 20 h sont dits « ultradiens », alors que ceux ayant une période supérieure à 28 h sont dits « infradiens » (Gachon et al., 2004). Au sein des rythmes ultradiens, on compte le rythme tidal, que l'on retrouve notamment chez les organismes côtiers ou estuariens (Wilcockson and Zhang, 2008). En effet, ce rythme suit le cycle des marées ce qui lui confère une période d'environ 12.4 h, correspondant à l'intervalle de temps s'écoulant entre deux marées hautes ou deux marées basses, créées par l'interaction entre plusieurs phénomènes : la rotation de la Terre autour de son axe, celle de la lune autour de la Terre et l'interaction de leur forces gravitationnelles (Andreatta and Tessmar-Raible, 2020; Wilcockson and Zhang, 2008). Ces rythmes tidaux sont d'une grande importance chez les organismes soumis au régime des marées car chacune d'elles entraînent des variations drastiques de température, salinité, pression hydrostatique ou encore de prédation (Wilcockson and Zhang, 2008). Ainsi, dans ces environnements, il est essentiel pour les organismes de pouvoir anticiper ces changements environnementaux afin d'assurer leur survie et d'optimiser leur fitness. Ensuite, au sein des rythmes infradiens on compte les rythmes lunaires et annuels. Les rythmes lunaires ont une période d'environ 29.5 jours et sont synchronisés par la variation de la luminosité nocturne (Kyba et al., 2017b; Secondi et al., 2019). Même si l'intensité de la lune est très faible (0.05 – 0.2 lx), tout comme ses variations, les organismes peuvent les percevoir et synchronisent certains processus biologiques avec celles-ci (Kyba et al., 2017b). Par exemple, le cycle lunaire participe à la synchronisation de la libération des gamètes dans la colonne d'eau chez des organismes marins tels que les coraux ou encore le ver marin *Platynereis dumerilii* (Kaniewska et al., 2015; Tessmar-Raible et al., 2011; Zurl et al., 2022). Enfin, les organismes sont soumis à un rythme annuel d'une période d'environ 1 an (Bradshaw and Holzapfel, 2010). La variation de la photopériode au fil des jours et des mois est un signal environnemental utilisé par les organismes pour être synchrones avec les changements annuels, afin d'optimiser les processus biologiques saisonniers, comme par exemple la période de gamétogénèse (Bradshaw and Holzapfel, 2010; Russart and Nelson, 2018).

## **2.2. L'horloge moléculaire**

Les rythmes circadiens sont déterminés génétiquement par une horloge moléculaire endogène qui est présente dans chaque cellule des organismes (Partch et al., 2014). Si elle ne perçoit pas

de signaux externes, donc en conditions constantes, elle fonctionne de façon autonome, c'est-à-dire en libre-cours ou *free-running* en anglais (Aschoff, 1981; Cermakian and Sassone-Corsi, 2000). Cela permet aux organismes même sans stimuli externes de conserver un rythme avec une période plus ou moins éloignée de celle des cycles environnementaux et de conserver la coordination de leur processus biologiques. En présence du cycle lumineux journalier naturel, l'horloge circadienne est entraînée par la lumière et synchronisée avec son environnement, entraînant la coordination de la physiologie et du comportement des organismes avec leur environnement (Partch et al., 2014; Russart and Nelson, 2018). Cette synchronisation des organismes avec la temporalité de leur milieu est permise par un mécanisme moléculaire complexe régulé au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel (Cermakian and Sassone-Corsi, 2000).

Le mécanisme moléculaire de l'horloge circadienne fait intervenir différentes molécules très conservées au cours de l'évolution qui sont retrouvées des cyanobactéries aux mammifères en passant par les plantes (Amaral et al., 2014; Bhadra et al., 2017; Dunlap, 1999). Le principe de ce mécanisme est basé sur des gènes dont l'expression est oscillante, à travers des boucles de rétrocontrôles positives et négatives, qui constituent le cœur fonctionnel de l'horloge. C'est ce mécanisme qui constitue la mesure du temps chez tous les organismes. Afin d'être synchrones avec les cycles de l'environnement, les composants de ces boucles vont directement ou indirectement recevoir des signaux permettant l'entraînement de l'horloge à la rythmicité du milieu (Bell-Pedersen et al., 2005).

Au cœur de cette horloge moléculaire se trouve une première boucle de rétrocontrôle négatif, animée par des facteurs de transcription positifs et négatifs. Les éléments positifs activent la transcription de certains gènes codant pour les éléments négatifs. Puis, lorsque les facteurs de transcription négatifs sont présents en quantité suffisante, ils inhibent l'activité des facteurs de transcription positifs en interagissant avec eux. L'expression des éléments négatifs est alors réprimée, réduisant leur présence et permettant la réactivation des facteurs de transcription positifs, puis le cycle recommence. Ce cycle se répète environ toutes les 24 h, donnant une rythmicité autonome à l'horloge moléculaire qui devrait conserver cette période si aucun *zeitgeber* n'est détecté (Bell-Pedersen et al., 2005). Une seconde boucle, appelée « boucle stabilisatrice », intervient dans la machinerie de l'horloge moléculaire au sein de laquelle deux composants entrent en compétition pour activer ou réprimer la transcription d'un des éléments positifs de la boucle de rétrocontrôle négatif (Amaral et al., 2014).

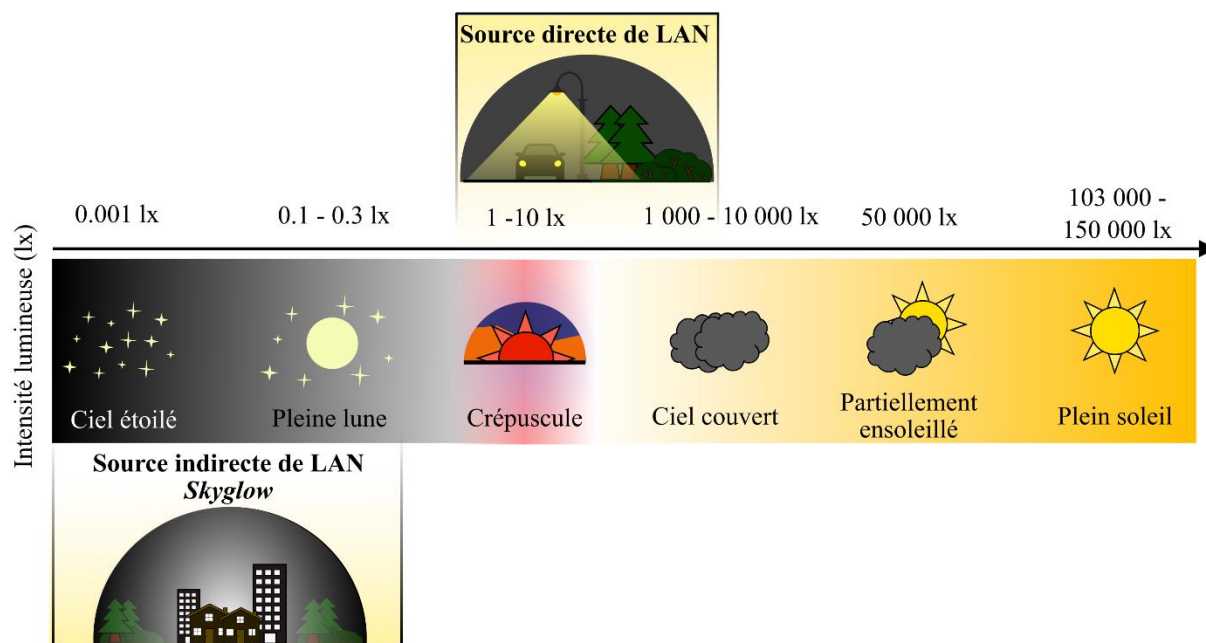
Le mécanisme moléculaire de l'horloge interne donne une rythmicité et organise temporellement de nombreuses activités biochimiques, physiologiques et comportementales. Pour cela, divers mécanismes moléculaires encore peu connus sont chargés d'activer ou de réprimer l'expression de gènes impliqués dans des processus variés tels que les processus cardiovasculaires, reproductifs, le métabolisme du glucose ou encore l'immunité (Brzezinski et al., 2021; Cox and Takahashi, 2019; Crnko et al., 2019; Curtis et al., 2014; Martinez-Bakker and Helm, 2015; Panda, 2016). Tout d'abord, les composants de l'horloge peuvent eux-mêmes directement réguler l'expression de gènes. En effet, ces composants sont des facteurs de transcription positifs et ou négatifs et donc peuvent activer ou réprimer l'expression d'un grand nombre de gènes (Koike et al., 2012). Certains composants peuvent également agir dans des mécanismes épigénétiques, comme par exemple sur la chromatine en la rendant plus ou moins accessible pour des facteurs de transcription (ex : activité Histone Acetyl Transferase de la protéine CLOCK), rendant possible ou pas la transcription de gènes cibles (Doi et al., 2006; Mendoza-Viveros et al., 2017; Menet et al., 2014). Les composants de l'horloge peuvent également activer ou inhiber de façon circadienne l'activité d'autres facteurs de transcription (Zhang et al., 2010). Les processus de régulation post-transcriptionnelle, tels que la polyadénylation ou l'épissage alternatif, interviennent également dans l'organisation temporelle des processus physiologiques et peuvent être contrôlés par l'horloge (Kojima et al., 2012; Mendoza-Viveros et al., 2017).

### **3. La pollution lumineuse nocturne**

#### **3.1. Qu'est-ce que LAN ?**

La pollution lumineuse nocturne, se définit comme « l'altération des niveaux de lumière naturelle dans l'environnement nocturne produit par l'introduction d'éclairage artificiel » (Falchi et al., 2011). La lumière artificielle nocturne ou LAN se divise en deux principales composantes. La première correspond à des émissions directes pouvant provenir par exemple de véhicules, d'habitations, d'éclairages publics ou encore de panneaux publicitaires. L'intensité des sources directes de LAN est comprise entre moins de 10 lx et plus de 100 lx (Figure 6) et peut être perçue à plusieurs km de sa source, notamment lorsque la lumière est émise sur le plan horizontal (Gaston, 2018). La deuxième composante est une source indirecte de LAN appelée le *skyglow*, désignant le halo lumineux visible la nuit au-dessus des grandes villes. Celui-ci est créé à partir de la lumière artificielle émise vers le ciel qui va alors être diffusée dans l'atmosphère par l'action de particules, d'aérosols et de gouttelettes d'eau,

entraînant un éclaircissement du ciel (Chepesiuk, 2009; Gaston, 2018; Luginbuhl et al., 2014). L'intensité du *skyglow* est bien moins importante que celle des sources directes de LAN, inférieure à 1 lx (Figure 6), mais elle peut se répandre à des centaines de kilomètres de sa source (Gaston, 2018; Hänel et al., 2018).



**Figure 6.** Valeurs d'intensités lumineuses naturelles et sources de lumière artificielle nocturne tirées de Rich and Longcore (2006) et Hänel et al. (2018).

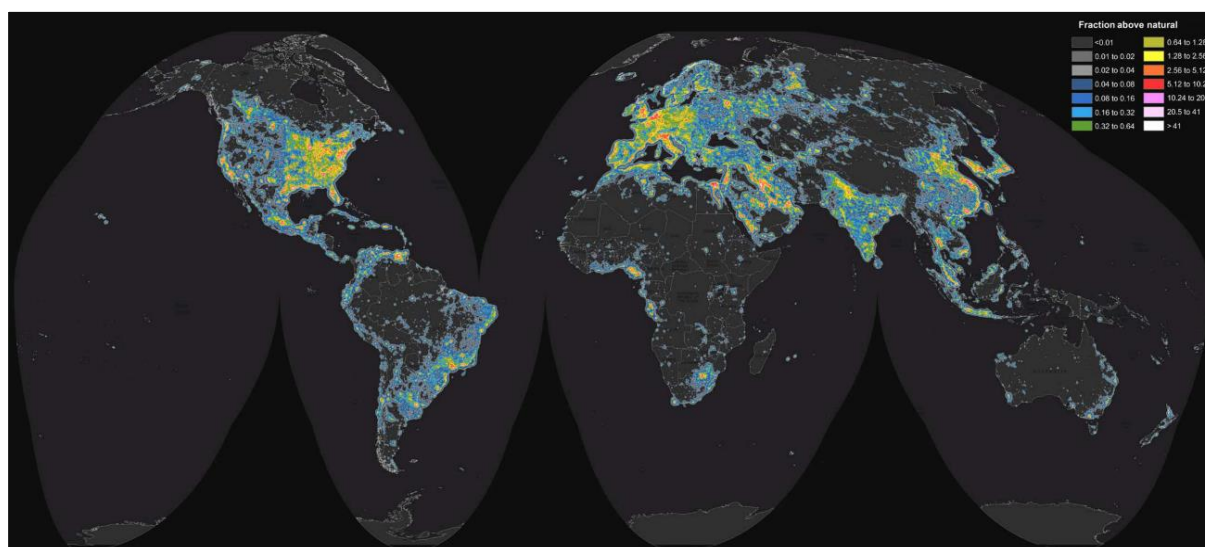
Ainsi, des zones qui ne semblent pas impactées directement par LAN peuvent l'être par l'intermédiaire du *skyglow* à des intensités à peine perceptibles à l'œil nu (Depledge et al., 2010). L'intensité et l'étendue du *skyglow* dépend de différents paramètres comme les conditions météorologiques ou encore le niveau de pollution atmosphérique. Lorsque la charge en particules atmosphériques augmente (ciel couvert, pollution atmosphérique importante), l'intensité du *skyglow* augmente elle-aussi près de ses sources mais diminue dans les zones plus éloignées et inversement (Aube, 2015; Luginbuhl et al., 2014). Aussi, la présence de neige amplifie le *skyglow*, phénomène qui porte le nom de « *snowglow* » (Jechow and Hölker, 2019). D'autres paramètres interviennent également comme les propriétés de réflexion spectrale du sol, la présence d'obstacles à la diffusion (montagnes, arbres, bâtiments) ou les caractéristiques des appareils d'éclairage (Aube, 2015). Selon l'étude de Cox et al. (2022), le *skyglow* couvrirait 46.9 % des terres émergées contre 26.5 % pour les sources directes de LAN.

Au cours de l'Histoire, de nombreuses manières de produire LAN se sont succédées comme l'utilisation de la graisse animale ou encore l'utilisation de lampes à huiles. Au début du XIX<sup>ème</sup> siècle, l'invention des lampes à gaz par William Murdoch marque un tournant dans l'histoire de LAN puisque ce sont les premières à avoir été massivement commercialisées (DiLaura, 2008). LAN telle qu'on la connaît aujourd'hui est née en 1879 lors de la révolution industrielle, avec la première démonstration de l'ampoule à incandescence de Thomas Edison à New-York, qui va détrôner les lampes à gaz (Chepesiuk, 2009; Schubert and Kim, 2005). Après avoir colonisé les villes, ce type d'éclairage s'est répandu dans les milieux ruraux puis a été remplacé par différentes technologies qui se sont succédées avec notamment : les tubes fluorescents, les lampes à vapeur de mercure ou encore les lampes à vapeur de sodium (DiLaura, 2008; Longcore and Rich, 2016). Aujourd'hui une nouvelle technologie d'éclairage est entrain de remplacer les précédentes dans les domaines de l'éclairage public ou domestique, des transports, de la médecine, ou encore de l'agriculture : la LED (Gaston, 2018; Zielinska-Dabkowska, 2018; Zissis and Bertoldi, 2018). Son utilisation croissante est due à plusieurs avantages. C'est un type d'éclairage peu coûteux qui fournit un meilleur rendement des couleurs comparé aux technologies d'éclairage précédentes comme les HPS (Gaston, 2018; Zissis and Bertoldi, 2018). De plus, les caractéristiques des LEDs, telles que leur intensité ou leur spectre, sont très facilement modulables (Zissis and Bertoldi, 2018). Cependant, le spectre lumineux des LEDs blanches classiquement utilisées est large et riche en courtes longueurs d'onde (450–480 nm, voir Figure 2), ce qui pourrait provoquer de grands changements dans le ciel nocturne en termes de spectre et d'intensité (Kyba, 2018; Luginbuhl et al., 2014).

### **3.2. Répartition géographique de LAN**

Au fil du temps, l'utilisation de LAN s'est répandue partout dans le monde du fait des avantages qu'elle procure à nos sociétés et en fait aujourd'hui partie intégrante. Elle nous permet de prolonger nos journées afin de continuer nos activités sociales, professionnelles et sportives à l'aide d'éclairages extérieurs qui peuvent rester allumés du crépuscule jusqu'à l'aube (Chepesiuk, 2009; Kyba et al., 2014; Kyba et al., 2015). LAN provient également de l'éclairage domestique et industriel et est utilisée à des fins de transports (routes, véhicules, aéroports, parking, ...), de sécurité (dont l'efficacité est très controversée), de publicité ou encore esthétiques (Falchi et al., 2011; Gaston et al., 2015a; Luginbuhl et al., 2009; Steinbach et al., 2015).

LAN est aujourd’hui une source de pollution répandue dans le monde entier (Figure 7) puisqu’environ 83 % de la population mondiale vit sous un ciel touché par LAN (Davies and Smyth, 2018; Falchi et al., 2016). Cependant, c’est aussi un type de pollution hétérogène dans l’espace. Le pays le plus pollué est Singapour où la totalité de la population vit sous un ciel tellement exposé à LAN que leurs yeux ne peuvent pas complètement s’adapter à la vision nocturne (Falchi et al., 2016; Gaston et al., 2014). L’Europe, comme les Etats-Unis, sont également très touchés par LAN puisqu’environ 99 % de leur population vit sous un ciel nocturne éclairé artificiellement (Falchi et al., 2016). D’autres pays sont également très pollués tels que le Koweït, le Qatar, les Emirats Arabes, l’Arabie Saoudite, la Corée du Sud, Israël, l’Argentine ou encore la Lybie (Falchi et al., 2016). Au contraire, certains pays ne sont que très peu affectés par LAN comme le Tchad ou Madagascar, dont environ 75 % de leur population vit sous un ciel immaculé (Falchi et al., 2016). Dans les pays peu touchés par ce phénomène, on compte également le Groenland, la république d’Afrique centrale, Niue, la Somalie et la Mauritanie (Falchi et al., 2016).



**Figure 7.** Carte mondiale de la luminosité artificielle du ciel (Falchi et al., 2016).

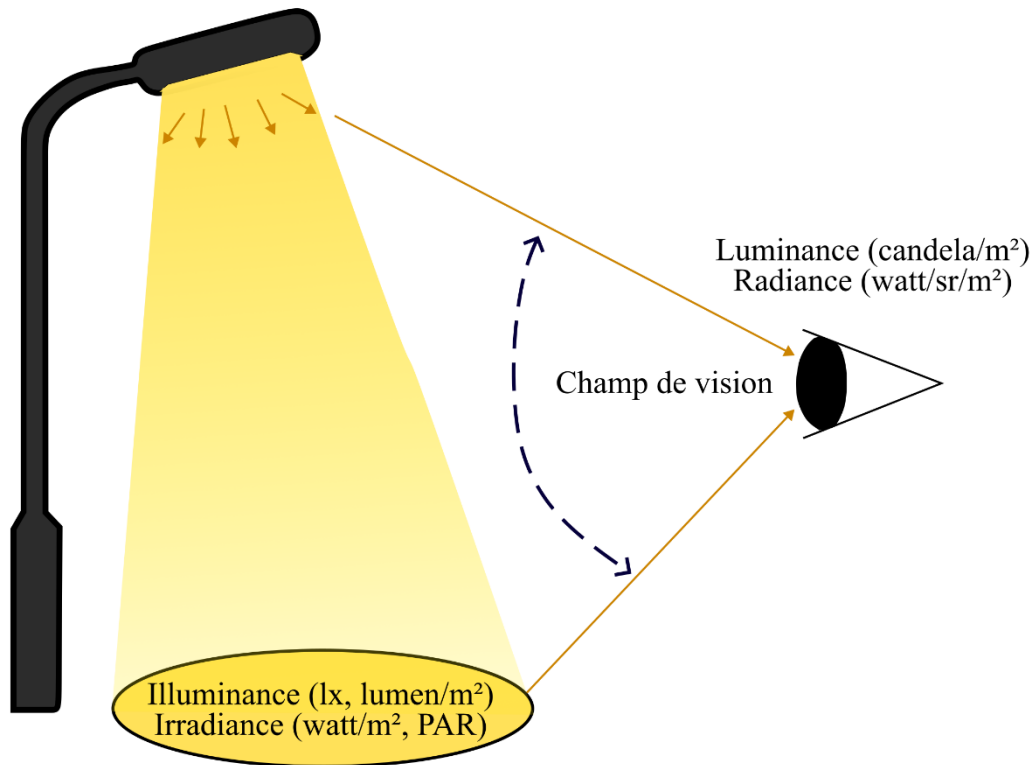
Les zones qui sont aujourd’hui peu ou pas touchées par LAN sont susceptibles de le devenir puisque LAN est le type de pollution augmentant le plus rapidement (Cinzano et al., 2001). En effet, de 2011 à 2022, la luminosité du ciel a augmenté en moyenne de 9.6 % par an (Kyba et al., 2023). De plus, même si LAN est plutôt associée aux sociétés et activités humaines, c’est un type de pollution émis également par des zones rurales et qui peut toucher des zones censées être préservées des activités humaines (Cox et al., 2022). Par exemple, Davies et al. (2016) ont

mis en évidence que 35 % des aires marines protégées étaient touchées par ce phénomène. De plus, Garrett et al. (2019) ont montré que seulement moins d'un tiers des zones clés pour la biodiversité sont exposées à un ciel nocturne immaculé, tandis que plus de la moitié n'ont pas une seule zone immaculée. Ces zones clés pour la biodiversité affectées par LAN sont surtout celles présentes dans des zones de fortes densité humaine avec un fort produit intérieur brut (PIB) (Garrett et al., 2019). En effet, il a déjà été montré que l'activité économique, représentée par exemple par le PIB par habitant, et la densité urbaine sont corrélées à l'existence de LAN (Gallaway et al., 2010).

### **3.3. Mesurer LAN**

#### **3.3.1. Les unités de mesure de la lumière**

Quantifier LAN peut se faire en mesurant l'illuminance, la luminance, l'irradiance, ou la radiance (Figure 8). La première est très couramment utilisée et correspond à la « quantité totale de rayonnement électromagnétique tombant sur une surface » ( $\text{lx}$  ou  $\text{lumen/m}^2$ ) et la luminance à la « luminosité d'une zone dans le champ de vision » ( $\text{candela/m}^2$ ) (Hänel et al., 2018). Cependant, ces mesures se font en fonction de la sensibilité diurne de l'œil humain ce qui donne plus d'importance aux longueurs d'onde pour lesquelles l'œil humain est le plus sensible (Hänel et al., 2018; Rich and Longcore, 2006). Ainsi, mesurer la lumière en unités photométriques induit de ne pas mesurer chaque longueurs d'onde de manière égale et de ne pas prendre en compte celles qui se trouvent en dehors du spectre visible (UV, IR, ...), qui peuvent cependant être perçues par d'autres organismes (Bruce-White and Shardlow, 2011). Malgré cela, le  $\text{lx}$  est une unité encore largement utilisée notamment afin de faciliter la communication avec le grand public et les acteurs politiques ou économiques (Hölker et al., 2021). Pour être plus représentative de la lumière perçue par l'ensemble des organismes, la quantification de la lumière peut se faire par l'irradiance ( $\text{W/m}^2$ ) ou la radiance ( $\text{Watt/sr/m}^2$ ), qui correspondent respectivement à l'illuminance et à la luminance mais sans prendre en compte la sensibilité spectrale de l'œil humain, c'est-à-dire que les longueurs d'onde sont pondérées de manière égale (Hänel et al., 2018).



**Figure 8.** Mesure de l'illuminance, l'irradiance, la luminance et la radiance.

D'autres unités peuvent être utilisées pour quantifier la lumière, comme par exemple le micro-Einstein ( $\mu\text{E}$ ) correspondant au nombre de photons émis ou reçus par un corps, avec  $1 \mu\text{E}$  équivalant à 1 mole de photons, c'est-à-dire  $6.023 \cdot 10^{23}$  photons. Il y a également le PAR (*Photosynthetic Available Radiation*), exprimé en  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  qui quantifie les photons arrivant sur une surface pendant un temps donné dans le spectre du visible (Figure 8). Une autre unité est la magnitude par seconde d'arc au carré ( $\text{mag}/\text{arcsec}^2$ ) utilisée par les astronomes (Hänel et al., 2018).

Une autre caractéristique de la lumière est la température de couleur ou CCT (*correlated color temperature*, exprimée en Kelvin) qui traduit la combinaison de couleurs dans le spectre de la lumière et donc correspond à l'apparence de la lumière émise par un corps noir (Longcore and Rich, 2016). Plus la CCT est basse, plus la lumière contiendra des longueurs d'onde longues et inversement (Longcore and Rich, 2016).



### 3.3.2. Appareils de mesure de la lumière

Il existe une multitude d'appareils permettant de mesurer la luminosité ambiante qui se distinguent par différentes caractéristiques (Hänel et al., 2018) :

- La ou les unités de mesure proposées.
- L'information fournit sur la lumière détectée. Certains appareils en plus de l'intensité fournissent le spectre de la source lumineuse, sa CCT ou même une carte de la luminosité du ciel observé.
- La limite de détection, surtout pour les mesures de faibles intensités.
- Le prix, qui peut aller d'une centaine à plusieurs dizaines de milliers d'euros.
- La praticité de l'appareil en fonction de l'utilisation que l'on souhaite en faire. Par exemple certains appareils sont portables et également équipés pour réaliser des mesures sous-marines.

Il existe des appareils de mesure à une ou deux dimensions. Les appareils de mesure à une dimension mesurent la luminosité totale du ciel nocturne dans leur champ de vision qui peut aller de 20 à 120° (Hänel et al., 2018). Les données qui en sont issues sont utilisées pour suivre l'évolution de la luminosité du ciel dans différents environnements à travers le monde (*Sky Quality Meter*, *Dark Sky Meter*) avec des mesures qui peuvent se faire en continu (*lightmeter* à base de cellules solaires). La plupart de ces appareils mesurent la radiance, mais la luminance peut également être mesurée à l'aide de luxmètres (Hänel et al., 2018; Ochi and Wuchterl, 2014; Sánchez de Miguel et al., 2017). Ensuite, les appareils à deux dimensions permettent de cartographier et mesurer la luminosité du ciel en analysant des images en grand angle. Pour cela, ces appareils utilisent des capteurs photographiques CCD (*charge coupled device*) ou bien des capteurs CMOS d'appareil photographique reflex numérique (Hänel et al., 2018).

L'étendue et l'intensité de LAN peuvent également être mesurées par images satellites, permettant de détecter les sources de lumière nocturne sur une large partie du globe. Ces images sont recueillies notamment par les satellites DMSP équipés de capteurs OLS (DMSP-OLS, *Defense Meteorological Satellite Program Operational Linescan System*). Ces satellites ont été lancés dans les années 70 et conçus pour l'imagerie des nuages. Cette technologie a pu également être utilisée pour observer des sources d'éclairage nocturne (feu, éclairage artificiel, ...) et notamment des émissions de très faibles variances dans le visible et le proche infrarouge (Elvidge et al., 1997; Gaston et al., 2021). Etant donné la longue période d'activité de ces capteurs, il est également possible d'évaluer l'évolution d'un paysage lumineux à plus ou moins

grande échelle sur plus d'une décennie (Elvidge et al., 2014; Hu and Zhang, 2020). En 2011 le satellite VIIRS (*Visible/Infrared Imaging/Radiation Suite*), utilisant un capteur DNB (*Day Night Band*), a été lancé. Cette nouvelle technologie présente des avantages comparés au DMSP-OLS : un étalonnage embarqué ainsi qu'une meilleure résolution spatiale et radiométrique (Elvidge et al., 2013). Ainsi, les données fournies par VIIRS seront plus complètes que celles fournies par le DMSP-OLS. Cependant, VIIRS est déployé depuis peu et donc la quantité de données disponible est moindre, limitant les possibilités d'analyse comparé au DMSP-OLS (Li and Zhou, 2017). Malgré leur potentiel dans l'étude de LAN, les méthodes de détection spatiale ont des limites. En effet, la résolution spatiale est grossière, permettant de détecter des émissions provenant d'un ensemble de points lumineux plutôt qu'un seul. De plus, certaines émissions ne seront pas détectées comme les sources horizontales de LAN ou celles cachées par la végétation (Gaston et al., 2021). Un autre biais de cette méthode de détection est le fait que cette dernière se fait sur des images dépourvues de nuages qui sont pourtant susceptibles d'amplifier LAN (Secondi et al., 2019). Enfin, un désavantage majeur de ces méthodes est la gamme de longueurs d'onde détectée. Les capteurs (OLS ou DNB) embarqués sur les satellites ne perçoivent pas ou très peu les courtes longueurs d'onde qui sont néanmoins émises en grande quantité par les LEDs, de plus en plus présentes dans les domaines de l'éclairage public et domestique. En effet, beaucoup de grandes villes ont vu leur radiance diminuer en centre-ville par rapport à la périphérie ce qui peut être due au remplacement des anciens systèmes d'éclairage par les LEDs (Kyba et al., 2017a).

## **4. LAN : une menace pour les écosystèmes marins**

### **4.1. LAN : une menace écologique**

Lorsque l'on parle de pollution lumineuse nocturne, il faut en distinguer deux sortes : la « pollution lumineuse astronomique », perturbant la vision du ciel nocturne, et la « pollution lumineuse écologique » qui altère le cycle jour / nuit (Longcore and Rich, 2004). A la fin des années 50, les astronomes ont été les premiers à dénoncer les effets néfastes de LAN qui perturbait leurs observations (Riegel, 1973; Smith, 2009). Depuis les années 30, ils essayent d'éviter au maximum ce type de pollution en choisissant des sites reculés pour leurs observations (Luginbuhl et al., 2009). Ces 20 dernières années, l'étude des effets de LAN sur la santé et l'environnement a augmenté, désignant ce phénomène comme une menace envers la santé humaine et la biodiversité (Davies and Smyth, 2018; Gaston and Sánchez de Miguel,

2022). LAN modifie les niveaux d'éclairage nocturne et peut altérer la perception de l'alternance jour / nuit par les organismes ainsi que la perception de la variation de l'intensité de la lune et de la photopériode au fil des jours de l'année. Ainsi, LAN a le potentiel de perturber la synchronisation des organismes avec les rythmes journaliers, lunaires ou encore annuels, ce qui peut avoir de lourdes conséquences sur leur physiologie et leur fitness (Gaston et al., 2017). Il a été montré que LAN peut perturber divers processus chez les organismes, qu'ils soient diurnes ou nocturnes, et ce même à de faibles intensités (en dessous de 1 lx) (Gaston et al., 2013; Sanders et al., 2021). Ces effets touchent le sommeil, le système hormonal, l'orientation, la migration, la communication ou encore le comportement avec des impacts dépendant de l'espèce mais aussi du sexe (Bauer et al., 2022; Brayley et al., 2022; Sanders et al., 2021; Svechkina et al., 2020).

Chez l'Homme et plus largement chez les mammifères, LAN serait impliqué dans le développement de multiples maladies telles que l'obésité, la dépression ou le cancer (Lamphar et al., 2022; Min and Min, 2018; Muscogiuri et al., 2022; Svechkina et al., 2020; Zubidat and Haim, 2017). Les oiseaux sont également des organismes très étudiés dans le cadre de LAN qui impacte leur migration (Burt et al., 2023) mais aussi leurs rythmes comportementaux journaliers ou saisonniers (Da Silva et al., 2015; Jiang et al., 2020). Plusieurs études ont également mis en évidence la menace que LAN représente pour les insectes, notamment en les attirant (phototactisme positif), les désorientant ou encore en augmentant la prédation (Bruce-White and Shardlow, 2011; Owens et al., 2020). La plupart des études s'intéressant aux effets biologiques et écologiques de LAN se concentrent sur les organismes terrestres. Relativement peu de travaux s'intéressent à son impact sur les organismes aquatiques et notamment marins, malgré la forte présence de LAN dans ces écosystèmes (Smyth et al., 2021).

#### **4.2. Présence de LAN dans le milieu marin**

Dans le milieu marin, les sources de LAN sont nombreuses (Figure 9). Au niveau des côtes, les émissions de LAN proviennent notamment des villes qui y sont très peuplées ou bien de leur port. Plus au large LAN est émise par des plateformes offshore pour la production de pétrole et de gaz (Davies et al., 2014; Gaston, 2018). Dans ces environnements, certaines sources de LAN peuvent toucher à la fois les zones côtières et celles plus au large, c'est le cas par exemple les bateaux de pêche ou de croisière (Longcore and Rich, 2016). Que ce soit au niveau des côtes ou plus au large, ces sources de LAN sont vouées à augmenter notamment dû à l'augmentation

de la population humaine sur le littoral, à l'augmentation de la production d'énergie éolienne en mer ou encore au fait que l'approvisionnement en pétrole et en gaz dépend de plus en plus de l'extraction offshore (Davies et al., 2016; Kummu et al., 2016).



**Figure 9.** Représentation de plusieurs sources de LAN dans l'environnement marin.

Dans l'environnement marin, LAN peut pénétrer à des profondeurs plus ou moins importantes (> 40 m, voir jusqu'à 1000 m dans l'eau claire ; Figure 3) en fonction de divers paramètres (Grubisic et al., 2019; Smyth et al., 2021). L'étendue spatio-temporelle, le spectre et l'intensité de la lumière artificielle ou naturelle qui pénètre dans l'eau dépendent des propriétés de celle-ci, des facteurs météorologiques, géologiques et géographiques (Tidau et al., 2021). Dans les océans, la lumière bleue est celle qui pénètre plus facilement et plus profondément alors que la lumière rouge est atténuée plus rapidement (Davies et al., 2014). Au niveau des côtes, la pénétration des longueurs d'onde est différente en fonction des marées et de la présence de différents composants de l'eau qui absorbent ou diffusent la lumière, changeant les coefficients d'atténuation (Grubisic et al., 2019; Smyth et al., 2022). Ainsi la gamme de longueurs d'onde pénétrantes peut aller du bleu au jaune et est donc plus large au niveau des côtes que dans les océans (Falcon et al., 2020). Smyth et al. (2021) ont produit un atlas de LAN au niveau marin

révélant qu'à 1 m de profondeur 1.9 million de km<sup>2</sup> des côtes mondiales sont exposées à LAN à une intensité biologiquement importante. Cette intensité biologiquement importante correspond à une intensité lumineuse suffisante pour provoquer des réponses chez les organismes marins : 0.1  $\mu\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$  (irradiance minimale de lumière blanche capable d'entraîner une migration verticale journalière des copépodes adultes *Calanus*) (Båtnes et al., 2015). Puis, à 10 m de profondeur, 1.6 million de km<sup>2</sup> des côtes mondiales sont exposées à LAN, surface qui diminue à 840 000 km<sup>2</sup> à 20 m de profondeur (Smyth et al., 2021). Cet atlas désigne le golfe Persique, l'est de la Méditerranée et la mer du Nord comme les zones marines les plus touchées par LAN.

### 4.3. Impacts chez les organismes marins

Comme dit précédemment, les impacts de LAN ont d'abord été évalués chez les organismes terrestres, laissant les organismes marins et plus particulièrement les organismes côtiers de côté, malgré la forte présence de LAN dans ces environnements (Davies et al., 2014; Smyth et al., 2021). Cependant, ce champ d'étude s'est grandement enrichi ces 5 dernières années, mettant en évidence un large panel d'effets néfastes de LAN sur ces écosystèmes, allant de l'individu aux communautés (Hussein et al., 2021; Marangoni et al., 2022; Zapata et al., 2018).

Tout d'abord, LAN peut impacter le comportement par exemple en amenant les organismes diurnes ou crépusculaires à prolonger leur activité, et les organismes nocturnes à la raccourcir (Longcore and Rich, 2004). C'est le cas de l'isopode nocturne *Tylos spinulosus* dont l'activité locomotrice nocturne est réduite en présence de LAN, conduisant à un rythme circadien perturbé et même perdu après quelques jours d'exposition (Duarte et al., 2019). De plus, chez l'amphipode nocturne *Orchestoidea tuberculata*, LAN entraîne une diminution de l'activité locomotrice (Luarte et al., 2016). Les espèces diurnes sont elles aussi affectées par LAN, comme le poisson intertidal *Girella laevifrons* dont la fréquence des mouvements entre son refuge et les zones éclairées n'augmente pas seulement la nuit, mais tout au long de la journée. Au sein de cette augmentation globale d'activité, ce poisson perd son pic d'activité caractérisant son rythme circadien (Pulgar et al., 2019). Des changements de comportement peuvent également être observés au stade larvaire. C'est le cas du poisson *Acanthurus triostegus*, dont les larves cherchent à éviter les habitats éclairées par LAN mais lorsqu'elles y sont exposées leur comportement de nage est modifié et leur taux de survie diminué, compromettant donc la fitness de cette espèce (O'Connor et al., 2019).

La croissance, un important processus physiologique, peut également être fortement perturbée par LAN chez divers organismes marins. Celle-ci peut être diminuée comme par exemple chez l'amphipode *O. tuberculata*, mais aussi augmentée comme chez les coraux *Acropora eurystoma* et *Stylophora pistillata* ou chez les larves du poisson *A. triostegus* (Luarte et al., 2016; O'Connor et al., 2019; Tamir et al., 2020). LAN affecte également le développement de plusieurs espèces de balanes (*Semibalanus balanoides*, *Notochthamalus scabrosus* et *Jehlius cirratus*) et plus particulièrement leur stade de naissains, dont LAN diminue la présence sur un substrat donné (Lynn et al., 2021; Manriquez et al., 2021).

La lumière naturelle peut avoir différentes utilités pour les organismes et notamment celle de pouvoir s'orienter. Chez les espèces nocturnes, l'orientation se fait à l'aide de très faibles luminosités, comme par exemple pour le coléoptère *Scarabaeus satyrus* qui utilise le ciel étoilé (0.001 lx) (Dacke et al., 2013). Ces très faibles luminosités sont également utilisées par les tortues de mer après éclosion de leur œuf afin de s'orienter vers le milieu marin (Salmon, 2006). Cependant, en présence de LAN, la source lumineuse la plus intense ne va plus forcément être l'horizon, notamment lorsque la luminosité de la lune est faible, entraînant une attraction des tortues vers les sources directes de LAN ou le *skyglow* (Rivas et al., 2015; Salmon, 2006; Witherington and Bjorndal, 1991). Cette mauvaise orientation augmente le temps que les tortues mettent à rejoindre le milieu marin et donc favorise les risques de déshydratation et de prédation (Salmon et al., 1995; Thums et al., 2016). Au contraire, certains organismes peuvent être repoussés par LAN. C'est le cas du zooplancton qui effectue une migration verticale quotidienne pendant la nuit polaire (Last et al., 2016). Cependant, lorsqu'une source de lumière artificielle est présente, la majeure partie du zooplancton évite cette lumière en se décalant latéralement ou vers le bas (Ludvigsen et al., 2018). Un autre exemple est celui de l'amphipode *Talitrus saltator* qui, guidé par la luminosité nocturne, entreprend des migrations de la rive supérieure à la mer pour se nourrir d'algues côtières, puis fait le trajet inverse afin de se protéger de la prédation, de la dessiccation ou encore de l'immersion. Cependant, en présence de LAN, l'orientation de cet amphipode est perturbée et il peut même prendre des directions opposées au milieu marin (Torres et al., 2020).

Les processus de reproduction, souvent synchronisés avec des cycles environnementaux (lunaire, saisonnier), peuvent être affectés par LAN. Par exemple, Fobert et al. (2019) ont montré que LAN inhibe totalement l'éclosion des œufs du poisson des récifs coralliens *Amphiprion ocellaris* certainement en masquant le signal environnemental déclenchant l'éclosion qui a lieu après le crépuscule chez cette espèce. Un autre exemple très étudié dans

l'environnement marin est celui des coraux, dont la libération des gamètes dans l'eau est synchronisée par le cycle lunaire, un phénomène essentiel afin de maximiser le succès reproductif (Kaniewska et al., 2015; Tessmar-Raible et al., 2011). Cependant, chez *Acropora millepora* et *Acropora digitifera*, l'exposition à LAN retarde, voire masque, la gamétogénèse, entraînant une désynchronisation du relargage des gamètes, ce qui peut être dû au fait que LAN masque la faible intensité lumineuse de la lune et donc du cycle lunaire (Ayalon et al., 2021). De façon plus large, Davies et al. (2023) ont mis en relation le "Global atlas of artificial light at night under the sea" et la "Coral Spawning Database" afin d'évaluer si l'émission des gamètes des coraux de plusieurs genres (*Montipora* spp., *Favites* spp., *Acropora* spp., *Dipsastraea* spp., *Goniastrea* spp., *Galaxea* spp., *Acanthastrea* spp., *Platygyra* spp., *Cyphastrea* spp., *Echinophyllia* spp., *Porites* spp., *Leptoria* spp) est perturbée dans les eaux exposées à LAN. Ils ont mis en évidence que la présence de LAN décalait la ponte d'une ou plusieurs nuits chez 10 des 12 genres étudiés (Davies et al., 2023).

Enfin, LAN peut impacter les communautés écologiques et notamment les interactions entre espèces telles que les interactions proie/prédateur (Sanders and Gaston, 2018). Par exemple, LAN peut élargir le temps de chasse de prédateurs diurnes ou crépusculaires, ce qui peut intensifier la pression de prédation sur certaines proies et impacter leurs populations (Davies et al., 2014). Par exemple, chez le gastéropode *Nucella lapillus*, la présence de LAN favorise la recherche de sa proie *Semibalanus balanoides* (Tidau et al., 2022; Underwood et al., 2017). Chez le crabe *Neohelice granulata* LAN va jusqu'à favoriser les interactions cannibales des adultes envers les juvéniles, résultant en une forte mortalité des juvéniles (Nunez et al., 2021). Bolton et al. (2017) ont également mis en évidence que les assemblages d'invertébrés sessiles subissaient une pression de prédation par des poissons plus importante lors de nuit éclairées. LAN peut également impacter les interactions entre la faune et la flore. En effet, la présence de LAN sur un milieu côtier rocheux dominé par des biofilms bactériens entraîne une diminution de la densité de gastéropodes brouteurs, qui pourrait être dû à l'augmentation de la prédation ou une fuite. Ainsi, l'activité de broutage s'en trouve diminuée, favorisant la croissance de cyanobactéries et le changement de la composition des assemblages microbiens (Maggi et al., 2019). L'effet de LAN sur la composition de communautés côtières a été démontré plus d'une fois. Orlando et al. (2020) ont mis en évidence que le long de l'estuaire Rio de la Plata, la macrofaune était moins riche dans les zones les plus urbanisées, dû à l'importante densité humaine mais aussi à l'augmentation de l'intensité lumineuse nocturne. Ce phénomène a également été observé au Royaume-Uni sur la plage Llandudno West Shore où LAN impacte

la composition des communautés, la richesse des espèces et la biomasse de macroinvertébrés (Garratt et al., 2019). La perturbation de la composition des communautés marines épifaunales par LAN peut être dû au fait que cette pression anthropique affecte les processus de colonisation ainsi que le recrutement d'invertébrés marins sessiles (Davies et al., 2015).

#### **4.4. Stratégies d'atténuation des effets de LAN**

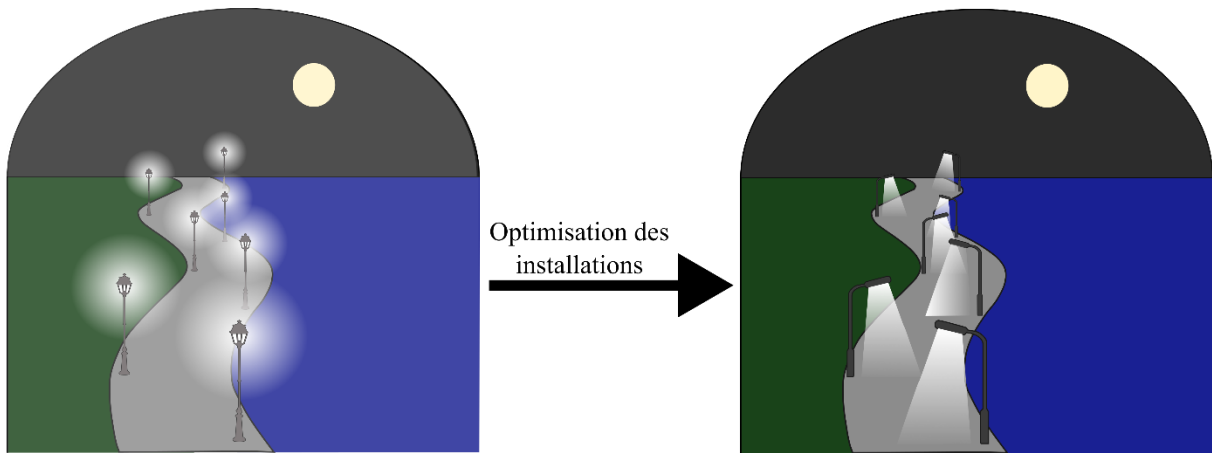
Afin de limiter les effets néfastes de LAN et les coûts engendrés par l'utilisation d'éclairages artificiels, des stratégies sont proposées et mises en place pour diminuer sa présence temporellement et spatialement.

La première de ces stratégies consiste à préserver les zones qui sont aujourd'hui encore non éclairées, ou bien même d'en créer de nouvelles (Gaston et al., 2012; Gaston and Sánchez de Miguel, 2022). Certaines zones deviennent alors et sont devenues des zones protégées en termes de qualité du ciel nocturne. Ainsi, aujourd'hui, plus de 200 sites sont certifiés « réserve de ciel étoilé » ou « *Dark Sky Places* » en anglais par l'association *International DarkSky* puisqu'ils possèdent un ciel nocturne de qualité : la lumière artificielle ne dépasse pas la luminosité naturelle du ciel lorsque celui-ci est clair (<https://darksky.org/what-we-do/international-dark-sky-places/>; Kolláth, 2010). Le ciel nocturne est aujourd'hui protégé et préservé de LAN sur plus de 160 000 km<sup>2</sup> (<https://darksky.org/what-we-do/international-dark-sky-places/>). En 2009, les deux premiers sites d'Europe à être désignés comme « *Dark-sky Places* » sont la Zone de Protection du Paysage du Zselic en Hongrie ainsi que le *Galloway Forest Park* en Ecosse (Kolláth, 2010).

Atténuer la présence de LAN dans le paysage nocturne passe aussi par l'optimisation des systèmes d'éclairage déjà en place (Figure 10). Certains systèmes sont mal conçus, mal installés ou encore mal entretenus et peuvent alors émettre une partie de leur lumière dans de mauvaises directions, comme par exemple vers le haut ou horizontalement, entraînant une augmentation de la surface illuminée et du *skyglow* (Gaston et al., 2012). Pour éviter cela, il faut adapter le design des sources lumineuses pour que peu ou pas de lumière soit émise au-dessus du plan horizontal et que moins de 10% de la lumière soit émise dans les 10 degrés en dessous du plan horizontal (Longcore and Rich, 2016). Les émissions non voulues de lumière peuvent également être limitées en remplaçant les surfaces réfléchissantes par des surfaces absorbantes afin d'éviter que la lumière soit réfléchi par le sol (Gaston et al., 2012; Longcore and Rich,

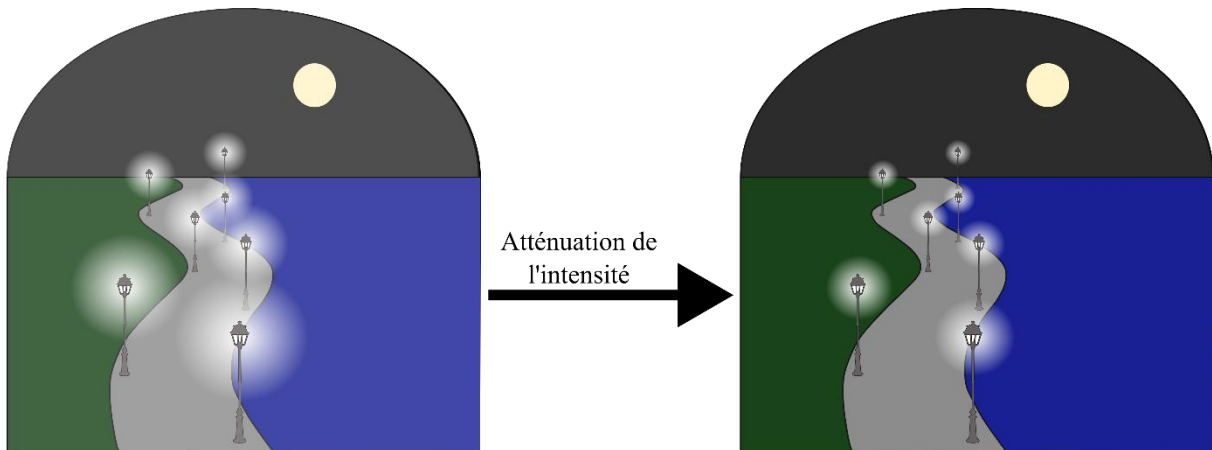


2016). Il est également possible de construire des barrières à la diffusion de lumière, à l'aide de murs ou de la végétation (Gaston et al., 2012).



**Figure 10.** Stratégie d'atténuation de LAN qui consiste à optimiser les systèmes d'éclairage.

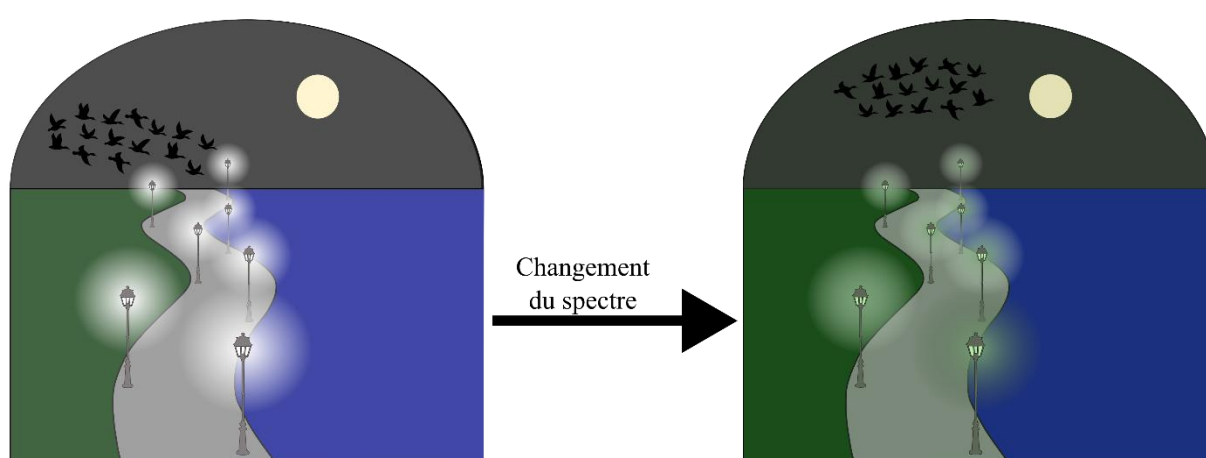
Une troisième stratégie d'atténuation vise à diminuer l'intensité lumineuse des sources de lumière artificielle nocturne (Figure 11), stratégie qui est grandement facilitée par l'utilisation de LEDs dont l'intensité est facilement atténuable (Gaston et al., 2012). Cette diminution d'intensité lumineuse permet d'une part de limiter les zones impactées par les sources directes de LAN mais également de limiter leur participation au *skyglow* (Gaston et al., 2012).



**Figure 11.** Stratégie d'atténuation de LAN qui consiste à diminuer l'intensité lumineuse.

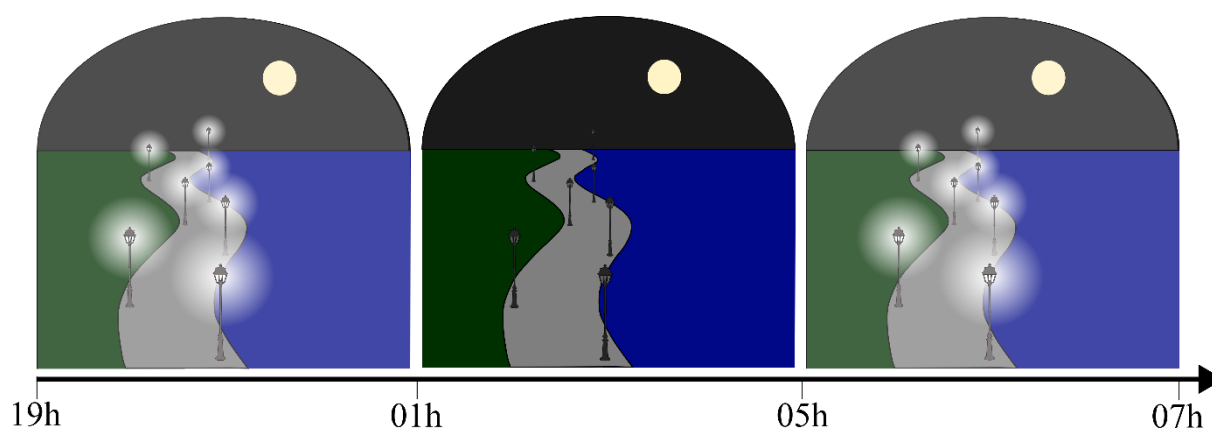
Les LEDs présentent également un autre avantage, celui d'avoir un spectre facilement modifiable (Davies and Smyth, 2018; Gaston et al., 2012). Afin de limiter les effets de LAN, il est suggéré de choisir des spectres étroits et spécifiques dont les conséquences sur les organismes d'un environnement donné sont les moins néfastes (Davies et al., 2016; Longcore et al., 2018). Par exemple, l'utilisation de lumière verte plutôt que blanche pourrait limiter

l'attraction et la désorientation que LAN provoque chez les oiseaux migrateurs (Figure 12) (Poot et al., 2008). Cependant, les organismes d'un même environnement ont des sensibilités spectrales très diverses qui ne sont pas forcément connues. Or, le choix des longueurs d'onde participant au spectre de LAN se basera sur les données que l'on dispose et donc sur les organismes les plus étudiés, en oubliant ceux dont on ne connaît pas la sensibilité spectrale, ce qui peut avoir d'importantes conséquences écologiques (Alaasam et al., 2021). En règle générale, il est préférable d'éviter les courtes longueurs d'onde car elles sont impliquées dans beaucoup de processus biologiques (profil d'activité journalière, orientation, reproduction) et sont celles qui pénètrent le mieux dans l'eau (Falcon et al., 2020).



**Figure 12.** Stratégie d'atténuation de LAN qui consiste à réduire le spectre lumineux : chez les oiseaux migrateurs, la lumière verte limite l'attraction et la désorientation (Poot et al., 2008).

Une autre stratégie envisagée est celle de limiter les durées d'éclairage comme par exemple l'éteindre pendant une partie de la nuit (Gaston et al., 2012; Longcore and Rich, 2016). Cette stratégie est appelée « éclairage nocturne partiel » ou « *part-night lighting* » (PNL) en anglais (Figure 13). Dans cette même optique, il a également été proposé de coupler aux éclairages nocturne un détecteur de mouvement pour que la lumière, qui peut être éteinte ou simplement atténuée, ne se déclenche qu'en cas d'activité proche (Kyba et al., 2014; Longcore and Rich, 2016; Zielinska-Dabkowska, 2018). Cependant, en provoquant des changements d'intensité lumineuse brusques ce système pourrait être encore plus néfaste pour les organismes nocturnes qu'une intensité lumineuse constante pendant toute la nuit (Longcore and Rich, 2016).



**Figure 13.** Stratégie d’atténuation de LAN qui consiste à couper l’éclairage nocturne pendant une partie de la nuit.

Afin qu’elles soient les plus efficaces possible, ces stratégies ne doivent pas être mises en place individuellement mais il convient de les combiner pour limiter au mieux l’impact négatif de la lumière artificielle sur l’environnement (Longcore and Rich, 2016).

## 5. L’huitre *Crassostrea gigas*

### 5.1. Ecologie et aquaculture

L’huitre creuse du Pacifique *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) est un mollusque bivalve estuarien et sessile de la famille des *Ostreidae*. Elle trouve son origine au Japon et s’est rependue sur la côte ouest des Etats-Unis à partir des années 20, en Europe dans les années 60 et plus particulièrement en France en 1966 (FAO, 2016). Ainsi, cette espèce est présente dans de multiples régions du monde, ce qui en fait l’un des invertébrés marins les plus cosmopolites (Miossec et al., 2009; Ruesink et al., 2005). La distribution mondiale de *C. gigas* peut être due à des introductions accidentelles de cette espèce dans différentes régions du monde mais surtout une cause économique. En effet, ce bivalve a été massivement introduit dans diverses régions du monde notamment dans le but d’y remplacer les huitres natives qui ont vu leur population réduire fortement dû à la surpêche ou aux maladies (FAO, 2016). La démocratisation de cette espèce dans le cadre de l’ostréiculture est motivée par sa croissance rapide et sa tolérance à une large gamme de conditions environnementales, ce qui lui a permis de massivement et rapidement se répandre, lui valant aujourd’hui le qualificatif d’espèce invasive (FAO, 2016; Troost, 2010). La production de *C. gigas* est aujourd’hui mondiale et représente une économie importante avec le plus gros producteur étant la Chine (12.4 millions de tonnes

en 2015), puis l'Europe (0.6 millions de tonnes) et enfin l'Amérique (0.46 millions de tonnes) (van der Schatte Olivier et al., 2018).

## 5.2. Physiologie de l'huitre

L'huitre possède une coquille renfermant et protégeant son corps mou. Les deux valves formant cette coquille, composée principalement de conchyoline et de calcite, sont reliées par un ligament servant de charnière. Cette coquille est formée en continue pendant toute la durée de vie de *C. gigas* par le manteau via un processus de biominéralisation. Les dimensions de cette coquille varient en fonction des conditions environnementales (Marin et al., 2012; Marteil, 1976).

Au sein du corps mou de l'huitre on retrouve divers organes. Tout d'abord, à l'interface entre la coquille et les organes de l'huitre on trouve le manteau, composé de muscles et de nerfs avec notamment une fonction de biominéralisation permettant la croissance coquillière par ajout de couche interne à la coquille (Marin et al., 2012; Marteil, 1976). Le muscle adducteur, comme le manteau, fait le lien entre le corps mou de l'huitre et sa coquille et relie également les deux valves entre elles. La principale fonction de ce muscle est de permettre la fermeture de l'huitre en se contractant. Il se divise en deux parties : le muscle lisse, pour une fermeture prolongée, et le muscle strié, pour une fermeture brève et rapide (Marteil, 1976).

Les branchies constituent l'appareil respiratoire des huitres et permettent l'apport en nourriture. Chaque individu possède deux branchies composées chacune de deux lamelles comportant un feuillet interne et un feuillet externe. Ces feuillets possèdent des filaments sur lesquels sont disposés des cils créant un courant dans la cavité palléale permettant l'apport d'oxygène et de nourriture. Les particules alimentaires sont ensuite sélectionnées par leur taille. Celles ayant une taille adéquate sont retenues, enrobées de mucus et entraînées vers la bouche de l'huitre à l'aide de cils. Les autres particules ayant une taille trop importante sont alors rejetées sous forme de pseudo fèces (Marteil, 1976). Le système digestif de l'huitre débute par une bouche accompagnée de quatre palpes labiaux. Les particules absorbées traversent alors un œsophage débouchant sur l'estomac au sein duquel elles sont digérées par une action mécanique et enzymatique, toutes deux effectuées par le stylet cristallin. Cette structure se dissout afin de libérer les enzymes digestives à l'arrivée du bol alimentaire et se reconstitue après la digestion. Le système digestif se continue par l'intestin et l'anus situé près du muscle adducteur. Le trajet

des particules dans l'ensemble du système branchial est assuré par les mouvements de cils (Marteil, 1976; Morton, 1977).

L'appareil circulatoire de l'huitre est système semi-ouvert se constituant d'un cœur associé à un ensemble de lacunes veineuses et d'artères. Le cœur, constitué d'un ventricule et de deux oreillettes, se trouve dans la cavité péricardique accolé au muscle adducteur. L'hémolymphe, un liquide incolore est l'équivalent du sang chez l'huitre. Elle est oxygénée au niveau des branchies puis elle arrive jusqu'au cœur afin d'être répartie dans le corps de l'huitre à l'aide d'artères et artérioles la menant jusqu'à des lacunes au sein des tissus (Marteil, 1976).

Le système nerveux de l'huitre est peu développé. A la base des palpes labiaux se trouvent des cellules nerveuses formant le ganglion cérébro-pleural à partir duquel se fait l'innervation de la bouche, du manteau et de la partie antérieure du corps. Un second ganglion, le ganglion viscéral se trouve sous le muscle adducteur permettant son innervation ainsi que celle de la partie postérieure du corps de l'huitre (Marteil, 1976).

La gonade est un organe permettant le développement des gamètes. Les huitres sont des organismes hermaphrodites protandres, c'est-à-dire que la première maturation se fait souvent en tant que mâle, puis les changements de sexe alternent (Guo et al., 1998; Marteil, 1976). En hiver, la gamétogénèse s'initie lentement, tandis qu'au printemps elle est plus active. La maturité des gonades est atteinte en été, saison lors de laquelle a lieu la ponte, c'est-à-dire l'expulsion des gamètes. Cette ponte est synchronisée entre les individus afin d'augmenter les chances de rencontre entre les gamètes mâles et femelles dans la colonne d'eau. Cette synchronisation dépend notamment des cycles journaliers, lunaires et saisonniers mais aussi de la température et de la salinité. Puis, la fin de l'automne correspond à la période de résorption des gonades (Bernard et al., 2016; Fabioux et al., 2005; FAO, 2016; Marteil, 1976; Payton et al., 2017a). Une fois la fécondation externe réalisée s'en suit un stade larvaire pélagique d'environ 3 semaines. La première forme larvaire est une larve trochophore caractérisée par la présence de cils permettant de se mouvoir. Elle est suivie par la larve véligère puis la larve pedivéligère qui se caractérise par la présence d'un pied contractile. Ce stade larvaire se termine par la fixation de la larve sur un substrat solide à l'aide d'une sécrétion émise par une glande de leur pied. Ensuite la larve subit une métamorphose en naissain, caractérisée notamment par la disparition du pied et le développement de branchies. Le naissain va ensuite sécréter sa coquille qui va s'accrocher au support et se développer (FAO, 2016; Marteil, 1976; Troost, 2010).

### **5.3. Rythmes biologiques de l’huitre**

#### **5.3.1. La perception de la lumière**

L’huitre *C. gigas* est un bivalve ne possédant pas d’yeux mais pouvant tout de même capter la lumière et ses variations (intensité lumineuse, photopériode), permettant aux huitres de synchroniser leur horloge interne avec les cycles lumineux environnementaux (Mat et al., 2012; Payton et al., 2017a; Payton and Tran, 2019). Les huitres ne sont pas les seuls organismes sans structure visuelle à percevoir les signaux lumineux. Les coraux par exemple sont également capables de détecter des intensités lumineuses notamment très faibles comme celles de la lune (Kaniewska et al., 2015). Percevoir les signaux lumineux et leur variation sans structure visuelle est possible à l’aide de photorécepteurs non visuels dont certains gènes ont été identifiés chez l’huitre. Un gène de récepteur non visuel est celui du cryptochrome 1 (*Cgcry1*), une molécule qualifiée de photorécepteur circadien car directement impliquée dans le mécanisme horloger de l’huitre (Mat et al., 2016; Perrigault and Tran, 2017). Ces photorécepteurs appartiennent à la famille des Cryptochrome/Photolyase regroupant deux grands types de molécules (Oliveri et al., 2014). Les premières sont les photolyases, des enzymes impliquées dans la réparation des dégâts à l’ADN dû aux UV. Les secondes sont les cryptochromes, des molécules permettant de percevoir la lumière et souvent impliquées dans l’entraînement du rythme circadien mais ayant perdu leur fonction de réparation de l’ADN (Chaves et al., 2011). Les cryptochromes sont connus pour être des récepteurs au bleu et aux UV, même si chez l’huitre la sensibilité spectrale du cryptochrome 1 n’est pas établie (Chaves et al., 2011; Lin and Todo, 2005). Un autre type de récepteurs non visuels découverts chez l’huitre sont les rhodopsines, des photopigments appartenant à la famille des opsines, des récepteurs couplés aux protéines G (Cronin and Johnsen, 2016; Koyanagi and Terakita, 2014; Wu et al., 2018). L’implication des rhodopsines dans l’entraînement de l’horloge moléculaire n’a pas été mise en évidence chez l’huitre mais pourrait y jouer un rôle. Par exemple, chez *Drosophila melanogaster*, il a été montré que les rhodopsines, avec les cryptochromes, semblaient intervenir dans l’entraînement de son horloge interne (Senthilan et al., 2019).

#### **5.3.2. Rythmes biologiques comportementaux**

Les rythmes biologiques de *C. gigas* ont été mis en évidence en étudiant son comportement valvaire. Tout d’abord, un rythme comportemental journalier sous contrôle de l’horloge circadienne a été observé chez *C. gigas* au laboratoire et sur le terrain. Au laboratoire, lorsque

les huitres sont soumises à une alternance jour / nuit sans influence d'une composante tidale, leur comportement valvaire est rythmique avec une période de 24 h (Mat et al., 2012). Ensuite, lorsque les huitres sont placées en condition de *free-running* (soit dans l'obscurité constante soit sous un éclairage constant), la plupart des individus conservent un comportement rythmique avec une période circadienne (20 – 28 h), révélant ainsi que le rythme comportemental circadien de *C. gigas* est endogène (Mat et al., 2012) car exprimé sans stimuli externes. Ce rythme circadien peut aussi être qualifié de faible (c.-à-d. avec peu d'inertie) étant donné que lorsque la photopériode est décalée de plus ou moins 4 h, le rythme se resynchronise très rapidement avec le nouveau cycle lumineux (Mat et al., 2012). Cette faiblesse pourrait conférer aux huitres une grande plasticité et donc une forte capacité d'adaptation à des environnements divers, expliquant partiellement le succès de sa colonisation de multiples régions du monde (Mat et al., 2012). Sur le terrain, le rythme valvaire d'huitres toujours immergées est principalement déterminé par les composantes tidales (période d'environ 12.4 h) avec des huitres fermées à marée basse. Cependant, un rythme valvaire journalier sous-jacent est présent : lorsque les huitres sont soumises aux cycles des marées, celui de la lumière devient un facteur mineur influençant le comportement des huitres (Payton et al., 2017a; Tran et al., 2011; Tran et al., 2020a).

Le rythme tidal de *C. gigas* est caractérisé par une période de 12.4 h qui est entraîné par des cycles lunaires (cycles du jour lunaire de 24.8 h, qui correspond à deux cycles tidaux) sur le terrain. L'amplitude de la marée (liée au mois synodique lunaire de 29.5 jours) détermine si l'entraînement du comportement valvaire par la composante tidale sera plus ou moins fort. Cette amplitude est modulée par les cycles semi-lunaires (variation de l'intensité des marées sur 14.7 jours environ) et le cycle anomalistique (variation de la distance entre la Terre et la lune sur 27.5 jours) (Payton et al., 2017a; Tran et al., 2011). Ce rythme tidal peut également être observé en laboratoire en simulant le cycle de la vitesse du courant des marées (Mat et al., 2014).

Le comportement de *C. gigas* varie également en fonction du cycle lumineux lunaire, indiquant que les huitres sont capables d'une part de détecter de très faibles intensités lumineuses comme celles de la lune et d'autre part de percevoir leurs variations au cours du cycle lunaire de 29.5 jours (Payton et al., 2017a; Payton and Tran, 2019).

Enfin, les huitres expriment également un rythme annuel. En effet, la photopériode et plus particulièrement sa variation au fil des jours, des mois et des saisons influence le comportement valvaire. L'amplitude et la durée d'ouverture des valves sont plus importantes au printemps et

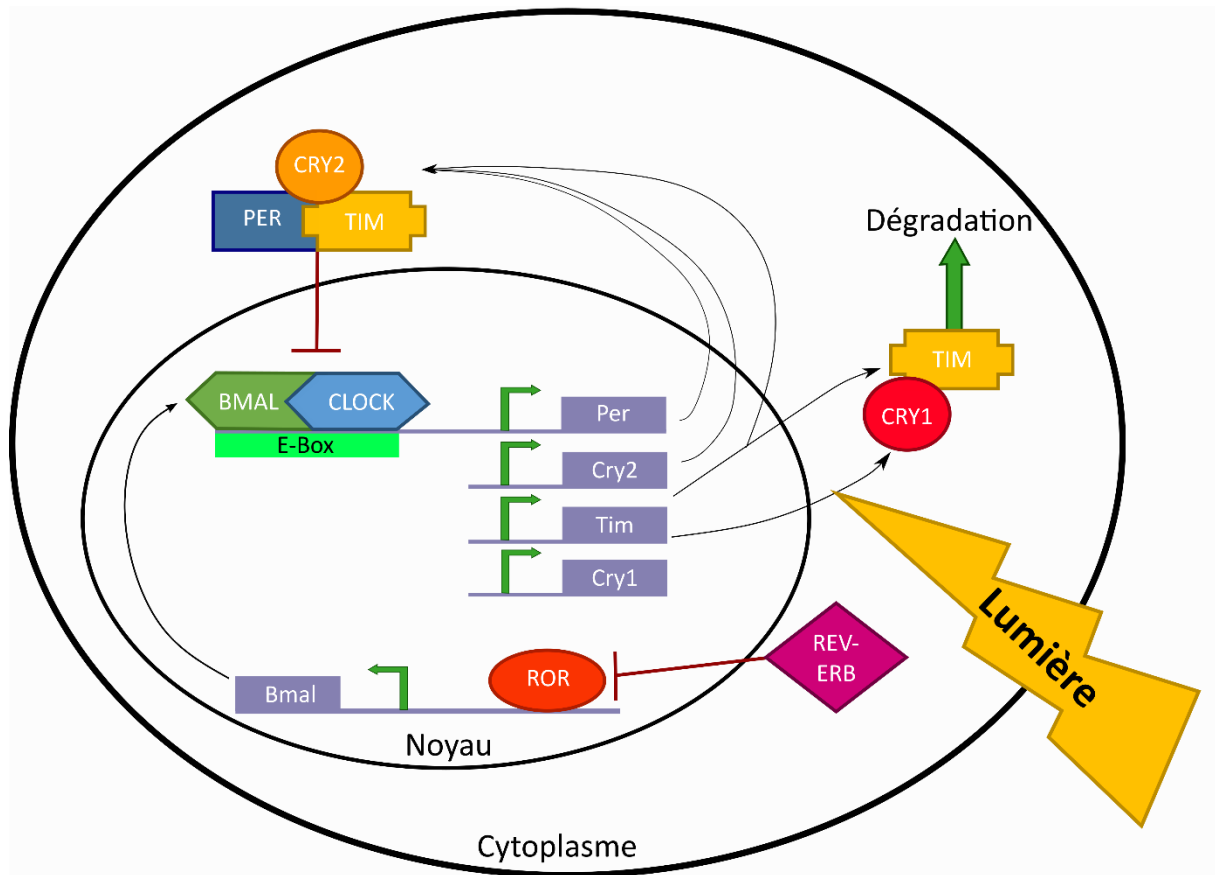
minimum en automne, ce qui peut s'expliquer par des besoins métaboliques et donc nutritionnels plus importants au printemps dû notamment à la gamétogénèse et la croissance (Payton et al., 2017a). Les huîtres présentent également un comportement journalier différent en fonction de la période de l'année : celui-ci est nocturne en automne et en hiver, tandis qu'il est diurne en été et au printemps (Mat et al., 2012; Perrigault and Tran, 2017). Ce changement de comportement se produit aux équinoxes et permettrait une adéquation entre la demande métabolique et la disponibilité en nourriture. Au printemps et en été, le comportement diurne des huîtres induit qu'elles vont se nourrir pendant la période de jour, pendant laquelle le phytoplancton est le plus abondant, permettant alors de couvrir ses importants besoins énergétiques. En revanche, en hiver le phytoplancton se faisant plus rare et la durée de la période de jour étant courte, il est plus judicieux d'adopter un comportement nocturne (Enríquez-Díaz et al., 2008; Mat et al., 2012; Payton et al., 2017a).

### 5.3.3. Horloge moléculaire circadienne

Différents gènes de l'horloge circadienne cyclique de l'huître ont été identifiés : *CgClock*, *CgBmall*, *CgCry1*, *CgCry2*, *CgPeriod*, *CgTimeless*, *CgRev-erb*, *CgRor*. Un modèle du fonctionnement de cette horloge a été proposé en se basant sur les analyses phylogénétiques et celles de l'expression temporelle des gènes de l'horloge en présence d'un cycle journalier lumineux ou en conditions de *free-running* (Figure 14). Ainsi, le mécanisme de l'horloge interne de l'huître serait globalement proche de celui du papillon *Danaus plexippus* (Perrigault and Tran, 2017; Zhu et al., 2008). Le fonctionnement de l'horloge de l'huître est basé sur une boucle de rétrocontrôle négatif et une boucle stabilisatrice décrit par Perrigault and Tran (2017). La première est composée des facteurs de transcription CLOCK et BMAL1 qui sont les éléments positifs de cette boucle de transcription formant un hétérodimère. Ce dernier active la transcription des gènes *cryptochrome 1* (*CgCry1*), *cryptochrome 2* (*CgCry2*), *period* (*CgPer*) et *timeless* (*CgTim*) en se liant à des E-box sur leur promoteur. Les protéines PER, TIM et CRY2 qui en découlent forment un trimère réprimant alors l'action de CLOCK/BMAL1 et donc leur propre expression. Au sein de ce mécanisme, la lumière joue un rôle important : elle est captée par CRY1, un photorécepteur circadien, qui interagit avec TIM et induit sa dégradation, empêchant la formation du trimère PER/TIM/CRY2 et donc l'inhibition de l'activité de CLOCK/BMAL1. Grâce à CRY1, l'horloge de *C. gigas* est alors synchronisée avec les cycles de lumière environnementaux. La seconde boucle fait intervenir deux composants : REV-ERB et ROR. Ces deux récepteurs nucléaires entrent en compétition pour les sites RORE du



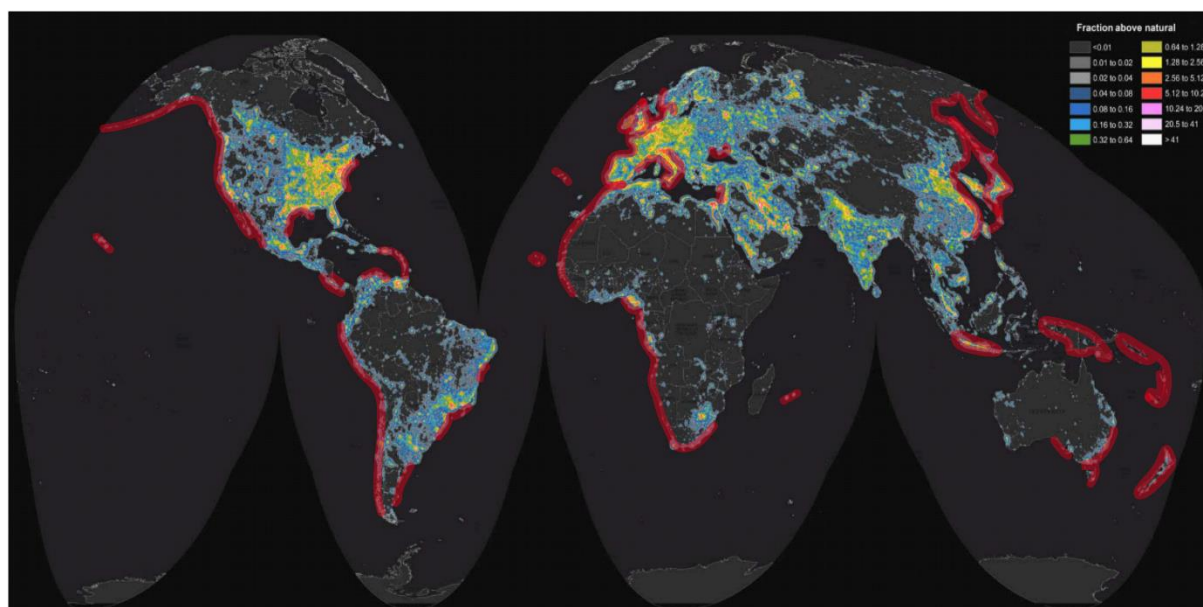
promoteur du gène *Cgbmall*. ROR active sa transcription ce qui favorise la formation du complexe CLOCK/BMAL1, alors que la protéine REV-ERB réprime l'expression de *Cgbmall* et donc l'action de l'hétérodimère. Cette horloge moléculaire circadienne est à l'origine des rythmes circadiens de *C. gigas*, mais elle pourrait également fonctionner à un rythme tidal (Tran et al., 2020a).



**Figure 14.** Schéma du fonctionnement de l'horloge moléculaire de *Crassostrea gigas*. Adapté de Perrigault and Tran (2017).

#### 5.4. Effets potentiels de LAN sur l’huitre *C. gigas*, un candidat idéal comme espèce bioindicatrice des effets de LAN en zones côtières ?

L’huitre *C. gigas* est une espèce clé des environnements côtiers présente dans le monde entier, et notamment sur les côtes fortement exposées à LAN (Figure 15) comme en Amérique du Nord, en Europe et en Asie (Falchi et al., 2016; Miossec et al., 2009). Etant une espèce sessile, l’huitre n’est pas capable de fuir les sources de LAN et y est donc inévitablement exposée. De plus, puisque les huitres sont capables de percevoir l’intensité lumineuse de la lune et ses variations, les effets de LAN pourraient se manifester à de très faibles intensités d’exposition, telles que celles du *skyglow*. LAN, en modifiant les niveaux d’éclairage naturel nocturne, peut perturber la perception des cycles lumineux environnementaux par *C. gigas* et notamment la perception de l’alternance jour / nuit. Ainsi, la synchronisation de l’horloge interne de l’huitre avec son environnement peut être compromise, ainsi que son rythme comportemental journalier. La perturbation de l’organisation temporelle des huitres peut avoir de lourdes conséquences sur sa physiologie, sa fitness et son écosystème.



**Figure 15.** Carte mondiale de la luminosité artificielle du ciel (Falchi et al., 2016) et distribution de l’huitre *C. gigas* (ligne rouge) (Miossec et al., 2009).

# **Chapitre II**

## **Matériels et méthodes**

## 1. Huitres et micro-algues

Les huitres creuses *Crassostrea gigas* utilisées lors ce travail ont été obtenues auprès d'un ostréiculteur du bassin d'Arcachon, Olivier Girard (Ferme ostréicole Cap Premium, Port de la Barbotière, 33470, Gujan-Mestras, France), pour toutes les expérimentations. Une fois à la station marine, ces huitres issues du bassin d'Arcachon sont maintenues de 2 à 6 semaines à l'animalerie dans des bacs circulaires d'environ 400 L et sont soumises à la photopériode naturelle. Ces bacs étaient continuellement alimentés en eau de mer naturelle oxygénée, provenant directement du bassin d'Arcachon.

Lorsque l'expérimentation l'exigeait (chapitre VII), les huitres ont été nourries avec une espèce de micro-algue, *Chaetoceros calcitrans*, fournie par la société Greensea (Mèze, France). Cette micro-algue est une diatomée de 3.5 à 7  $\mu\text{m}$  de diamètre qui était cultivée en continue pendant toute la durée de l'expérimentation. Les cultures se faisaient dans des cuves de 4, 10, 30 ou 80 L à l'aide de milieu f/2 et avec un bullage permanent (Guillard, 1975). Les cultures étaient soumises à une photopériode L:D de 14h:10h dans une chambre climatisée à  $16 \pm 1$  °C (Figure 16).



**Figure 16.** Photographie des cultures de *Chaetoceros calcitrans*.

## 2. Généralités sur l'expérimentation

### 2.1. Dispositif expérimental

Les expérimentations ont été menées dans des bacs (longueur x largeur x hauteur : 74.8 × 54.8 × 40.8 mm) aux parois opaques placés dans une pièce plongée dans l'obscurité dont la température est régulée. Le bac d'expérimentation est placé sur un système antivibratoire constitué d'une alternance de sacs de sables et de plaques en béton (Figure 17). Ces précautions permettent de limiter les potentielles perturbations extérieures au comportement des animaux. Pendant toute la durée des expérimentations, les huitres sont dans un système ouvert, avec une arrivée continue d'eau de mer provenant du bassin d'Arcachon filtrée à 25, 10 puis 5 ou 1 µm. Cette eau arrive ensuite dans un bac d'homogénéisation au sein duquel elle est oxygénée et maintenue à une température de 15, 16 ou 20 °C ( $\pm 1$  °C) en fonction de la période de l'année à l'aide de résistances, d'un groupe froid et de la climatisation de la pièce. La présence du groupe froid permet également de brasser en continu l'eau de mer du bac d'homogénéisation afin d'annihiler les cycles environnementaux pour qu'ils n'influencent pas le comportement des huitres. L'eau de mer arrive ensuite en continu dans le bac d'expérimentation contenant les huitres et l'excès d'eau est évacué par une sortie à l'opposé, permettant de garder un niveau d'eau constant. Afin de limiter les possibles contaminations par des sources de lumière externes à l'expérimentation, des bâches noires entourent le bac d'expérimentation et d'autres bâches isolent l'unité expérimentale du reste de la pièce. Lorsque les huitres étaient nourries avec la micro-algue *Chaetoceros calcitrans* pendant l'expérimentation, l'apport en algues était continu et constant tout au long de l'expérience afin qu'il ne soit pas un paramètre cyclique et n'influence pas le comportement valvaire. Pour cela, le bac d'expérimentation était constamment alimenté par une solution de micro-algues avec un débit de 2 mL/minute à l'aide d'une pompe péristaltique afin de maintenir une concentration de 500 cellules/mL dans le bac. La concentration en micro-algues dans le bac d'expérimentation était mesurée quotidiennement à la même heure afin de s'assurer qu'elle était constante tout au long de l'expérimentation.

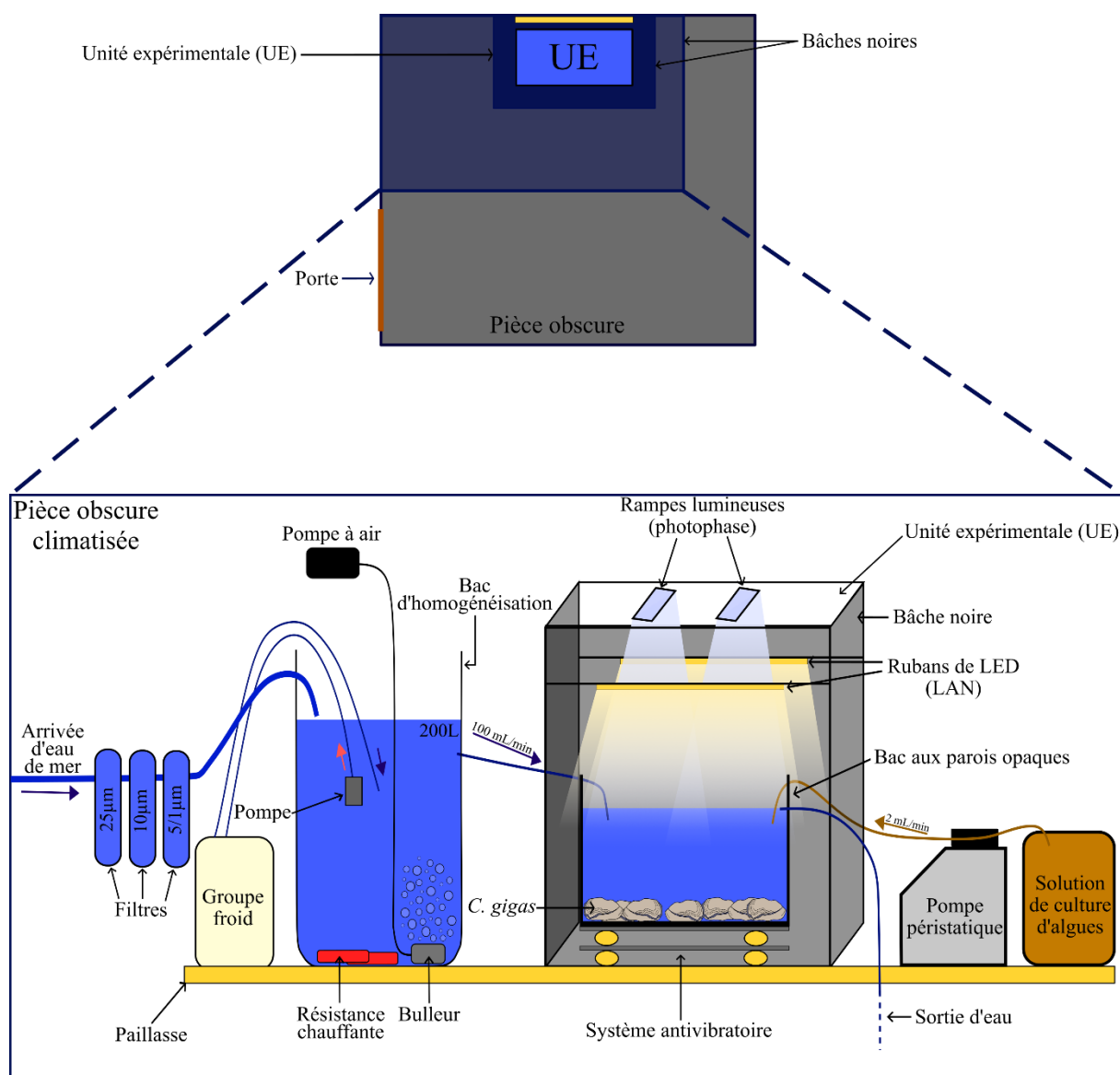


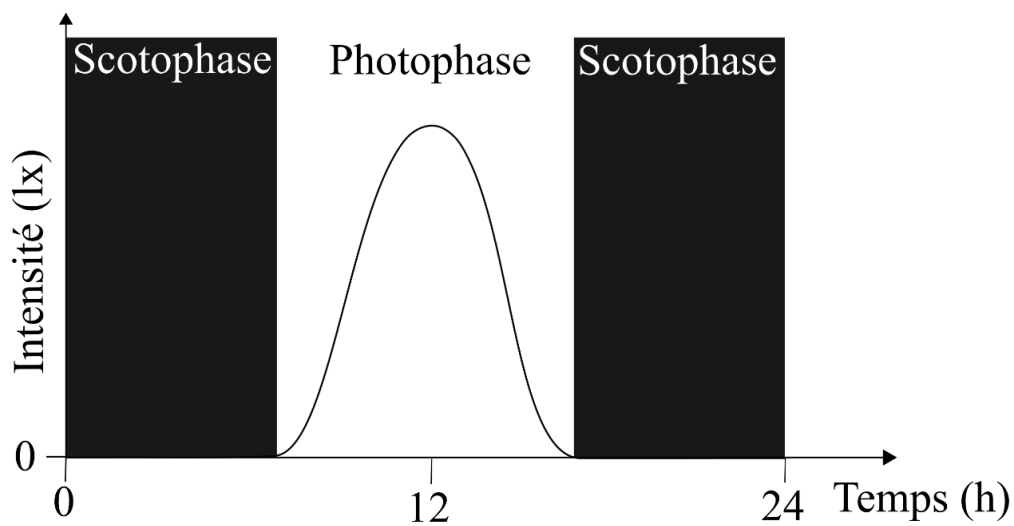
Figure 17. Dispositif expérimental.

## 2.2. Conditions d'exposition à la lumière

Pendant toute la durée de l'expérimentation, les huitres sont soumises à une alternance jour / nuit. La photopériode utilisée est variable en fonction de la saison à laquelle l'expérience se déroule afin de se rapprocher au maximum des conditions environnementales auxquelles les huitres étaient soumises dans l'animalerie et plus largement dans leur milieu. Le cycle journalier de la lumière naturelle est mimé à l'aide de rampes de LEDs blanches et bleues (MH3SP3 DSunY ; Figure 18) dont l'intensité lumineuse variait graduellement pendant la photophase en atteignant son maximum en milieu de journée (Figure 19).

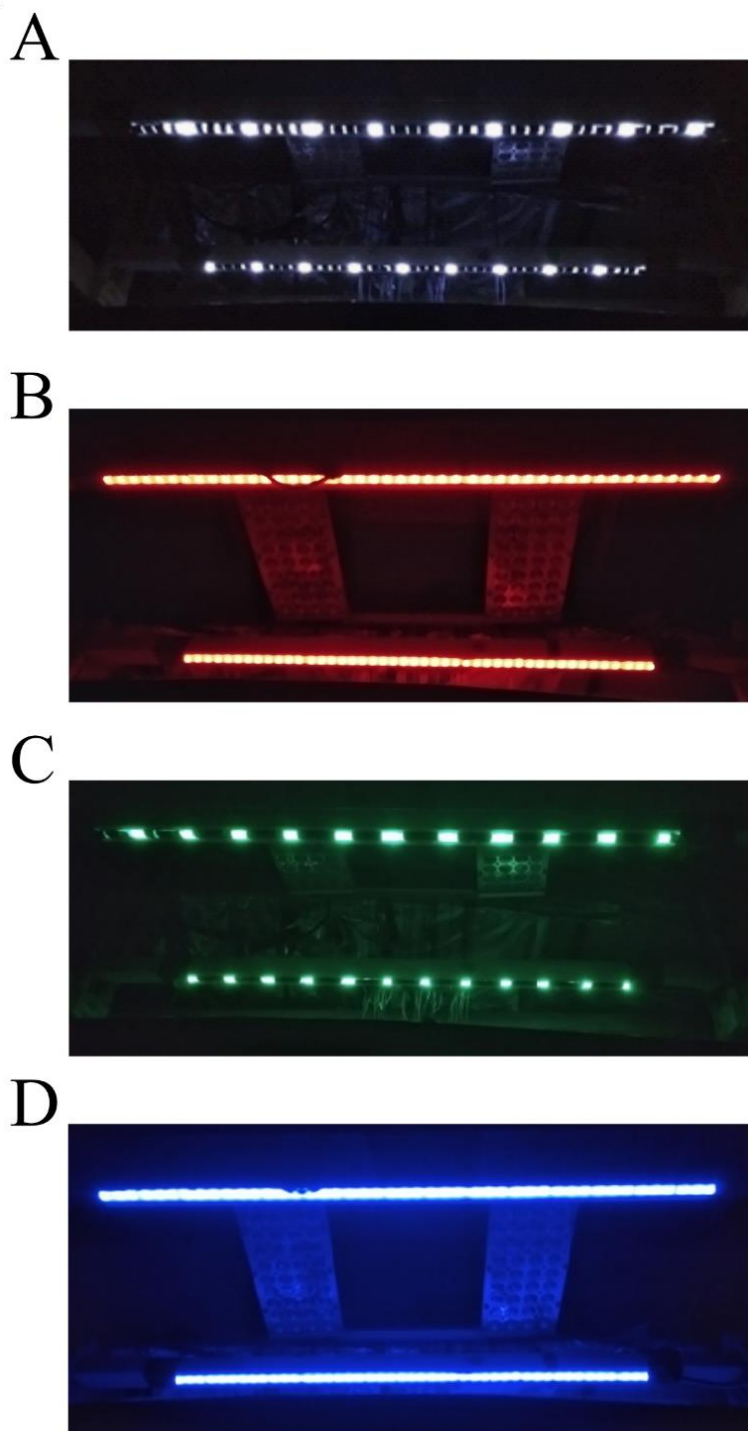


**Figure 18.** Photographie des rampes de LEDs utilisées pour mimer la lumière du jour (photophase).



**Figure 19.** Alternance jour / nuit à laquelle sont soumises les huitres.

Les huitres sont exposées à LAN à l'aide de deux rubans de LEDs (MiBoxer Mi-Light WL5 ; Figure 20) disposés au-dessus du bac d'expérimentation produisant un éclairage nocturne.

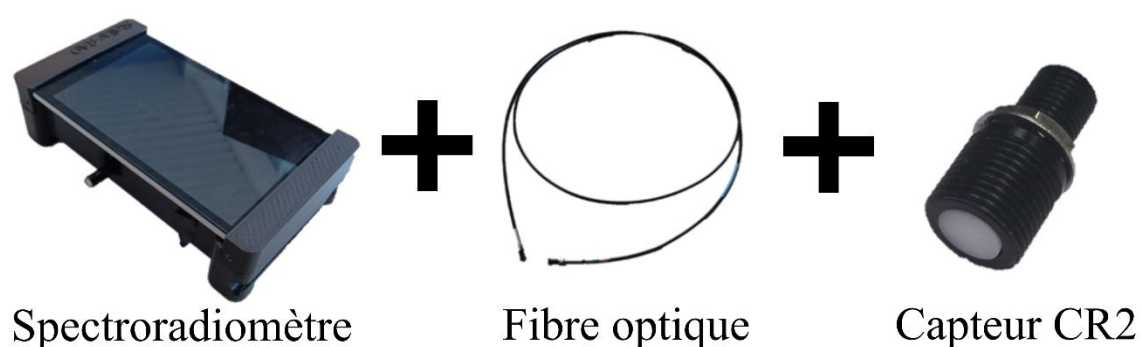


**Figure 20.** Photographie des rubans de LEDs utilisés pour mimer LAN à une intensité de 1 lx en lumière (A) blanche, (B) rouge, (C) verte et (D) bleue.

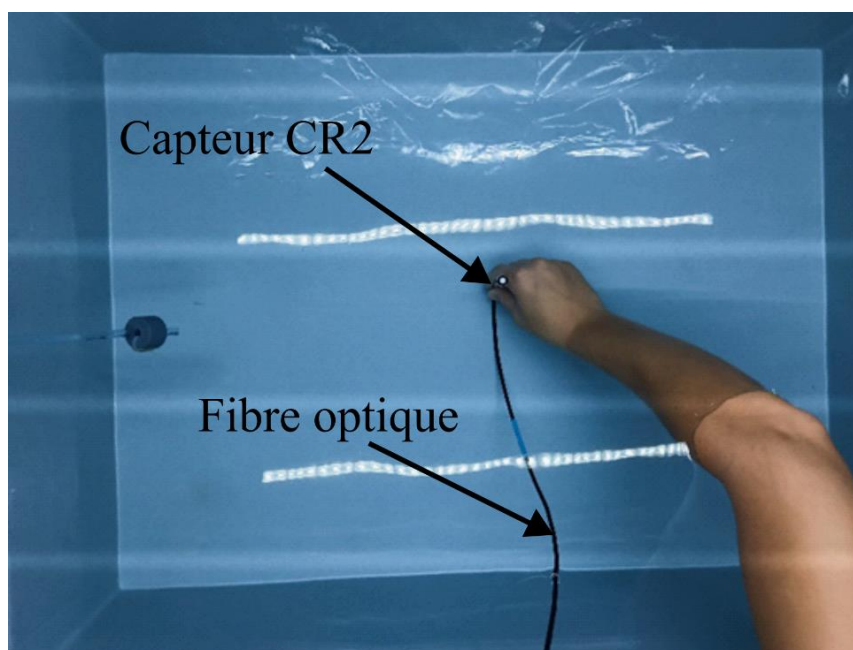


### 2.3. Mesure de la lumière

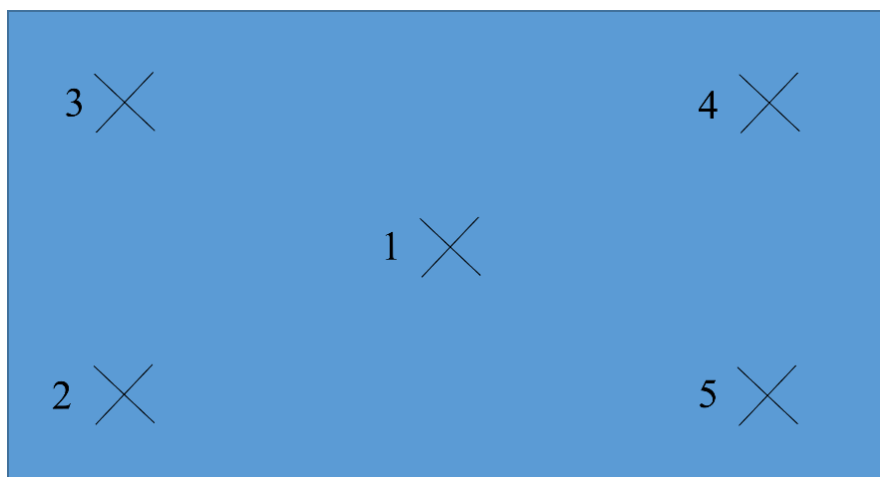
Avant de débiter chaque expérimentation, des mesures d'illuminance sont réalisées à l'aide d'un spectroradiomètre portable (Blue-Wave UVN-100, StellarNet Inc) relié au capteur de lumière étanche CR2 par une fibre optique (Figure 21) dans l'eau au niveau des huitres (Figure 22). Pour chaque valeur d'illuminance, les mesures d'intensités sont faites à cinq endroits différents dans le bac (au milieu et au niveau de chaque coin ; Figure 23) afin d'obtenir l'intensité lumineuse moyenne à laquelle l'ensemble des huitres est exposé.



**Figure 21.** Photographie du spectroradiomètre, de la fibre optique et du capteur CR2.



**Figure 22.** Photographie d'une mesure d'intensité lumineuse sous l'eau à hauteur d'huitre par le spectroradiomètre.



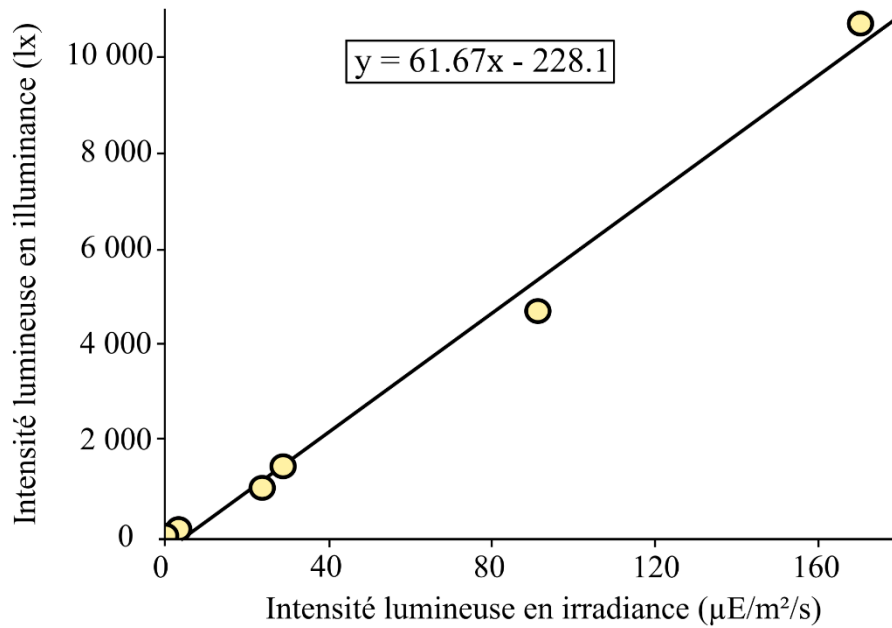
**Figure 23.** Cinq positions dans le bac d’expérience utilisées pour les mesures d’intensité lumineuse moyenne dans l’eau. La mesure est faite à la profondeur des huitres.

Des mesures d’irradiance ont également été réalisées dans l’eau en utilisant un radiomètre portable (MICRO Class, Profiling (in-water), E (irradiance) PAR sensor, Biospherical Instrument Inc. ; Figure 24).

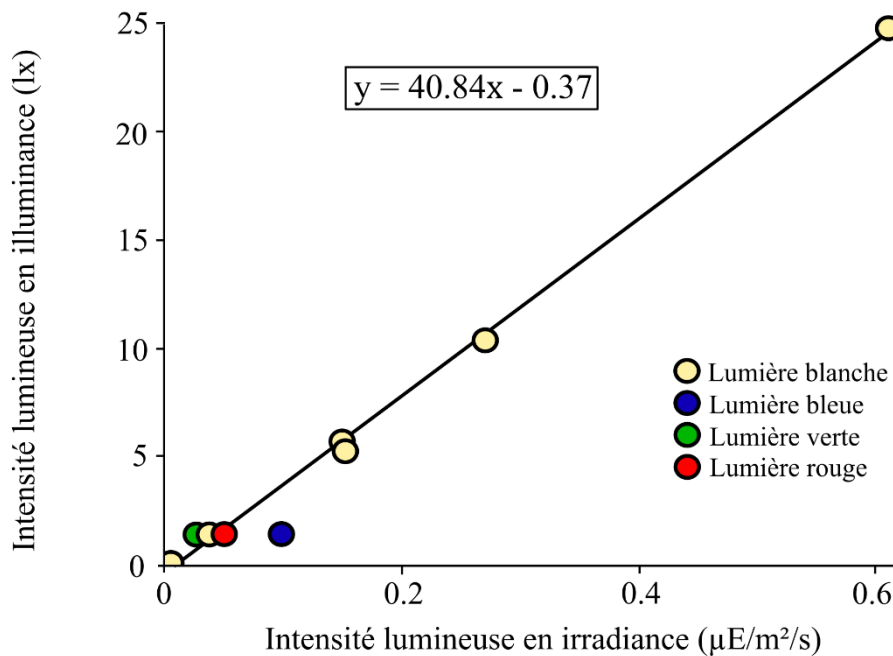


**Figure 24.** Photographie du radiomètre portable (MPE-PAR).

Les mesures d’illuminance et les mesures d’irradiance équivalentes sont présentées dans la Figure 25 pour les intensités lumineuses de la photophase émises par les rampes de LEDs (Figure 18) et dans la Figure 26 pour les intensités lumineuses de LAN émises par les rubans de LEDs (Figure 20). Les valeurs d’illuminance et d’irradiance sont également inscrites dans le Tableau 1.



**Figure 25.** Régression linéaire des valeurs d'intensités lumineuses de photophase en illuminance et en irradiance produites pas les rampes de LEDs blanches et bleues (MH3SP3 DSunY).



**Figure 26.** Régression linéaire des valeurs d'intensité lumineuses de LAN en illuminance et en irradiance produites pas les rubans de LEDs (MiBoxer Mi-Light WL5).

**Tableau 1.** Valeurs d'illuminance (lx) et d'irradiance ( $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ) de photophase et de LAN utilisées.

	<b>Illuminance (lx)</b>	<b>Irradiance (<math>\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}</math>)</b>
Photophase	10 731.47	170.60
	4 677.94	91.30
	1 420.17	28.99
	1 026.63	23.74
	92.3	2.29
	9.47	0.13
	1.35	0.04
LAN ; lumière blanche	24.72	0.61
	10.29	0.27
	5.67	0.15
	1.28	0.04
	0.12	$5.85 \times 10^{-3}$
LAN ; lumière bleue	1.32	0.10
LAN ; lumière verte	1.19	0.03
LAN ; lumière rouge	1.3	0.05

L'intensité et le spectre de la photophase sont mesurés lorsqu'elle est la plus importante pendant la journée (Figure 19). Pour chaque condition d'exposition à LAN, l'intensité lumineuse ainsi que le spectre de LAN sont mesurés. Pour les conditions contrôles, donc sans éclairage nocturne, l'intensité nocturne est inférieure à 0.05 lx, qui est la limite de détection du spectroradiomètre, et est donc considérée comme équivalente à la nuit noire.

## 2.4. Expérimentation

Avant le début de chaque expérimentation, les huitres utilisées pour l'étude du comportement sont frottées avec une brosse si nécessaire, lavées et séchées. Ces huitres sont ensuite mesurées en longueur et largeur à l'aide d'un pied à coulisse puis placées dans le bac d'expérimentation (Figure 27).



**Figure 27.** Photographie d’huîtres disposées dans le bac d’expérimentation exposées à une intensité lumineuse de 5 lx.

Avant l’expérimentation, les huîtres sont soumises à une phase d’acclimatation de 7 à 10 jours sans éclairage nocturne, afin qu’elles s’acclimatent aux conditions contrôlées et spécifiques de chaque dispositif expérimental. Suite à cette phase d’acclimatation, l’expérimentation débute. Les huîtres sont alors soumises soit à différentes intensités de photophase, soit à différentes intensités lumineuses, spectres ou modalités d’exposition à LAN (excepté pour les conditions contrôles sans éclairage nocturne). Pendant toute la durée des expérimentations, les paramètres physico-chimiques de l’eau de mer sont mesurés (pH, température et concentration en algues si les huîtres sont nourries) afin de s’assurer que sa composition reste stable et n’influence pas le comportement des animaux.

### **3. Etude du comportement valvaire par valvométrie HFNI**

#### **3.1. Fonctionnement de la valvométrie HFNI**

La valvométrie Haute Fréquence Non-Invasive (HFNI) est un biocapteur développé et utilisé au laboratoire afin d’étudier le comportement valvaire de mollusques bivalves tels que l’huître. Pour cela, deux électrodes sont collées de part et d’autre de la coquille de l’huître (Figure 28).



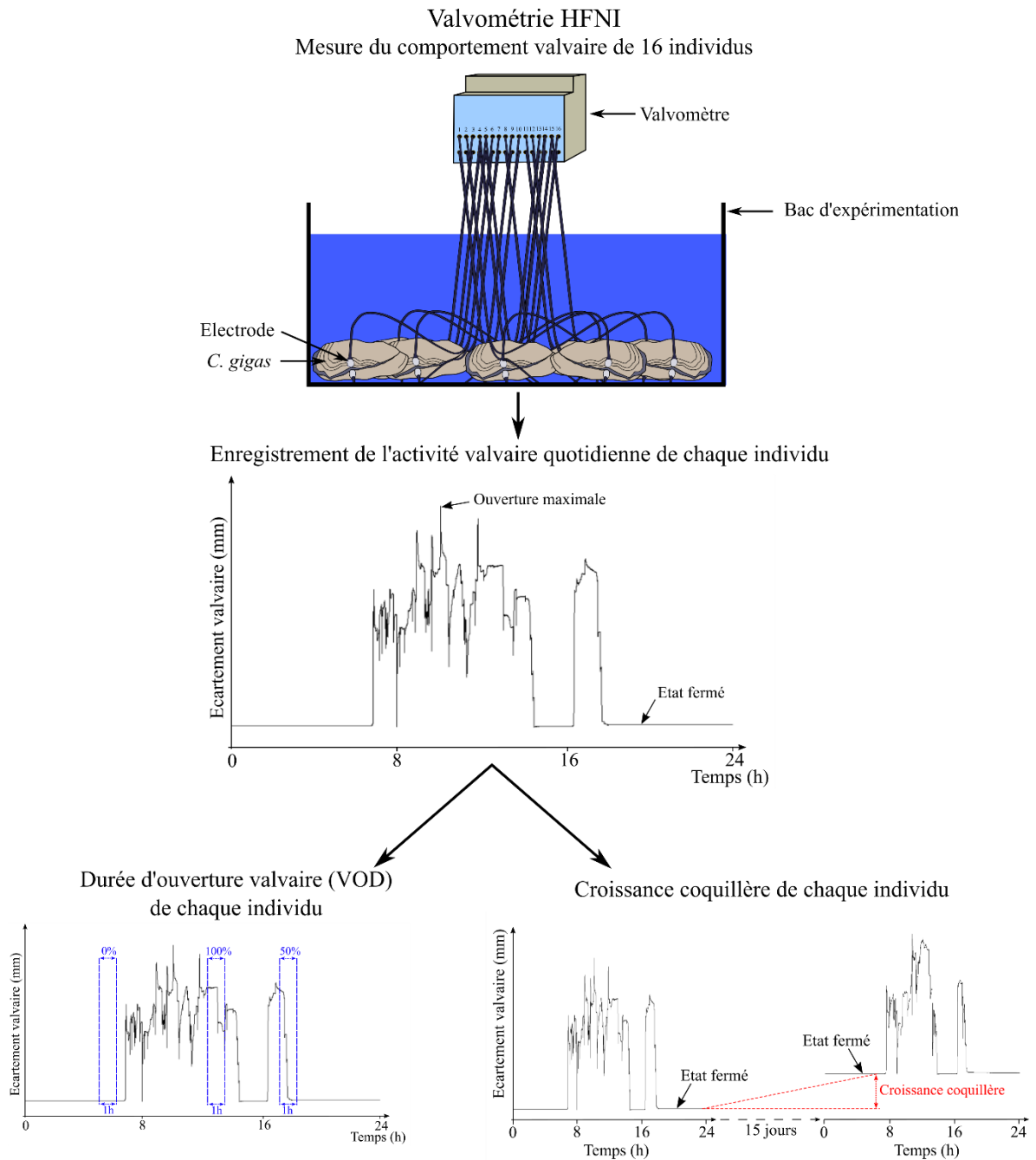
**Figure 28.** Photographie d’huitres équipées d’électrodes de valvométrie HFNI.

Ces électrodes sont composées chacune d’un électroaimant enrobé de résine dont le faible poids (56 mg) permet de minimiser la perturbation du comportement de l’animal (Andrade et al., 2016; Tran et al., 2003). Entre ces électroaimants va se former un courant électromagnétique dont la variation de voltage lors de l’ouverture et de la fermeture de la valve nous permet de suivre l’écartement entre les électrodes et donc le comportement d’ouverture des huitres. Pour cela, la mesure réalisée est une application de la loi de Maxwell :  $\varepsilon = -N \cdot \frac{d\varphi_B}{dt}$  avec  $\varepsilon$  la force électromagnétique (volts),  $N$  le nombre de tours de l’électroaimant,  $\varphi_B$  le flux magnétique (webers) et  $t$  le temps. Les électrodes sont reliées à l’aide de câbles flexibles de 1 à 1.8 mètres à un valvomètre qui permet d’enregistrer le comportement valvaire de 16 huitres simultanément sur des périodes plus ou moins longues (Figure 29). Pour chaque individu, le signal est enregistré toutes les 4.8 secondes puis transmis à une carte électronique et enfin à un ordinateur afin d’acquérir, d’enregistrer et de traiter les données. Toutes les 300 ms, trois informations sont enregistrées : la distance entre les électrodes, le temps d’échantillonnage et le numéro de l’animal.

### 3.2. Paramètres étudiés à l’aide de la valvométrie HFNI

Les données sont ensuite traitées par une application de valvométrie développée à l’aide du logiciel Labview 8.0 (National Instrument, Austin, TX, USA). Cette dernière permet d’obtenir pour chaque jour et chaque individu un graphique représentant l’écartement valvaire (mm, distance entre les électrodes) de chaque individu en fonction du temps (Figure 29). Ensuite,

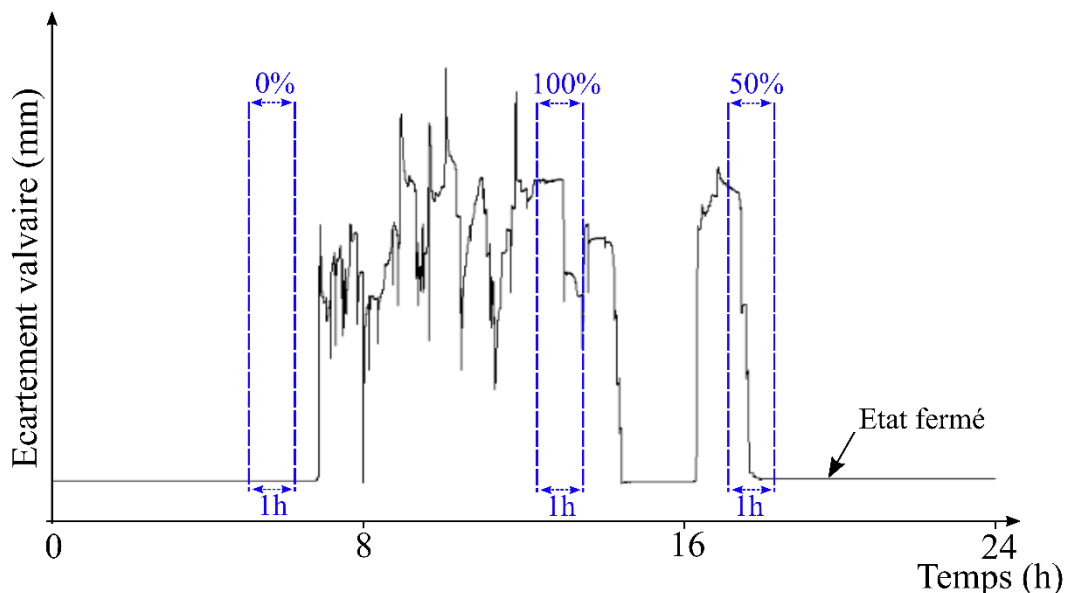
diverses analyses peuvent être menées afin d’obtenir les paramètres de durée d’ouverture valvaire et de croissance coquillère décrit ci-dessous.



**Figure 29.** Etude du comportement valvaire de l’huitre à l’aide de la valvométrie HFNI.

### 3.2.1. La Durée d'Ouverture Valvaire (VOD)

La durée d'ouverture valvaire ou VOD (pour *Valve Opening Duration* en anglais) est un paramètre caractérisant l'activité valvaire des bivalves (Figure 30). La VOD représente le pourcentage de temps qu'une huitre reste ouverte par unité de temps. Par exemple, une VOD horaire de 0 % correspond à une huitre dont les valves sont fermées pendant une heure entière, alors qu'une VOD de 100 % correspond à une huitre dont les valves restent ouvertes pendant une heure entière, quelle que soit l'amplitude d'ouverture. Les valeurs de pourcentage intermédiaires sont aussi possibles. L'état fermé ou ouvert d'une huitre se détermine en fixant un seuil de distance entre les électrodes (ligne plate) correspondant au 0 % d'ouverture valvaire (Figure 30). Si l'écartement valvaire dépasse ce seuil, l'huitre est considérée ouverte. Ce paramètre est mesuré heure par heure pour chaque individu et chaque jour de l'expérimentation.

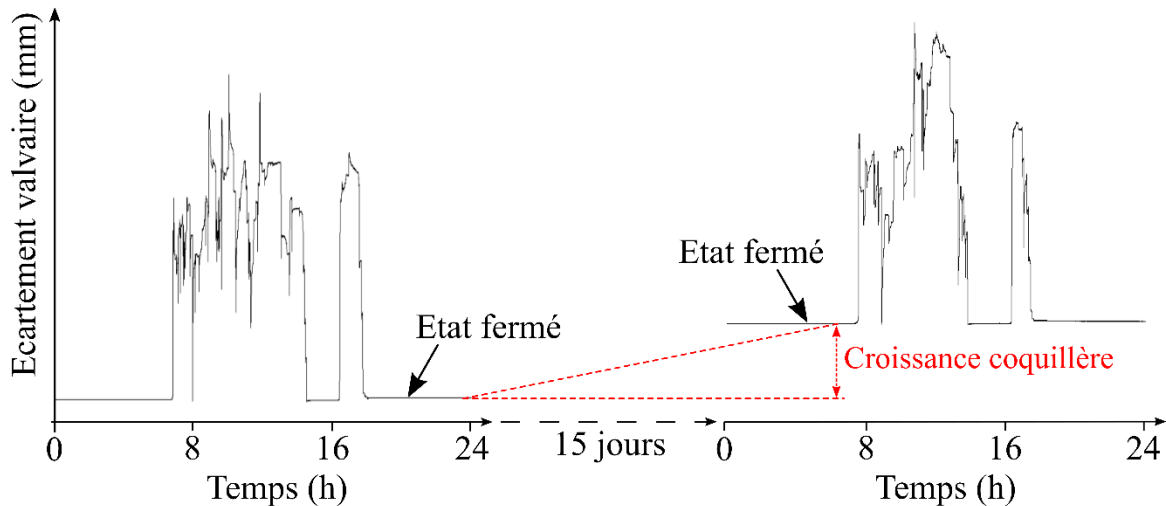


**Figure 30.** Principe de mesure de la VOD d'un individu.

### 3.2.2. La croissance coquillère

Chez l'huitre, la croissance coquillère est réalisée par le manteau via un processus de biominéralisation sur la surface interne de la coquille (Louis et al., 2022; Marin et al., 2012). Ce phénomène peut être étudié à l'aide de la valvométrie HFNI : l'ajout de couches internes à la coquille provoque une augmentation de la distance minimale entre les électrodes lorsque l'huitre est fermée (Figure 31).





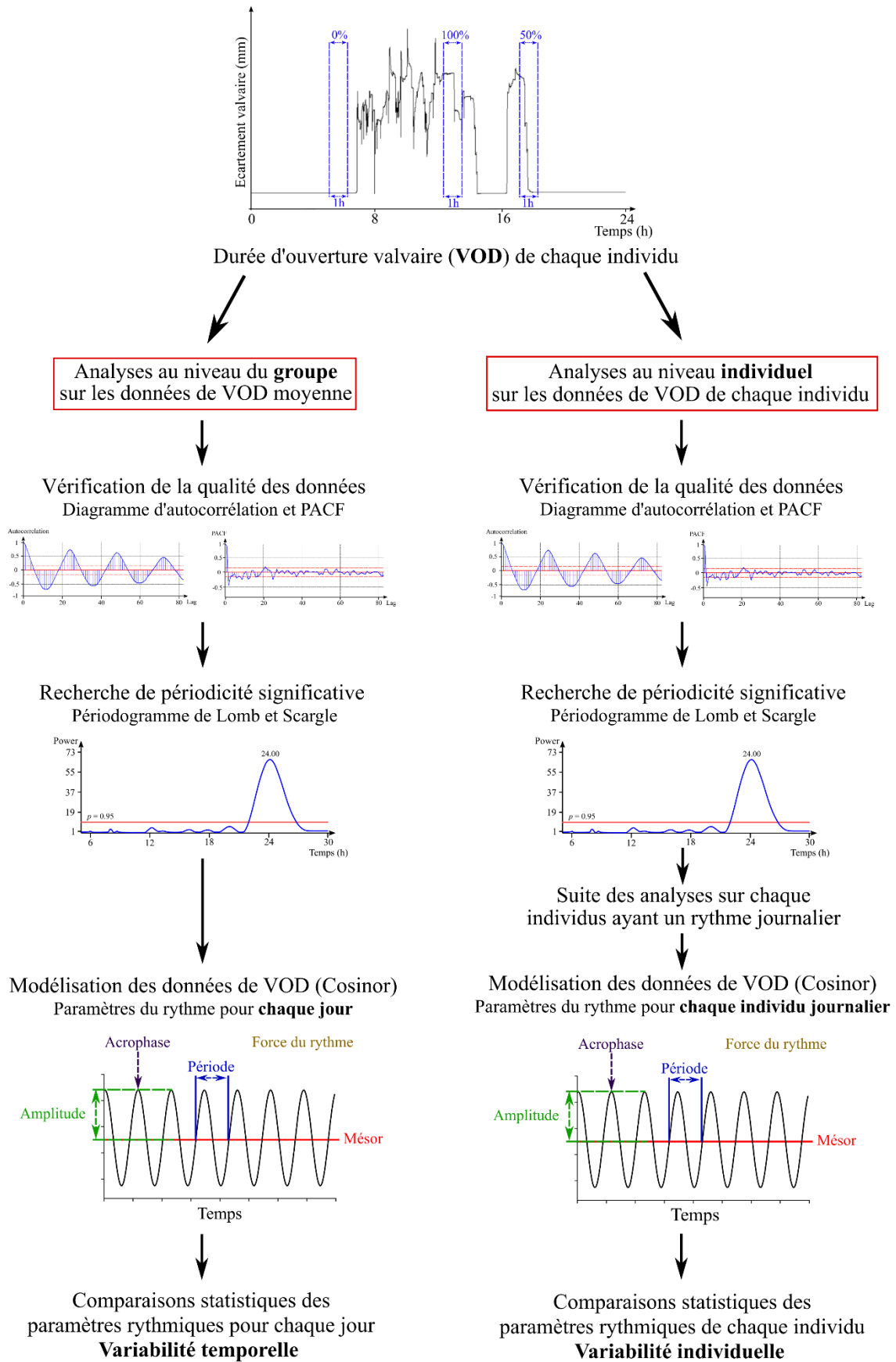
**Figure 31.** Principe de mesure de la croissance coquillère journalière d'une huitre.

Il est possible de calculer un taux de croissance coquillère pour chaque individu en relevant chaque jour la distance minimale entre les électrodes quand l'huitre est fermée et en utilisant les mesures de la longueur de la coquille faites au début et à la fin de l'expérimentation. Pour

cela, l'équation suivante est utilisée :  $GR = \frac{e_{d[1-28]} - e_{d1} * (\Delta L_{d28} - L_{d1})}{e_{d28} - e_{d1} L_{d1}}$  avec GR le taux de croissance, e la distance minimale entre les électrodes, d les jours, et L la longueur de la coquille.

#### 4. Analyses chronobiologiques

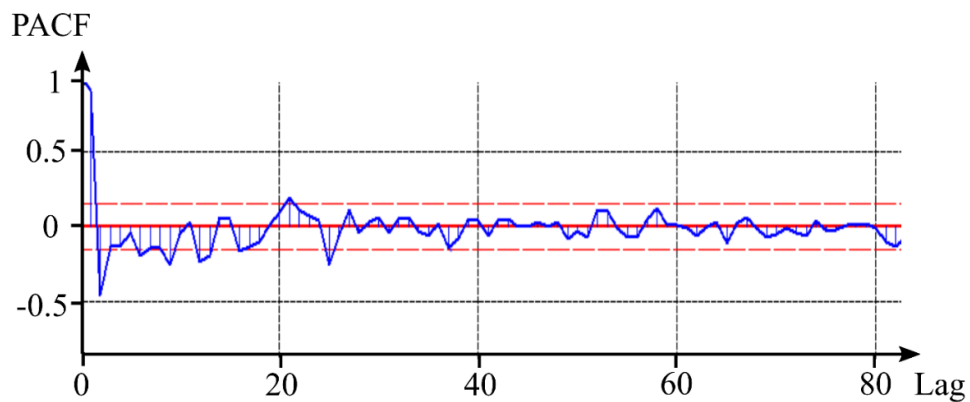
Les analyses chronobiologiques consistent à chercher l'existence de rythmes biologiques et leurs caractéristiques dans les données expérimentales, ici les données de VOD, à l'aide du logiciel Time Series Analysis Serie Cosinor 8.0 (Expert Soft Technologies). Pour cela, plusieurs étapes sont réalisées (Figure 32) : la vérification de la qualité des données, la recherche d'une ou plusieurs périodicités significatives et enfin la modélisation de la rythmicité des données avec le modèle cosinor et sa validation statistique (Gouthiere et al., 2005b; Gouthiere et al., 2005a; Gouthière and Mauvieux, 2003). Ces analyses sont menées au niveau du groupe (analyses chronobiologiques menées sur l'activité moyenne des 16 huitres) ou au niveau individuel (analyses chronobiologiques menées sur l'activité de chaque individu exprimant un rythme journalier indépendamment des autres) (Figure 32).



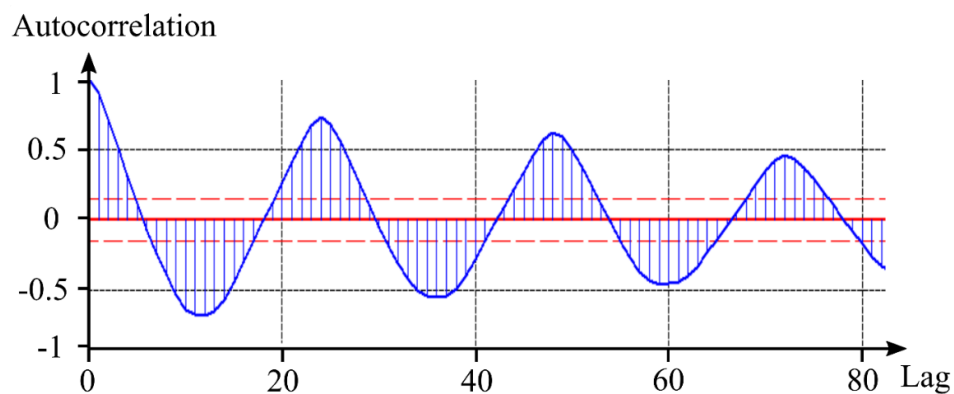
**Figure 32.** Procédure des analyses chronobiologiques au niveau du groupe et au niveau individuel.

#### 4.1. Vérification de la qualité des données comportementales

La première étape de l'analyse chronobiologique consiste à s'assurer de la qualité des données. Pour cela, il faut vérifier l'absence de phénomènes stationnaires à l'aide d'un diagramme de la fonction d'autocorrélation partielle (PACF) (Figure 33), ainsi que l'absence de répartition des données aléatoires à l'aide du diagramme d'autocorrélation (Figure 34) (Gouthiere et al., 2005a; Gouthière and Mauvieux, 2003). Le fait que ces deux prérequis soient remplis nous indique que les données traduisent un phénomène biologique réel dont il est possible d'évaluer la rythmicité.



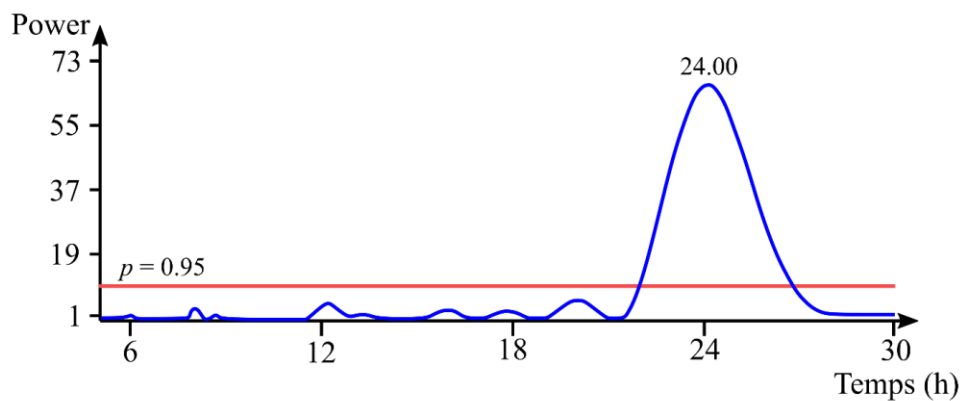
**Figure 33.** Diagramme de la fonction d'autocorrélation partielle (PACF) permettant de tester l'absence de phénomènes stationnaires.



**Figure 34.** Diagramme d'autocorrélation permettant de tester l'absence de phénomènes aléatoires.

## 4.2. Recherche de périodicités significatives

La recherche de périodicités dans les données comportementales est faite à l'aide d'une analyse spectrale et plus particulièrement du périodogramme de Lomb et Scargle (Figure 35), basé sur la régression et l'analyse de Fourier (Scargle, 1982). Une période est considérée comme significative lorsque qu'elle dépasse le seuil de probabilité indiqué par le périodogramme ( $p > 0.95$ ).



**Figure 35.** Périodogramme de Lomb et Scargle révélant une période significative de 24 h sur un jeu de données.

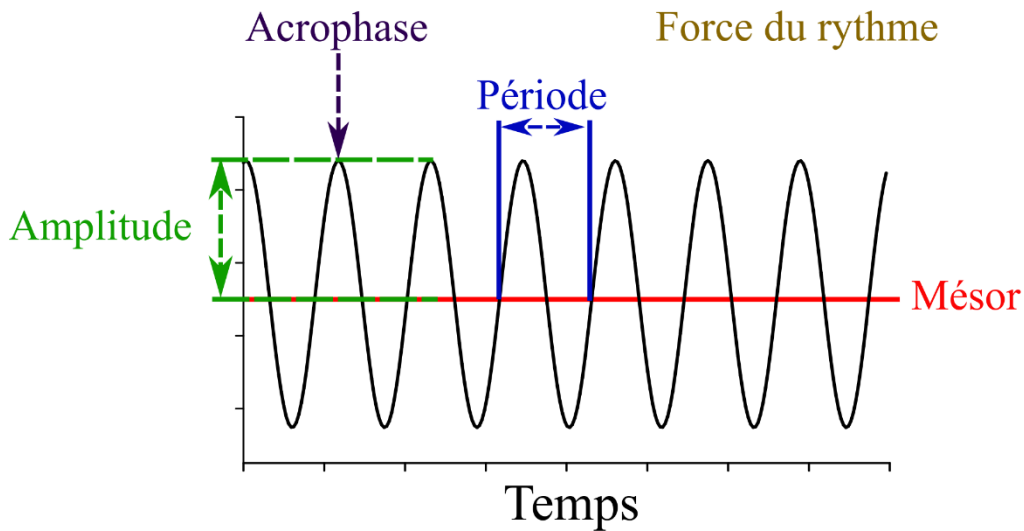
## 4.3. Modélisation des données comportementales (modèle Cosinor)

Lorsqu'une période significative est trouvée, la rythmicité des données est modélisée par le modèle cosinor qui utilise une fonction cosinus calculée par régression (Bingham et al., 1982). Ainsi, pour une période donnée, l'équation du modèle s'écrit :

$$Y(t) = A \cos\left(\frac{2\pi t}{\tau} + \phi\right) + M + \varepsilon(t)$$

Avec A correspondant à l'amplitude,  $\tau$  correspondant à la période donnée,  $\phi$  correspondant à la phase, M correspondant au mésor, et  $\varepsilon(t)$  correspondant à l'erreur relative (Gouthiere et al., 2005a). Ainsi, ce modèle indique les caractéristiques du rythme (Figure 36) : le mésor, l'amplitude, l'acrophase, ainsi que le *percent rhythm* (PR) qui se définit comme le pourcentage du comportement étudié expliqué par le modèle, autrement dit, il caractérise la force du rythme. Ce modèle nous permet d'obtenir ces caractéristiques du rythme étudié pour l'entièreté de l'expérimentation ou pour chaque jour de celle-ci, permettant de conduire des analyses à différentes échelles. De la même façon, ces analyses peuvent être faites au niveau du groupe

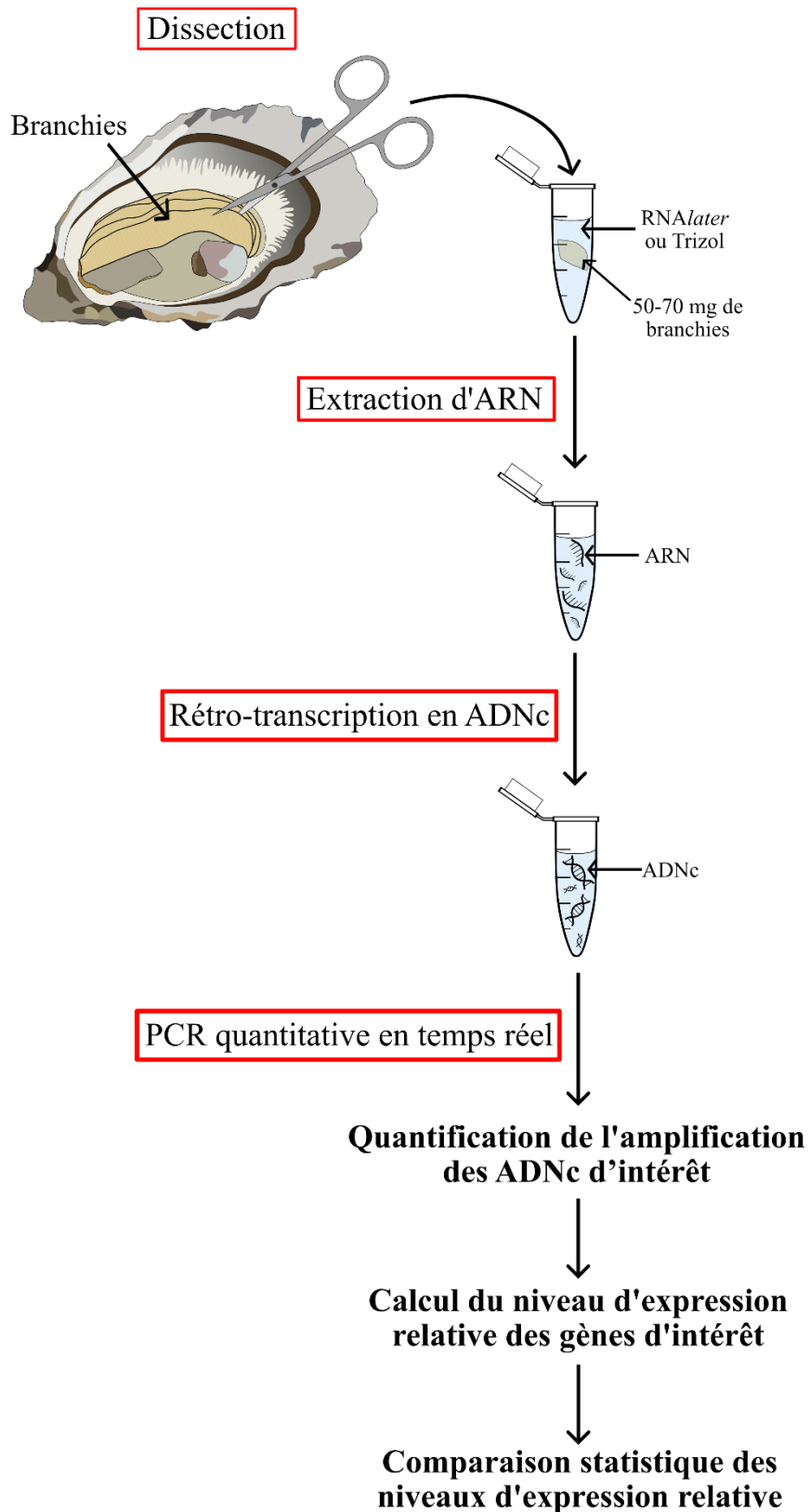
(analyses chronobiologiques menées sur l'activité moyenne des 16 huitres) ou au niveau individuel (analyses chronobiologiques menées sur l'activité de chaque individu exprimant un rythme journalier indépendamment des autres), qui sont deux analyses complémentaires. Enfin, pour valider l'existence de la rythmicité modélisée, deux tests sont effectués : le test de l'ellipse, qui doit être rejeté et la probabilité que l'amplitude soit nulle, qui doit être inférieure à 0.05.



**Figure 36.** Paramètres caractérisant un rythme.

## 5. Analyses moléculaires

Des analyses moléculaires ont été menées dans le but de mettre en évidence le potentiel impact de LAN sur l'expression de 8 gènes de l'horloge moléculaire de l'huitre (*CgClock*, *CgBmall*, *CgCry*, *CgPer*, *CgTim1*, *CgCry1*, *CgRev-erb*, *CgRor*), 3 gènes de la perception de la lumière (*CgRhodopsin-like 1*, *CgRhodopsin-like 2*, *CgRhodopsin-like 3*) et 2 gènes impliqués dans des processus physiologiques (*CgHiomt-like*, *CgOctβ2*). Les analyses moléculaires sont composées de quatre étapes (Figure 37) : le prélèvement des organismes et le conditionnement des tissus, l'extraction des ARN, la rétrotranscription en ADNc et la PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR).



**Figure 37.** Procédure des analyses moléculaires de la dissection jusqu'à la quantification de l'expression des gènes d'intérêts par RT-qPCR.

### 5.1. Prélèvement des organismes et conditionnement des tissus

A chaque temps de prélèvement, les huîtres sont prélevées puis disséquées une à une le plus rapidement possible, afin que le temps de latence entre le prélèvement de l'animal et le conditionnement du tissu ne soit que de quelques dizaines de secondes, limitant les biais potentiels induits par la dissection sur le niveau d'expression des gènes. Les prélèvements ont lieu en lumière rouge, afin de limiter l'impact de la lumière sur les organismes. Les analyses moléculaires ont été réalisées à partir d'échantillons de branchies. Le tissu branchial est à l'interface avec le milieu extérieur et est impliqué dans les fonctions de respiration et de nutrition (tri et acheminement des particules vers le tractus digestif). Il possède l'avantage d'être clairement identifiable et rapidement accessible pour la dissection. Pour chaque individu, 50 à 70 mg de tissus branchiaux sont placés dans 800  $\mu$ L de Trizol (Invitrogen, expériences des chapitres IV et V) ou de *RNAlater* (Invitrogen, expériences des chapitres VI et VII). Ces deux solutions permettent la fixation et la conservation de l'ARN sur le long terme, notamment en inactivant les RNAses. Contrairement aux échantillons placés dans le *RNAlater*, ceux placés dans le Trizol sont directement broyés au FastPrep (MP Biomedicals, USA) à l'aide de billes de céramique puis laissés à température ambiante pendant 5 minutes afin de permettre au Trizol de pénétrer l'ensemble des tissus. Dans les deux cas (*Trizol* ou *RNAlater*), les échantillons sont ensuite stockés à  $-80$  °C en attendant les futures analyses.

### 5.2. Extraction d'ARN

La deuxième étape des analyses moléculaires consiste à extraire les ARN totaux des échantillons de branchies, parmi lesquels on retrouvera les ARNm. Afin de limiter la présence d'enzymes dégradant l'ARNm dans l'environnement de travail ainsi que de potentielles contaminations, il est nécessaire de nettoyer la paillasse à l'éthanol et au *RNAse Away*, de porter des gants, et d'utiliser de l'eau *Nuclease Free*, ainsi que des cônes et tubes stériles. L'extraction de l'ARN a été réalisée à l'aide d'un kit SV Total RNA Isolation System (Promega). Pour les échantillons conservés dans le Trizol, les ARN sont préalablement isolés par extraction de phase, à l'aide d'ajout de chloroforme suivi d'une centrifugation. Les échantillons conservés dans le *RNAlater* sont quant à eux d'abord broyés au FastPrep (MP Biomedicals, USA) à l'aide de billes de céramique, dans du Lysis Buffer fourni par le kit (Promega). Puis, les ARN sont préalablement isolés par ajout de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25 :24 :1) suivi d'une centrifugation. Ensuite, pour l'ensemble de nos échantillons (*Trizol* et *RNAlater*), c'est

le protocole du kit qui est suivi. Brièvement, l'ARN et les résidus potentiels d'ADN sont retenus sur une colonne d'affinité. Un traitement à la DNase est alors appliqué afin de dégrader les résidus d'ADN. Ensuite, après lavage de la colonne, l'éluion des ARN est réalisée à l'aide d'eau *Nuclease Free*. La qualité de l'extraction et la quantité d'ARN sont ensuite contrôlées par spectrophotométrie (Spectrofluoromètre Synergy HTX, BioTeK) en mesurant la densité optique des échantillons aux longueurs d'onde 260 nm (dosage des acides nucléiques), 280 nm (dosage des protéines), 230 nm (dosage des molécules organiques). L'ARN extrait est ensuite stocké à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 5.3. Rétro-transcription en ADNc

L'ARNm étant une molécule très fragile, sa quantification nécessite une rétro-transcription en ADNc. La rétro-transcription a été réalisée sur 1.5  $\mu\text{g}$  d'équivalent ARN à l'aide de kits GoScript<sup>TM</sup> Reverse Transcription System (Promega) dans un volume final de 20  $\mu\text{L}$ . Les échantillons ont alors une concentration finale de 0.075  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  d'équivalent ADNc et sont stockés à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 5.4. PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

La Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) quantitative en temps réel, ou RT-qPCR, permet de quantifier l'amplification des ADNc d'intérêt en temps réel. Le principe est d'utiliser une enzyme, la Taq polymérase, afin de répliquer les séquences d'ADNc ciblées par des amorces spécifiques à un gène d'intérêt. Suite à la réplication, le SYBR Green, un agent intercalant, va s'insérer dans les ADN double brin formés, provoquant une augmentation de la fluorescence à 520 nm. Puis, un cycle de réplication se répète en débutant par la séparation des doubles brins d'ADN puis la fixation des amorces spécifiques. Au fil des cycles de réplication, la fluorescence à 520 nm va augmenter progressivement avec l'augmentation de la quantité d'acides nucléiques, jusqu'à devenir exponentielle. Le nombre de cycle nécessaire pour obtenir cette augmentation exponentielle de la fluorescence est appelé Ct et dépend de la quantité initiale de la séquence d'ADNc d'intérêt dans l'échantillon : plus le Ct est faible, plus la quantité initiale de cette séquence était élevée et inversement. Enfin, afin de vérifier la spécificité des réactions, des courbes de dissociation sont réalisées. Pour cela, suite aux cycles de réplication, la température augmente progressivement de 60 à 95  $^{\circ}\text{C}$  avec une acquisition continue de la fluorescence. Cela entraîne une dissociation des doubles brins d'ADN



et donc une diminution de la fluorescence. La température, provoquant la perte de fluorescence et donc la dissociation de la séquence amplifiée, est spécifique à cette séquence et dépend de sa composition (taux de GC). Cette température est appelée température de fusion ( $T_m$ ).

Les réactions de RT-qPCR ont été réalisées à l'aide de kits GoTaq® qPCR Master Mix (PROMEGA) ou PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix sur 10 ng d'équivalent ADNc avec la machine Light Cycler® 480 Instrument (Roche) dans un volume final de 12.5  $\mu$ L (plaques de 384 puits). Pour chaque échantillon, les réactions de RT-qPCR sont réalisées en dupliquas techniques afin de s'assurer de la reproductibilité de la valeur du Ct. Si celle-ci est validée, les calculs d'expression relative sont effectués sur la moyenne des deux valeurs de Ct.

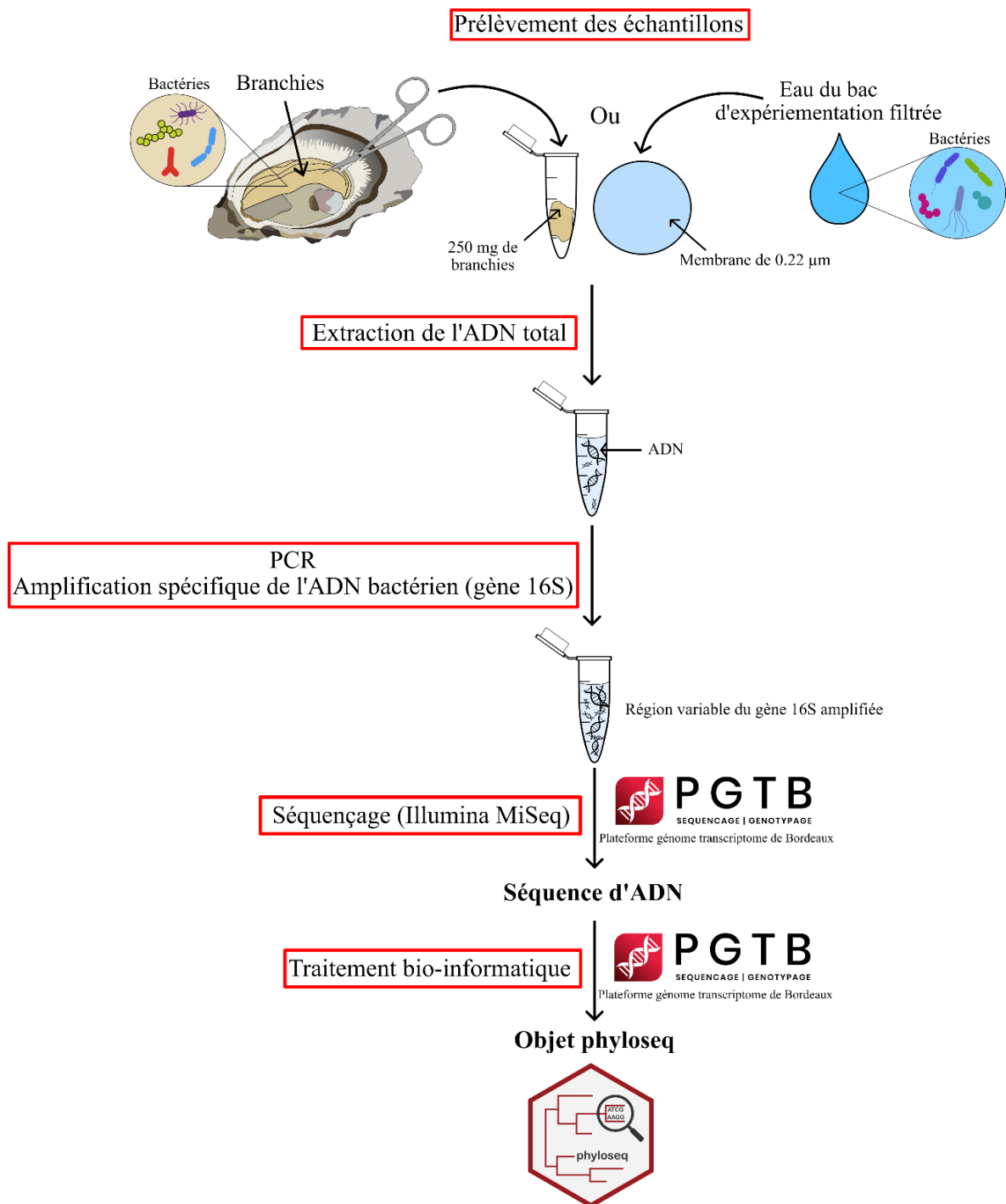
Le calcul du niveau d'expression des gènes d'intérêt se fait relativement à celui d'un ou plusieurs gènes de référence. Les gènes de référence sont des gènes constitutifs ayant une expression stable au cours du temps qui n'est pas susceptible d'être modulée par les conditions expérimentales du fait de leur fonction cellulaire essentielle. Trois gènes de référence ont été amplifiés par RT-qPCR : *CgEfl*, codant pour un facteur d'élongation, *Cg28S*, codant pour un ARN ribosomique et *CgGadph*, codant pour une enzyme impliquée dans la glycolyse. Pour chaque expérimentation, le ou les gènes de référence utilisés étaient sélectionnés en fonction de la stabilité de leur Ct entre les échantillons des différentes conditions expérimentales (Xie et al., 2012). La normalisation par un gène de référence permet de rendre comparable les échantillons en corrigeant les variations d'expression entre les échantillons qui ne seraient pas dû aux différentes conditions expérimentales mais à des variations d'efficacité de la RT-qPCR ou encore à des erreurs de quantification. Le calcul du niveau d'expression relative des gènes se fait selon la méthode comparative  $2^{-\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001) :

$$\Delta Ct_{\text{gène d'intérêt}} = Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{gène de référence}}$$

## 6. Etude du microbiote branchial par métagénomique ciblée

Des analyses du microbiote de l'huître ont été menées dans le but d'évaluer le potentiel effet de LAN sur le microbiote branchial des huîtres qui se définit comme l'ensemble des micro-organismes présents dans un système donné, ici les branchies. Ces analyses ont été réalisées sur des échantillons de branchies et d'eau de mer des bacs d'expérimentation, notamment afin de s'assurer d'une composition taxonomique microbienne différente entre les deux

environnements. La méthode utilisée est la métagénomique ciblée qui consiste à séquencer une région cible de l'ADN total extrait d'un échantillon (Figure 38).



**Figure 38.** Procédure des analyses du microbiote branchial et de l'eau des bacs d'expérimentation par métagénomique ciblée.

### 6.1. Prélèvement et conditionnement des échantillons

A chaque temps de prélèvement, des échantillons de tissu branchial et d'eau des bacs d'expérimentation sont prélevés. Pour les prélèvements de branchies, les huitres sont prélevées et disséquées le plus vite possible les unes après les autres en lumière rouge afin de limiter les biais potentiels de la lumière ou de la dissection sur les tissus. Les 250 mg de tissus prélevés sont ensuite placés dans des tubes Eppendorf stériles de 2 mL. Pour les prélèvements d'eau de mer, l'eau de chaque bac d'expérimentation a été prélevée dans des bouteilles stériles de 1 L. Le contenu de ces bouteilles a ensuite été filtré en triplicats (3 fois 300 mL) sur des membranes stériles de 0.22  $\mu\text{m}$  à l'aide d'une unité de filtration stérile connectée à une pompe manuelle juste après l'échantillonnage (Figure 39). Les filtres et les tubes contenant les branchies sont ensuite stockés à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  immédiatement après le prélèvement pour analyse dans les semaines suivantes.



**Figure 39.** Photographie d'une membrane stérile de 0.22  $\mu\text{m}$  et de l'unité de filtration stérile connectée à la pompe manuelle.

### 6.2. Extraction de l'ADN total

L'extraction de l'ADN total des échantillons de branchies est réalisée en suivant le protocole du kit QIAmp<sup>®</sup> PowerFecal<sup>®</sup> Pro DNA. Brièvement, la première étape consiste à broyer les échantillons au FastPrep (MP Biomedicals, USA) à l'aide de billes dans un tampon de lyse. Ensuite, après une centrifugation et l'ajout d'une solution chargée d'éliminer les potentiels inhibiteurs de l'extraction, le lysat est transféré sur une colonne d'affinité puis centrifugé : l'ADN est retenu sur la colonne. Ensuite, des étapes de lavage sont réalisées suivies d'une étape d'élution à l'aide d'eau *Nuclease Free*. L'ADN extrait est ensuite stocké à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

L'extraction de l'ADN total des échantillons d'eau de mer est réalisée en suivant le protocole du kit DNeasy® PowerWater®. Brièvement, la première étape consiste à enrouler les filtres dans un tube contenant des billes et du tampon de lyse puis de les passer au vortex pendant 10 minutes. Ensuite, après une centrifugation et l'ajout d'une solution chargée d'éliminer les potentiels inhibiteurs de l'extraction, le lysat est transféré sur une colonne d'affinité puis centrifugé : l'ADN est retenu sur la colonne. Enfin, des étapes de lavage sont réalisées et suivies d'une étape d'éluion à l'aide d'eau *Nuclease Free*. L'ADN extrait est ensuite stocké à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Pour chaque kit, un contrôle négatif est réalisé, c'est-à-dire que le protocole d'extraction est mené dans un tube ou sur un filtre stérile afin de s'assurer que le kit utilisé n'est pas contaminé.

### 6.3. Réaction de Polymérisation en chaîne (PCR)

A l'issus des extractions, les ADN totaux contenus dans les échantillons comprennent les ADN appartenant aux bactéries mais également aux autres organismes présents tels que les huîtres. Ainsi, l'amplification spécifique de l'ADN bactérien est réalisée par PCR. Le gène choisi est le 16S puisqu'il est universel chez les bactéries mais est également discriminant au niveau de 9 régions variables. La PCR réalisée ici permet d'amplifier la région variable V3-V4 du gène 16S des bactéries à l'aide d'amorces se liant spécifiquement à des régions hautement conservées de part et d'autre de cette région V3-V4. Ainsi, une PCR a été menée sur les échantillons d'ADN issus des branchies et de l'eau de mer ainsi que sur les deux contrôles négatifs des kits d'extraction. Un contrôle négatif de la PCR a été réalisé, ainsi qu'un contrôle positif en utilisant une « Mock » (ZymoBIOMICS™ Microbial Community DNA Standard), une communauté microbienne artificielle de composition connue. Ce contrôle positif et l'ensemble des contrôles négatifs sont essentiels à la fiabilité des résultats (Hornung et al., 2019).

Brièvement, pour la PCR, à chaque échantillon ( $2.5\text{ }\mu\text{L}$ ) est ajouté  $5\text{ }\mu\text{L}$  de GoScript 5x reaction buffer,  $0.5\text{ }\mu\text{L}$  de PCR nucleotide mix,  $2\text{ }\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ ,  $0.5\text{ }\mu\text{L}$  de chaque amorce ( $10\text{ }\mu\text{M}$ ),  $14.375\text{ }\mu\text{L}$  d'eau *Nuclease Free* et  $0.125\text{ }\mu\text{L}$  de Taq polymérase. Les échantillons sont ensuite soumis à un programme au thermocycleur débutant par  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 3 minutes afin d'activer l'enzyme polymérase. Ensuite 30 cycles de 3 étapes s'enchainent :  $98\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 30 secondes pour dénaturer les doubles brins d'ADN,  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 30 secondes pour l'hybridation des amorces,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 30 secondes pour l'élongation. Enfin une dernière étape de 5 minutes à  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  termine toutes les élongations.

Les produits de cette première PCR sont ensuite purifiés à l'aide de billes magnétiques (élimination des amorces, dNTP et enzymes restants). Des index (séquences courtes permettant d'identifier chaque échantillon après le séquençage) et des adaptateurs Illumina (séquences permettant l'accroche des amplicons sur la lame de verre utilisée pour le séquençage) leur ont également été ajouté à l'aide d'une seconde PCR. Les produits de cette dernière sont ensuite purifiés et quantifiés par fluorimétrie (Biotek). Ces PCR ont été réalisés à la plateforme Genome Transcriptome de Bordeaux ([www.pgtb.cgfb.u-bordeaux.fr](http://www.pgtb.cgfb.u-bordeaux.fr) ; Cestas, France).

#### **6.4. Séquençage**

Le séquençage est réalisé sur des fragments de 450 paires de base (pb) à l'aide de la méthode Illumina MiSeq avec la chimie v2 en 2x250 pb (Fadrosh et al., 2014; Klindworth et al., 2013) par la plateforme Genome Transcriptome de Bordeaux ([www.pgtb.cgfb.u-bordeaux.fr](http://www.pgtb.cgfb.u-bordeaux.fr) ; Cestas, France).

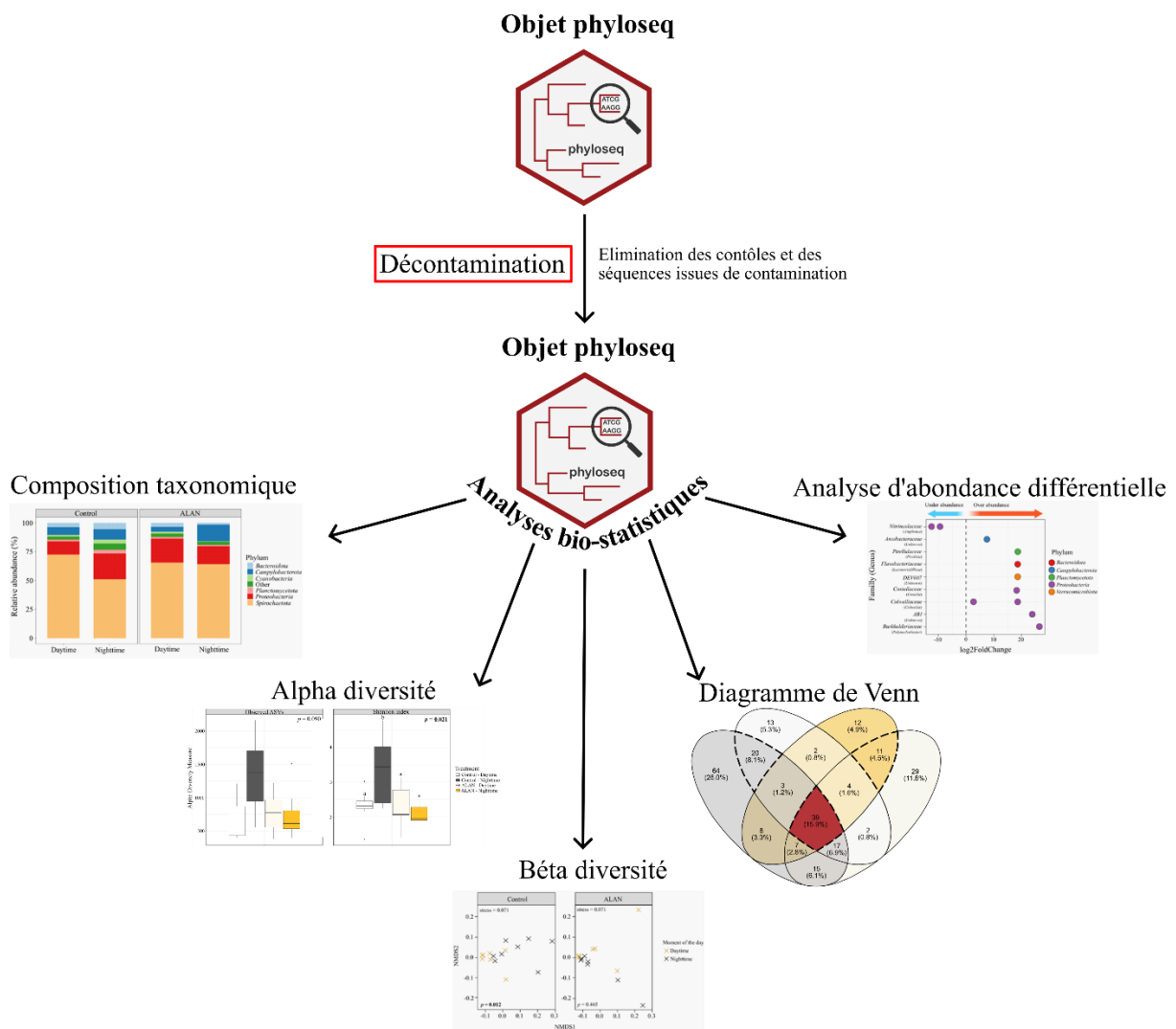
#### **6.5. Traitement bio-informatique**

Le traitement bio-informatique des données de séquençage est réalisé par la plateforme Genome Transcriptome de Bordeaux ([www.pgtb.cgfb.u-bordeaux.fr](http://www.pgtb.cgfb.u-bordeaux.fr) ; Cestas, France) avec le pipeline qu'ils ont développé. Tout d'abord les séquences ne contenant pas les amorces sont éliminées. Pour le reste des séquences, les amorces sont éliminées à l'aide de l'outil Cutadapt (version 2.10). L'ensemble des séquences est ensuite traité avec l'outil DADA2 (version 1.22) (Callahan et al., 2016). Brièvement, les séquences sont filtrées et tronquées selon différents critères : les séquences contenant une base indéterminée sont éliminées, le maximum d'erreurs attendues en *forward* et *reverse* est de 2, la taille des séquences est uniformisée en coupant en positions 230 et 220. Ensuite, un modèle d'erreurs est calculé (fonction `learnErrors`) pour les séquences *forward* et *reverse* et des variants de séquence d'amplicons (ASVs, *Amplicon Sequence Variants*) sont générées. Une table d'ASV est alors construite en comptant le nombre de séquences pour chaque ASV et échantillon. L'étape suivante est une étape de « contigage » qui consiste à fusionner des séquences dont les extrémités se recouvrent par 20 pb minimum afin d'aboutir à une séquence unique. Enfin, les séquences chimériques (séquences différentes fusionnées lors de l'amplification) sont éliminées (fonction `removeBimeraDenovo`). Les ASVs reçoivent ensuite une assignation taxonomique avec la fonction `IdTaxa` en utilisant BLASTn (v. 2.12.0) sur la base de données SilvaSSURef v.138.1 (Quast et al., 2013). Seules les

assignations avec une couverture de 99 % et 97 % d'identité entre la séquence de l'échantillon et la séquence de référence sont conservées.

### 6.6. Traitement bio-statistique

Le traitement bio-statistique est réalisé à l'aide du logiciel R studio (v 4.1.0) à partir d'un objet phyloseq fourni par la plateforme Genome Transcriptome de Bordeaux renfermant l'ensemble des données de séquençage traitées bio-informatiquement. Tout d'abord, il y a une étape de décontamination, suivie de différentes analyses bio-statistiques : composition taxonomique, analyses de diversité, diagramme de Venn, analyse d'abondance différentielle (Figure 40).



**Figure 40.** Procédure des analyses bio-statistiques des données du microbiote.

### 6.6.1. La décontamination

La première étape consiste à éliminer du jeu de données les ASVs qui pourraient provenir de contaminations à l'aide du package « decontam » (v 1.14.0) en utilisant la méthode combinée se basant sur la fréquence et la prévalence. La fréquence d'une ou plusieurs ASVs correspond à leur nombre de séquences sur l'ensemble des séquences d'un échantillon. On s'attend à ce que la concentration des ASVs contaminantes reste constante d'un échantillon à l'autre contrairement aux ASVs non contaminantes : plus l'échantillon est concentré, plus la fréquence des ASVs contaminantes diminue alors que celle des non contaminantes est constante. La prévalence correspond au rapport entre le nombre de séquences d'une ASVs dans les contrôles et son nombre de séquences total : dans les contrôles, la prévalence des ASVs contaminantes sera élevée en raison de l'absence d'ADN concurrent comparée aux échantillons (Davis et al., 2018). Le choix du seuil de prévalence se fait en testant différentes valeurs de seuil. On commence par exemple par 0.1 et on regarde à quoi correspondent les ASVs éliminées dans la table d'abondance : est-ce que ce sont des ASVs de bactéries appartenant au milieu marin (on préférera les garder), est-ce que la présence de cette ASV est vraiment importante dans les blancs comparés aux échantillons (on évite d'enlever une ASVs très présente dans les échantillons). Cette méthode a conduit à l'élimination d'un certain nombre d'ASVs et X autres ASVs supplémentaires peuvent être éliminées manuellement car elles sont largement présentes dans les contrôles (vérifier dans la table d'abondance). Ensuite, une filtration taxonomique a permis d'éliminer les rangs taxonomiques non souhaités : les *Archaea* et les *Eukaryota* au niveau du règne, les *Chloroplastes* au niveau de l'ordre (qui peuvent provenir des microalgues utilisées pour nourrir les huitres), et les ASVs non affiliées au niveau du règne et du phylum. Les contrôles négatifs et positifs sont ensuite éliminés du jeu de données.

### 6.6.2. Composition taxonomique des échantillons

La composition taxonomique des échantillons est étudiée à l'aide du package « phyloseq » (v. 1.38.0). Les résultats indiquent l'abondance relative des phyla ayant une prévalence supérieure à 1 %, les autres sont regroupés sous le terme « *Other* ». Ces abondances relatives peuvent être calculées pour les phyla de chaque échantillon ou pour les phyla de chaque condition, environnement ou moment de la journée (jour / nuit). Ce calcul d'abondances relatives peut également être fait à des rangs taxonomiques inférieurs.

### 6.6.3. Analyses de biodiversité

Les analyses de biodiversité sont réalisées à deux niveaux (alpha diversité et bêta diversité) à l'aide des packages « phyloseq » (v. 1.38.0) et « vegan » (v. 2.6-4) (McMurdie and Holmes, 2013; Oksanen et al., 2008). L'alpha diversité correspond à la diversité bactérienne au sein de chaque échantillon, et a été évaluée à l'aide de deux indices : le nombre d'ASVs observées et l'indice de Shannon, reflétant le nombre d'ASVs observées ainsi que leurs abondances relatives. La bêta diversité correspond à la diversité bactérienne entre les échantillons, dont l'analyse nécessite une normalisation des données par raréfaction qui consiste à normaliser des échantillons de tailles différentes en sous-échantillonnant chacun à un seuil commun, résultant en une taille commune. Les analyses de bêta diversité sont réalisées sur les distances « *Weighted Unifrac* » et les résultats sont visualisés par un positionnement multidimensionnel non métrique (*non-metric multidimensional scaling*, NMDS). Les groupes d'échantillons sont comparés en utilisant le test de permutation non paramétrique PERMANOVA (*permutational multivariable analyses of variance*) avec la fonction Adonis du package « vegan » (Martinez Arbizu, 2017). Une différence est considérée significative lorsque  $p < 0.05$ .

### 6.6.4. Diagramme de Venn

Le diagramme de Venn indique le nombre d'ASVs spécifiques ou partagées entre les conditions. Il est généré par le package « ggvenn » (v. 0.1.10) en utilisant les ASVs dont l'abondance relative est supérieure à 0.1 %.

### 6.6.5. Analyse d'abondance différentielle

L'analyse d'abondance différentielle consiste à mettre en évidence statistiquement la surabondance ou la sous-abondance relative d'ASVs dans une condition par rapport à une autre. Cette analyse est réalisée à l'aide du package « DESeq2 » (v. 1.34.0). Pour chaque ASV, cette analyse indique s'il y a une différence d'abondance relative significative ( $p$ -value ajustée  $< 0.05$ ) entre deux conditions et également à quel point l'abondance relative est plus élevée dans une condition comparée à une autre ( $\log_2$ fold).



# **Chapitre III**

## **Effet de l'intensité de la photophase sur l'entraînement du rythme journalier de l'huitre *C. gigas*.**

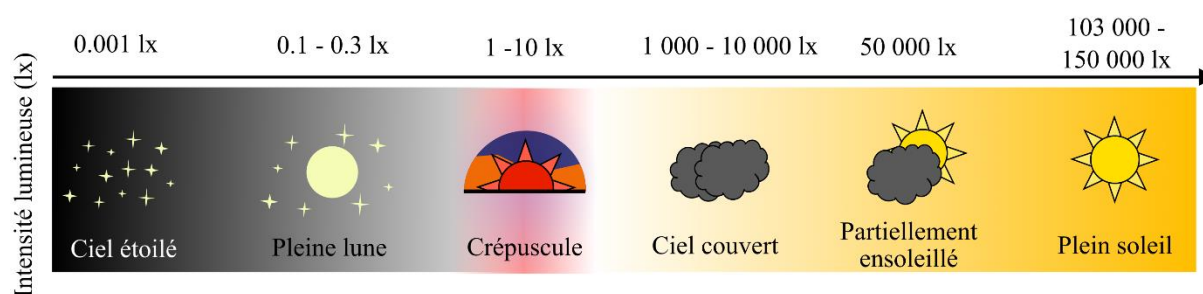
1. Introduction.....	74
2. Matériels et méthodes.....	75
3. Résultats.....	79
4. Discussion et conclusion.....	84
5. Références.....	85
6. Annexes.....	88

## 1. Introduction

Avant d'évaluer l'impact de LAN sur le rythme journalier de l'huitre, il est important de caractériser ce dernier. L'existence du rythme journalier et plus globalement de rythmes biologiques a été mise en évidence chez *C. gigas*, un organisme clé des écosystèmes côtiers soumis à différents cycles environnementaux tels que les cycles lumineux. Malgré l'absence de structure visuelle, ce bivalve est capable de percevoir la luminosité ambiante à de faibles intensités, telles que celles de la lune ainsi que leurs variations (Payton and Tran, 2019). Cet environnement lumineux peut être perçu par l'huitre à l'aide de photorécepteurs non associés à des structures visuelles et présents dans chaque cellule (Falcon et al., 2020). Chez *C. gigas*, des photorécepteurs non visuels ont été identifiés : le cryptochrome 1, impliqué dans la machinerie moléculaire de l'horloge endogène, ainsi que trois rhodopsines appartenant à la grande famille des opsines (Cronin and Johnsen, 2016; Perrigault and Tran, 2017; Tran et al., 2015). Cette perception de son environnement lumineux et ses variations permet à l'huitre de synchroniser son horloge interne et donc son comportement valvaire et ses processus physiologiques avec les cycles lumineux journaliers, lunaires et annuels (Mat et al., 2012; Payton et al., 2017a; Payton and Tran, 2019). Ces rythmes biologiques permettent à l'huitre et aux organismes en général d'être complètement adaptés à leur environnement et d'anticiper ses changements (Bell-Pedersen et al., 2005; Cermakian and Sassone-Corsi, 2000; Partch et al., 2014). A une échelle plus large, les rythmes biologiques coordonnent également les interactions intra et inter spécifiques, assurant la stabilité des écosystèmes (Helm et al., 2017).

Dans ce travail, nous nous intéressons au rythme comportemental journalier de *C. gigas*, généré par son horloge interne (Perrigault and Tran, 2017). Ce rythme est qualifié de plastique, permettant aux huitres de s'adapter facilement et rapidement à de nouveaux environnements (Mat et al., 2012). Il est également caractérisé comme étant dual, ce qui se traduit par le fait que les huitres ont un comportement nocturne en hiver et automne et un comportement diurne au printemps et en été (Mat et al., 2012; Payton et al., 2017a). Cette caractérisation du rythme journalier de *C. gigas* a précédemment été menée notamment au laboratoire en exposant les huitres à une intensité constante d'environ 1 000 lx (correspondant en irradiance à une gamme d'intensités comprise entre 20 et 26  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , selon les expériences) pendant la photophase (période diurne) et à l'obscurité complète pendant la scotophase (période nocturne). Dans ce premier chapitre, avant d'évaluer les potentiels effets négatifs de LAN sur le rythme journalier de l'huitre, l'entraînement de ce dernier sera caractérisé en fonction de l'intensité lumineuse de la photophase. Le but ici est de déterminer quelle est la gamme d'intensité lumineuse optimale

pour entrainer le rythme comportemental journalier de *C. gigas*. Pour cela, les huitres ont été exposées à différentes intensités de photophase, allant de 1 à 10 000 lx. Ces intensités lumineuses sont des intensités réalistes en milieu naturel : l'intensité la plus importante correspond à celle perçue lorsque le ciel est légèrement couvert, et la plus basse correspond à l'intensité lumineuse du crépuscule (Figure 41).



**Figure 41.** Valeurs d'intensités lumineuses naturelles tirées de Rich and Longcore (2006).

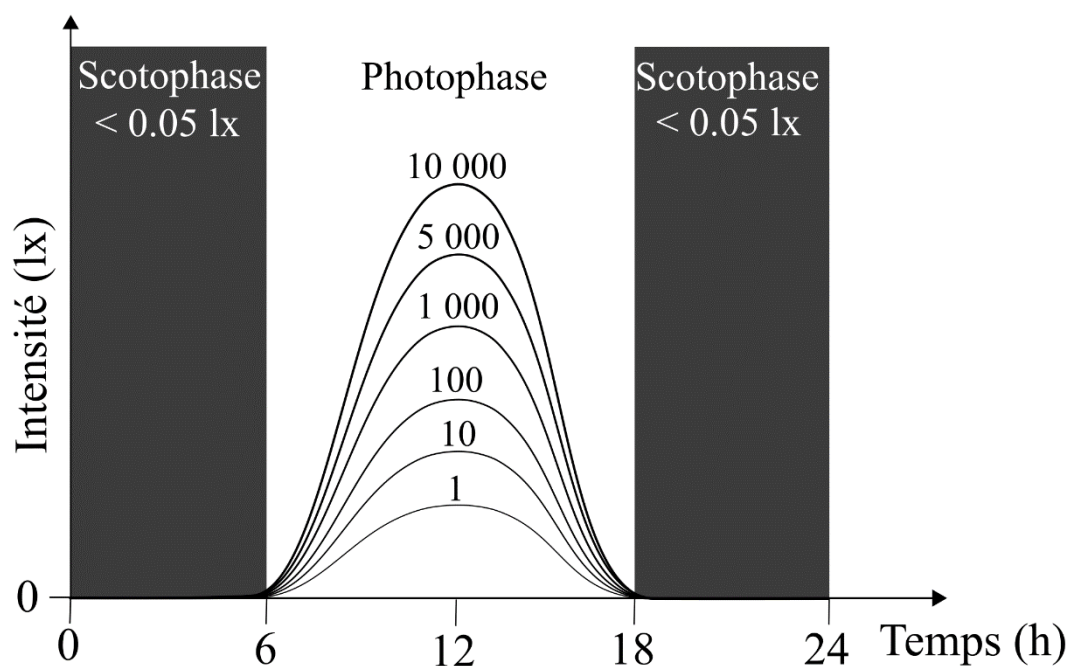
Une première hypothèse de ce travail est que le rythme comportemental journalier de l'huitre peut être entraîné par chacune des intensités lumineuses testées, mais qu'il sera plus ou moins robuste selon l'intensité. Le but est ici de trouver un optimum d'intensité lumineuse pour avoir le rythme le plus robuste. Une seconde hypothèse est que ce rythme serait d'autant moins marqué que la différence d'intensité entre la photophase et la scotophase est réduite.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Protocole expérimental

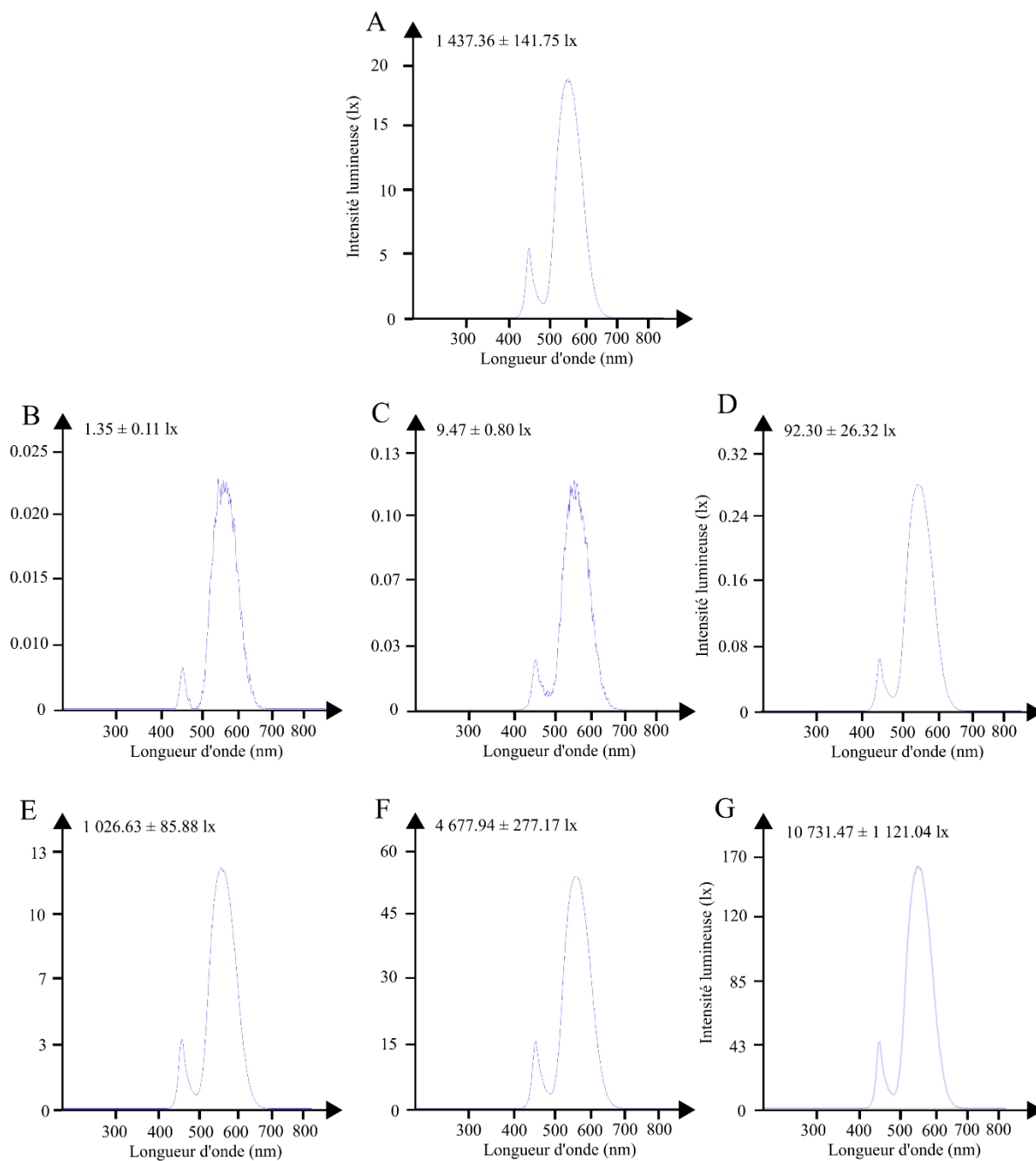
Les expérimentations se sont déroulées d'avril à mai 2022 à la station marine d'Arcachon sur 14 huitres ( $87.0 \pm 2.3$  mm de longueur de la coquille ;  $45.8 \pm 1.4$  mm de largeur de la coquille ; moyenne  $\pm$  erreur standard) venant d'un ostréiculteur du bassin d'Arcachon. L'expérimentation a été réalisée en circuit ouvert dans des bacs (Long. x Larg. x H : 74.8 x 54.8 x 40.8 mm) continuellement alimentés en eau de mer provenant directement du bassin. Cette eau était filtrée ( $< 1 \mu\text{m}$ ), oxygénée et sa température était régulée ( $T = 15.9 \pm 0.1$  °C). Les huitres n'ont pas été nourries pendant toute la durée des expérimentations. Afin d'éviter toutes perturbations du comportement des huitres, les bacs étaient placés dans une pièce isolée sur une paillasse équipée d'un système antivibration (Figure 17). Les huitres étaient soumises à une photopériode L : D 12 : 12 avec la photophase allant de 6:00 à 18:00 h (tous les temps sont notés

en UTC + 2) (Figure 42). Pendant cette photophase, l'intensité lumineuse variait graduellement afin de mimer le cycle naturel de la lumière à l'aide de barres de LEDs programmables (MH3SP3 DSunY ; Figure 18) en lumière blanche (413–688 nm avec un pic à 551 nm). L'intensité maximale était atteinte entre 11:30 et 12:30 h (Figure 42).



**Figure 42.** Lumière journalière pendant les 6 jours d'exposition à différentes intensités de la photophase : 1, 10, 100, 1 000, 5 000 et 10 000 lx.

Pendant la phase d'acclimatation, l'intensité maximale était de  $1\,437.36 \pm 141.75$  lx (moyenne  $\pm$  erreur standard) (Tableau 2; Figure 43A), intensité réaliste qui appartient à une gamme d'intensité lumineuse d'un ciel couvert. Après 8 jours d'acclimatation au dispositif expérimental, six conditions se sont succédées, chacune durant 6 jours et caractérisée par une intensité maximale de photophase différente (Tableau 2) : 1 lx (Figure 43B), 10 lx (Figure 43C), 100 lx (Figure 43D), 1 000 lx (Figure 43E), 5 000 lx (Figure 43F) et 10 000 lx (Figure 43G). Ces intensités lumineuses ont été mesurées à cinq positions dans le bac (Figure 23) à l'aide d'un spectroradiomètre portable (Blue-Wave UVN-100, StellarNet Inc. ; Figure 21).



**Figure 43.** Spectres et valeurs moyennes de l'intensité lumineuse de la photophase pendant la phase d'acclimatation (A), l'exposition à 10 000 (B), 5 000 (C), 1 000 (D), 100 (E), 10 (F) et 1 (G) lx.

**Tableau 2.** Valeurs des intensités maximales pendant la photophase testées mesurées sous l'eau à cinq position dans le bac d'expérimentation et valeurs d'intensité moyenne  $\pm$  l'erreur standard en lx.

Position dans le bac	Intensité lumineuse maximale pendant la photophase (lx)						
	Acclimatation	1	10	100	1 000	5 000	10 000
1	1 741.3	1.6	11.8	194.2	1 164.4	5 072.6	14 526.3
2	1 508.9	1.2	7.9	88.6	1 233.0	5 279.2	11 637.1
3	1 088.1	1.7	9.4	59.1	843.7	4 138.8	8 795.3
4	1 122.5	1.2	10.8	48.8	805.5	3 890.9	8 266.6
5	1 726.0	1.1	7.6	70.8	1 086.5	5 008.2	10 432.0
<b>Mean <math>\pm</math> SE</b>	<b>1 437.4 <math>\pm</math> 141.8</b>	<b>1.4 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>9.5 <math>\pm</math> 0.8</b>	<b>92.3 <math>\pm</math> 26.3</b>	<b>1 026.6 <math>\pm</math> 85.9</b>	<b>4 677.9 <math>\pm</math> 277.2</b>	<b>10 731.5 <math>\pm</math> 1 121.0</b>

Les intensités lumineuses en irradiance ont également été mesurées à l'aide d'un radiomètre portable (MICRO Class, Profiling (in-water), E (irradiance) PAR sensor, Biospherical Instrument Inc.) (Figure 24). Les valeurs d'illuminances de 1, 10, 100, 1 000, 5 000 et 10 000 lx correspondent à des valeurs d'irradiance respectivement de 0.04, 0.13, 2.29, 23.74, 91.30 et 170.60  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ . Pour l'acclimatation, la valeur d'irradiance correspondante est de 28.99  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ . Pendant la scotophase, l'intensité lumineuse était inférieure à 0.05 lx (limite de détection du spectroradiomètre) et considérée comme l'obscurité complète (Figure 42). Ces conditions expérimentales ont été menées les unes à la suite des autres sur un même lot de 14 huitres, dont le comportement valvaire a été mesuré continuellement.

## 2.2. Etude du comportement valvaire

L'activité valvaire des huitres a été mesurée à l'aide de la valvométrie HFNI, utilisant deux électroaimants collés de part et d'autre de la coquille de chaque huitre étudiée (Andrade et al., 2016). Un courant électromagnétique est alors généré entre ces deux électrodes permettant de mesurer l'activité valvaire des huitres. Les données sont ensuite traitées à l'aide du logiciel Labview 8.0 (National Instrument, Austin, TX, USA). Pour plus de détails, voir le chapitre II.3.

## 2.3. Analyses chronobiologiques

Les analyses chronobiologiques sont menées sur les données de VOD des huitres à l'aide du logiciel Time Series Analysis Serie Cosinor 8.0 (Expert Soft Technologies). La procédure suivie pour réaliser ces analyses chronobiologiques est détaillée dans le chapitre II.4. Brièvement, après avoir évalué la qualité des données, le périodogramme de Lomb et Scargle

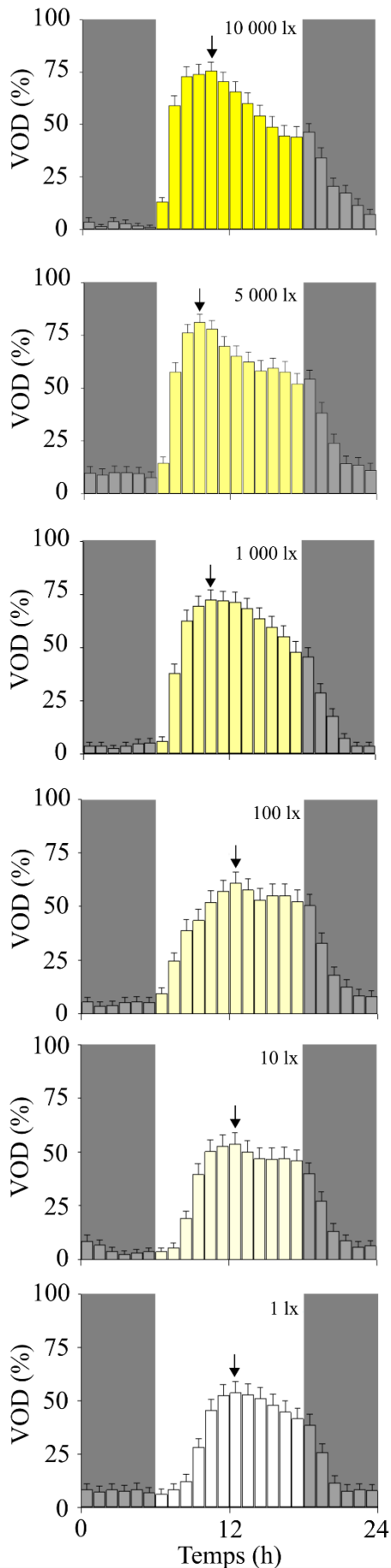
(analyse spectrale) est utilisé pour rechercher une périodicité significative ( $p > 0.95$ ) au sein des données de VOD (Gouthière and Mauvieux, 2003; Scargle, 1982). La rythmicité des données est ensuite modélisée par le modèle Cosinor dont, pour une période donnée, l'équation du modèle s'écrit :  $Y(t) = A \cos\left(\frac{2\pi t}{\tau} + \phi\right) + M + \varepsilon(t)$  (Bingham et al., 1982). Ce modèle permet d'obtenir des paramètres caractérisant le rythme : l'amplitude, l'acrophase, le méso et le *percent rhythm* (c.-à-d. la force du rythme) (Gouthiere et al., 2005a).

#### **2.4. Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été menées en utilisant le logiciel SigmaPlot (version 13.0; Systat Software, USA). Des ANOVA à un facteur sont menées pour les comparaisons multiples après avoir remplis les prérequis (normalité des données, homogénéité des variances). Si ces prérequis ne sont pas remplis, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis est appliqué. Dans le cas où des différences significatives sont trouvées, un test de Student-Newman-Keuls est utilisé pour les comparaisons deux à deux. Pour l'ensemble de ces tests, une différence est considérée significative lorsque  $p < 0.05$ .

### **3. Résultats**

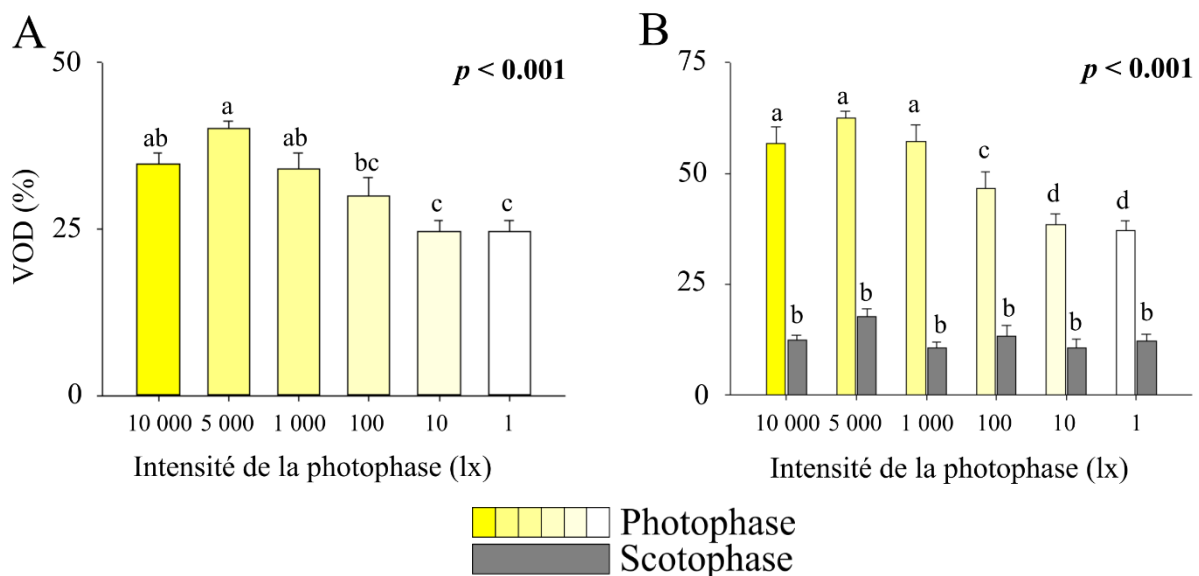
La Figure 44 représente le profil comportemental journalier moyen des huitres exposées à différentes intensités maximales de photophase, allant de 1 à 10 000 lx. L'activité des huitres est plus importante pendant la photophase, quelle que soit son intensité, révélant un comportement diurne. Leur pic d'activité se produit également pendant la photophase, entre 12 et 13 h lorsque son intensité maximale est de 1 à 100 lx et il est avancé de 1 à 3 h à partir de l'intensité 1 000 lx.



**Figure 44.** Profils comportementaux journaliers des huitres ( $n = 14$  huitres) exposées aux différentes intensités maximales de photophase (10 000, 5 000, 1 000, 100, 10, 1 lx). Les histogrammes représentent les données moyennes  $\pm$  l'erreur standard ( $n = 6$  jours). Les fonds blancs indiquent la photophase et les fonds gris indiquent la scotophase. Les flèches indiquent le pic de VOD pendant la journée.



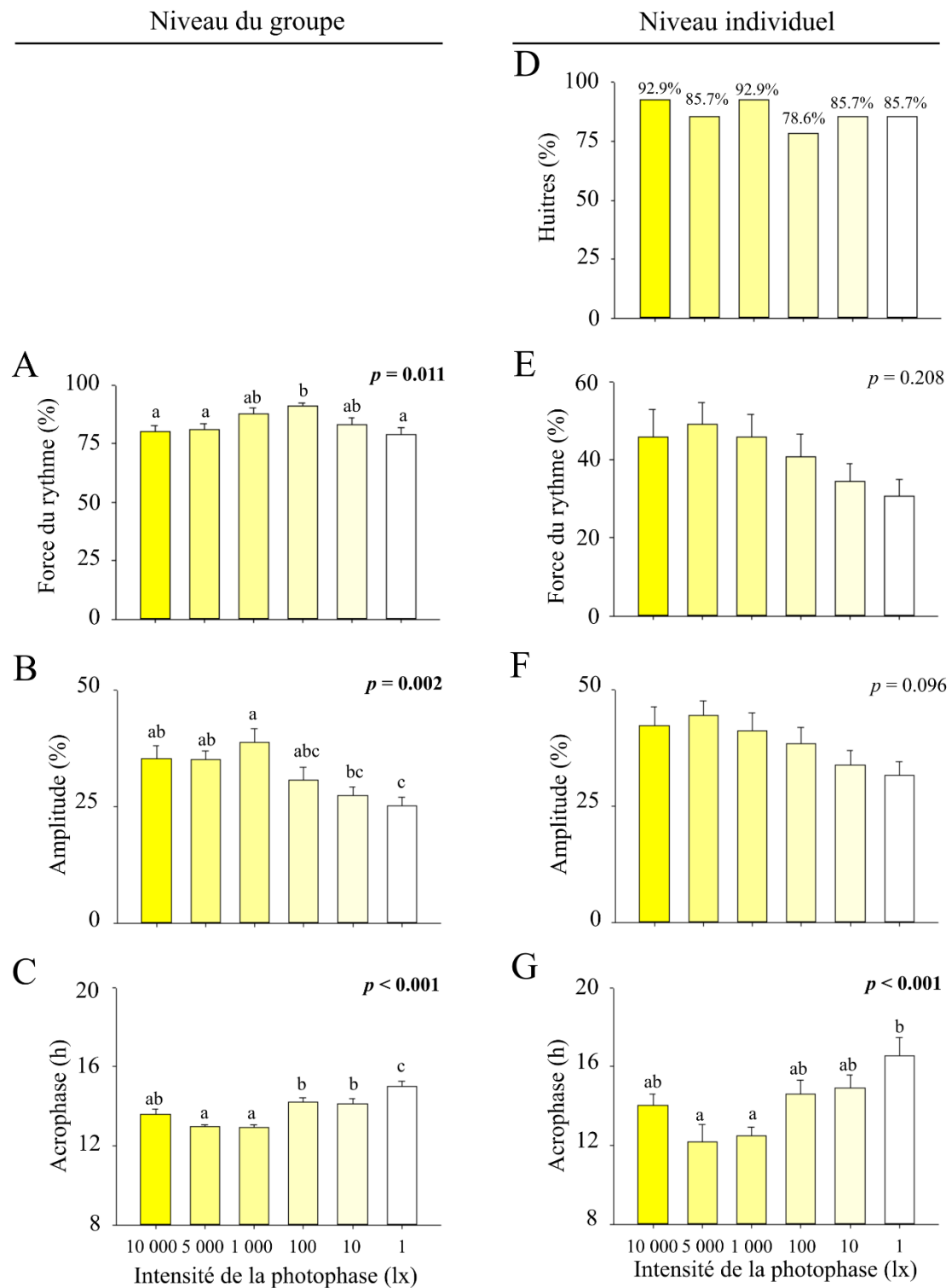
Les analyses statistiques de la VOD moyenne journalière montrent que celle-ci diminue avec la diminution de l'intensité de la photophase à partir de 100 lx et est significativement plus faible lorsque les huitres sont exposées à 10 et 1 lx comparé aux intensités 1 000, 5 000 et 10 000 lx (Figure 45A ;  $p < 0.001$ ). La Figure 45B montre la VOD moyenne pendant la photophase et la scotophase. Les résultats indiquent que les huitres ont une activité significativement supérieure pendant la photophase, révélant un comportement diurne quelle que soit l'intensité de la photophase. Cette activité diminue significativement pour une intensité de 100 lx, et de façon plus importante lorsque les huitres sont exposées à 10 et 1 lx ( $p < 0.001$ ). Alors que la VOD moyenne pendant la scotophase ne varie pas significativement, la différence de VOD entre la photophase et la scotophase diminue significativement avec la diminution de l'intensité de la photophase.



**Figure 45.** Effet de l'intensité lumineuse de la photophase sur (A) la VOD moyenne journalière et (B) la VOD moyenne pendant la photophase et la scotophase. Les histogrammes représentent les données moyennes  $\pm$  l'erreur standard ( $n = 6$  jours). Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les conditions ( $p < 0.05$ ).

La Figure 46 révèle les résultats des analyses chronobiologiques caractérisant l'effet de l'intensité de la photophase sur le rythme journalier comportemental de l'huitre au niveau du groupe et individuel (les résultats sont détaillés dans l'Annexe 1 et l'Annexe 2). Au niveau du groupe, la force du rythme journalier comportemental (*percent rhythm*) est élevée pour chacune des conditions testées puisqu'elle dépasse les 75 %. Il est observé que cette force à une intensité

de 100 lx est significativement supérieure à celle des conditions 10 000, 5 000 et 1 lx, mais aucune tendance nette n'est observée (Figure 46A ;  $p = 0.011$ ). La Figure 46B indique une diminution significative de l'amplitude du rythme lorsque les huitres sont exposées à une photophase de 10 lx, comparés à celles exposées à une intensité de 1 000 lx. Cette diminution est d'autant plus importante lorsque l'intensité de la photophase est de 1 lx comparé à 10 000, 5 000 et 1 000 lx ( $p = 0.002$ ). Concernant l'acrophase du rythme journalier des huitres, celle-ci est significativement retardée à l'intensité 1 lx comparé aux intensités 1 000 et 5 000 lx (Figure 46C ;  $p < 0.001$ ). Au niveau individuel, le pourcentage d'huitres exprimant un rythme comportemental journalier est compris entre 78 et 93 %, quelle que soit l'intensité de la photophase, sans qu'aucune tendance ne soit observée (Figure 46D). Ensuite, la Figure 46E montre une tendance à la diminution de la force du rythme journalier avec la diminution de l'intensité de la photophase ( $p = 0.208$ ). La même tendance non significative est observée pour l'amplitude du rythme (Figure 46F ;  $p = 0.173$ ). Enfin, l'acrophase du rythme journalier au niveau individuel a tendance à être retardée avec la diminution de l'intensité de la photophase (Figure 46G ;  $p < 0.001$ ).



**Figure 46.** Effet de l'intensité de la photophase au niveau du groupe sur (A) la force du rythme, (B) l'amplitude du rythme et (C) l'acrophase du rythme. Effet de l'intensité de la photophase sur (D) le pourcentage d'huitres ayant un rythme journalier. Effet de l'intensité de la photophase chez les individus journalier sur (E) la force du rythme, (B) l'amplitude du rythme et (C) l'acrophase du rythme. Les histogrammes représentent les données moyennes  $\pm$  l'erreur standard. Pour les figures A à C, l'erreur standard montre la variabilité journalière des paramètres du rythme au niveau du groupe ( $n = 6$  jours). Pour les figures D à G, l'erreur standard montre la variabilité individuelle ( $n = 13-11$  huitres).

#### 4. Discussion et conclusion

Ce travail révèle que chaque intensité lumineuse maximale de photophase testée (de 1 à 10 000 lx) peut entraîner le rythme comportemental journalier très marqué de *C. gigas*, qui est caractérisé par une activité valvaire significativement plus importante pendant la journée. Chez l'huitre, ce comportement diurne est notamment caractéristique du printemps, période à laquelle les expérimentations se sont déroulées. De précédentes études indiquent que le rythme journalier de *C. gigas* est dual, ce qui se traduit par le fait que les huitres ont un comportement nocturne en hiver et automne et un comportement diurne au printemps et en été. Cette alternance annuelle aurait une origine endogène et procurerait un avantage majeur aux huitres. Le printemps et l'été sont deux saisons pendant lesquelles le phytoplancton est abondant et également où les besoins énergétiques des huitres sont les plus importants (gamétogénèse, croissance). Ainsi, avoir un comportement diurne lorsque les jours sont longs présente l'avantage de consommer un maximum de nourriture (Enríquez-Díaz et al., 2008; Mat et al., 2012; Payton et al., 2017a). Les différentes intensités maximales de photophase testées ne semblent pas impacter le caractère diurne du comportement de *C. gigas*.

Les résultats de cette étude indiquent que, quelle que soit l'intensité maximale de la photophase, les huitres conservent un rythme journalier qui peut donc être entraîné par de fortes (10 000 lx) ou de faibles intensités de photophase (1 lx). De plus, que l'intensité soit forte ou faible, la force du rythme au niveau du groupe et le pourcentage d'huitres ayant un rythme comportemental journalier demeurent élevés. Cependant, malgré le fait que ce rythme journalier soit conservé, la diminution de l'intensité maximale de la photophase influe sur ses caractéristiques. En effet, diminuer cette intensité entraîne une diminution significative de l'activité des huitres. Plus précisément, cette diminution a lieu uniquement pendant la photophase aux intensités 100, 10 et 1 lx. Ainsi ces résultats indiquent qu'à partir de 100 lx, diminuer la différence d'intensité maximale entre la photophase et la scotophase diminue également la différence d'activité entre ces deux périodes de la journée. De plus, diminuer l'intensité maximale de la photophase entraîne une diminution de la force du rythme et de son amplitude au niveau individuel, ainsi qu'une diminution significative de l'amplitude du rythme au niveau du groupe et un décalage de l'acrophase avec un pic d'activité retardé. Ainsi, plus l'intensité maximale de la photophase est importante, plus les paramètres rythmiques seraient forts. Cependant, certains paramètres ont tendance à diminuer lorsque l'intensité maximale de la photophase dépasse 1 000 lx (force du rythme et amplitude au niveau du groupe), et d'autres lorsqu'elle dépasse 5 000 lx (force du rythme et amplitude au niveau individuel). Quant à l'acrophase, elle a tendance à être retardée

lorsque l'intensité maximale de la photophase dépasse les 5 000 lx. Ainsi, contrairement à l'hypothèse de départ, le rythme n'est pas d'autant moins marqué que la différence d'intensité maximale entre la photophase et la scotophase est réduite, mais plutôt le plus marqué lorsque l'intensité lumineuse maximale de la photophase est comprise entre 1 000 et 5 000 lx.

Pour conclure, cette première étude met en évidence que le rythme journalier comportemental de *C. gigas* peut être entraîné par des intensités lumineuses maximales pendant la photophase allant de 1 à 10 000 lx, mais avec des paramètres rythmiques d'autant plus faibles que l'intensité est faible. Le choix de cette intensité lumineuse est primordial lors de l'étude des rythmes biologiques ou de leur perturbation par LAN, mais également dans le cadre l'étude de tout autre fonction physiologique. En effet, les rythmes biologiques coordonnent de nombreux processus physiologiques (prise de nourriture, reproduction, croissance, immunité) entre eux et avec la rythmicité du milieu afin qu'ils soient optimisés, augmentant la fitness des organismes (Gaston et al., 2017; Helm et al., 2017). La suite de ce travail consiste à mettre en évidence les impacts de LAN sur le rythme journalier de *C. gigas*. Ainsi, afin d'évaluer au mieux ces effets, l'intensité maximale pendant la photophase doit être comprise entre 1 000 et 5 000 lx, deux intensités lumineuses testées pour lesquelles le rythme journalier est le plus robuste. Sachant que l'intensité lumineuse d'environ 1 400 lx utilisée à priori pendant la phase d'acclimatation est comprise entre 1 000 et 5 000 lx et correspond à une intensité réaliste (ciel couvert), nous avons choisi d'utiliser cette intensité de 1 400-1 500 lx comme valeur maximale de photophase pour les expérimentations suivantes.

## 5. Références

- Andrade, H., Massabuau, J.-C., Cochrane, S., Ciret, P., Tran, D., Sow, M., Camus, L., 2016. High Frequency Non-invasive (HFNI) Bio-Sensors As a Potential Tool for Marine Monitoring and Assessments. *Front. Mar. Sci.* 3. 10.3389/fmars.2016.00187
- Bell-Pedersen, D., Cassone, V.M., Earnest, D.J., Golden, S.S., Hardin, P.E., Thomas, T.L., Zoran, M.J., 2005. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat. Rev. Genet.* 6(7), 544-556. 10.1038/nrg1633
- Bingham, C., Arbogast, B., Guillaume, G.C., Lee, J.K., Halberg, F., 1982. Inferential statistical methods for estimating and comparing cosinor parameters. *Chronobiologia* 9, 397-439.
- Cermakian, N., Sassone-Corsi, P., 2000. Multilevel regulation of the circadian clock. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1(1), 59-67. 10.1038/35036078

- Cronin, T.W., Johnsen, S., 2016. Extraocular, Non-Visual, and Simple Photoreceptors: An Introduction to the Symposium. *Integr Comp Biol* 56(5), 758-763. 10.1093/icb/icw106
- Enríquez-Díaz, M., Pouvreau, S., Chávez-Villalba, J., Le Pennec, M., 2008. Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquac. Int.* 17(5), 491-506. 10.1007/s10499-008-9219-1
- Falcon, J., Torriglia, A., Attia, D., Vienot, F., Gronfier, C., Behar-Cohen, F., Martinsons, C., Hicks, D., 2020. Exposure to Artificial Light at Night and the Consequences for Flora, Fauna, and Ecosystems. *Front Neurosci* 14, 602796. 10.3389/fnins.2020.602796
- Gaston, K.J., Davies, T.W., Nedelec, S.L., Holt, L.A., 2017. Impacts of Artificial Light at Night on Biological Timings. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 48(1), 49-68. 10.1146/annurev-ecolsys-110316-022745
- Gouthiere, L., Mauvieux, B., Davenne, D., Waterhouse, J., 2005. Complementary methodology in the analysis of rhythmic data, using examples from a complex situation, the rhythmicity of temperature in night shift workers. *Biological Rhythm Research* 36(3), 177-193. 10.1080/09291010400026298
- Gouthière, L., Mauvieux, B., 2003. Etapes essentielles dans l'analyse des rythmes: qualité des données expérimentales, recherche de périodes par analyses spectrales de principes divers, modélisation. XXXVème Congrès Société Francoph Chronobiol, Université de Saint-Etienne.
- Helm, B., Visser, M.E., Schwartz, W., Kronfeld-Schor, N., Gerkema, M., Piersma, T., Bloch, G., 2017. Two sides of a coin: ecological and chronobiological perspectives of timing in the wild. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B., Biol. Sci.* 372(1734). 10.1098/rstb.2016.0246
- Mat, A.M., Massabuau, J.C., Ciret, P., Tran, D., 2012. Evidence for a plastic dual circadian rhythm in the oyster *Crassostrea gigas*. *Chronobiol. Int.* 29(7), 857-867. 10.3109/07420528.2012.699126
- Mat, A.M., Perrigault, M., Massabuau, J.C., Tran, D., 2016. Role and expression of cry1 in the adductor muscle of the oyster *Crassostrea gigas* during daily and tidal valve activity rhythms. *Chronobiol. Int.* 33(8), 949-963. 10.1080/07420528.2016.1181645
- Partch, C.L., Green, C.B., Takahashi, J.S., 2014. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell. Biol.* 24(2), 90-99. 10.1016/j.tcb.2013.07.002

- Payton, L., Sow, M., Massabuau, J.C., Ciret, P., Tran, D., 2017. How annual course of photoperiod shapes seasonal behavior of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. PLoS One 12(10), e0185918. 10.1371/journal.pone.0185918
- Payton, L., Tran, D., 2019. Moonlight cycles synchronize oyster behaviour. Biol. Lett. 15(1), 20180299. 10.1098/rsbl.2018.0299
- Perrigault, M., Tran, D., 2017. Identification of the Molecular Clockwork of the Oyster *Crassostrea gigas*. PLoS One 12(1), e0169790. 10.1371/journal.pone.0169790
- Rich, C., Longcore, T., 2006. Ecological Consequences of Artificial Night Lighting. Island Press.
- Scargle, J.D., 1982. Studies in astronomical time series analysis. II - Statistical aspects of spectral analysis of unevenly spaced data. Astrophys. J. 263. 10.1086/160554

**6. Annexes du chapitre III : Effet de l'intensité de la photophase sur l'entraînement du rythme journalier de l'huitre *C. gigas*.**



Annexe 1. Résultats des analyses chronobiologiques pour les différentes intensités de photophase testées au niveau du groupe. Les paramètres rythmiques sont exprimés par la moyenne  $\pm$  l'erreur standard, où l'erreur standard montre la variabilité journalière (n = 6 jours).

Intensité maximale de la photophase (lx)	Période (h)	<i>Percent Rhythm (%)</i>	Amplitude (%)	Acrophase (h)
10 000	23.90 $\pm$ 0.02	80.10 $\pm$ 2.63	35.30 $\pm$ 2.64	13.58 $\pm$ 0.30
5 000	24.10 $\pm$ 0.02	80.70 $\pm$ 2.48	35.08 $\pm$ 1.90	12.97 $\pm$ 0.09
1 000	24.20 $\pm$ 0.01	87.80 $\pm$ 2.50	38.75 $\pm$ 2.91	12.92 $\pm$ 0.14
100	24.1 $\pm$ 0.01	91.00 $\pm$ 1.28	30.73 $\pm$ 2.74	14.20 $\pm$ 0.22
10	24.2 $\pm$ 0.01	83.20 $\pm$ 2.84	27.40 $\pm$ 1.78	14.14 $\pm$ 0.24
1	23.90 $\pm$ 0.02	78.80 $\pm$ 3.08	25.22 $\pm$ 1.83	14.99 $\pm$ 0.29

10000 lx			5000 lx			1000 lx			100 lx			10 lx			1 lx					
Periode (h)	PR (%)	Amplitude/Acrophase (%) (h)	Periode (h)	PR (%)	Amplitude/Acrophase (%) (h)	Periode (h)	PR (%)	Amplitude/Acrophase (%) (h)	Periode (h)	PR (%)	Amplitude/Acrophase (%) (h)	Periode (h)	PR (%)	Amplitude/Acrophase (%) (h)	Periode (h)	PR (%)	Amplitude/Acrophase (%) (h)			
23.4	48.0	38.8	13.7	24	66.7	55	13.8	42.3	11.9	39.8	37.6	16.1	24	50.7	45.7	14.7	24	29.5	29.8	12.6
23.7	25.8	29.8	13.4	23.9	62.8	52.7	13.1	37.2	12.3	–	–	–	23.9	38.0	35.6	14.0	23.7	37.1	33.3	16.1
23.7	56.3	49.3	14.1	24	50.7	47	13.0	58.7	12.9	19.5	23.4	13.4	24.5	22.4	23	18.7	n.s.	–	–	–
23.1	24.2	30.8	18.3	21.5	21.8	30	4.1	29.8	14.6	–	–	–	n.s.	21.5	28.1	16.3	24.1	26.7	26.9	15.5
23.6	83.2	61.2	14.6	24	75.1	57.5	12.9	48.7	12.4	51.4	42.6	16.2	24	46.1	41	14.1	24	54.0	49	15.0
24.2	24.8	31.9	12.5	22.9	17.9	28.5	16.2	42.7	11.4	60.7	52.4	15.7	23.8	–	–	–	27.3	15.7	27.1	23.7
23.9	78.5	58.8	12.4	24	44.0	41.7	12.2	46.4	13.3	37.4	36.6	13.1	23.9	21.8	26.1	11.7	23.7	26.9	30.6	16.5
23.9	70.1	55.6	13.2	24.2	48.1	45.7	11.7	58.7	13.5	41.8	43	10.3	24.3	46.1	43.9	14.6	23.4	51.9	46.8	18.2
24.3	22.9	30.3	13.5	24.5	39.6	40.8	14.0	31.4	9.4	–	–	–	n.s.	54.8	46.5	15.3	23.5	15.9	24.5	18.5
24.9	35.7	36.1	18.5	12.1	–	–	–	–	–	25.0	32.5	17.1	23.2	15.3	25.5	19.5	24.7	16.6	21.4	12.5
12.1	–	–	–	24.9	31.2	29.5	9.5	21.6	10.4	17.7	17.7	18.5	23.2	21.8	20.4	13.5	19.9	–	–	–
24	84.1	61.3	12.9	24.1	76.2	59.3	13.0	62.5	14.0	84.8	62.8	13.5	24	56.5	48.7	12.6	24.2	52.7	46.8	12.7
23.9	18.6	23.1	12.8	12	–	–	–	26	14.2	19.1	21.3	13.5	24.4	–	–	–	23	15.1	15.7	17.9
24.1	23.4	29.5	12.7	24	53.5	45.1	12.9	29.8	12.1	30.2	32.8	13.3	24.3	18.7	20.9	14.1	22.3	24.9	26.3	19.2

**Annexe 2.** Résultats des analyses chronobiologiques pour les différentes intensités de photophase testées au niveau du individuel (n = 14 huitres). Le tableau indique pour chaque condition : la période des individus rythmiques (les périodes en dehors de la gamme journalière : 24 – 28 h sont en italique), la force du rythme (percent rhythm, PR), l'amplitude et l'acrophase du rythme des individus ayant un rythme journalier. Les rythmes non significatifs sont indiqués par la mention "n.s."

# **Chapitre IV**

## **Effets de la pollution lumineuse nocturne sur le rythme journalier de *C. gigas* en fonction de son intensité**

1. Préambule.....	92
2. Article: <i>Artificial light at night at environmental intensities disrupts daily rhythm of the oyster Crassostrea gigas</i> .....	94
3. Annexes.....	117
4. Conclusion.....	125

## 1. Préambule

L'objectif de ce premier chapitre sur l'effet de LAN chez l'huitre *C. gigas* est de caractériser des réponses en fonction d'une gamme d'intensités lumineuses de LAN. Notamment, dans cette étude, je cherche à déterminer la valeur minimale d'intensité de LAN montrant des effets avérés sur le rythme journalier de l'huitre. Dans le chapitre précédent, j'ai caractérisé la force du rythme journalier en fonction d'une gamme d'intensités lumineuses réalistes d'éclairage pendant la photophase (1 à 10 000 lx) et sans exposition à LAN. Les résultats de cette étude m'ont donc permis de déterminer l'intensité de la photophase pour laquelle le rythme est le plus robuste (~ 1 400 lx), qui a été choisie pour toutes mes expériences suivantes sur LAN.

Le but de ce second chapitre était d'utiliser des intensités réalistes de LAN, auxquelles les huitres peuvent être confrontées dans leur milieu naturel. Ainsi, la gamme d'intensités lumineuses testées ici va de 0.1 à 25 lx avec l'intensité la plus forte étant de l'ordre de celle émise par un parking éclairé et l'intensité la plus faible correspondant à l'intensité naturelle de la lune (pleine lune ~ 0.25 lx) mais également à celle du *skyglow*, la source indirecte de LAN (Figure 4) (Hänel et al., 2018; Rich and Longcore, 2006).

A ce jour aucune étude n'existe sur la réponse des bivalves à LAN en fonction de son intensité lumineuse et notamment en utilisant de faibles intensités (< 1 lx). Les travaux les plus proches sont effectués sur des organismes pourvus d'yeux comme les poissons. Par exemple, chez le poisson *Salvelinus alpinus* l'intensité lumineuse du *skyglow* (0.1 – 0.3 lx), bien que très faible, peut induire des effets néfastes tels que la suppression de l'augmentation de mélatonine pendant la nuit, molécule impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques (Liu et al., 2019). L'impact de plus faibles intensités lumineuses encore a été démontré : chez la perche eurasienne *Perca fluviatilis* une intensité de 0.01 lx entraîne une diminution de la concentration en mélatonine dans l'aquarium (Kupprat et al., 2020). Dans le cadre du travail réalisé ici, 0.1 lx était une des plus faibles intensités lumineuses qui pouvait être mesurée sans biais par le spectrophotomètre utilisé (qui toutefois était un des plus sensibles du marché dans la gamme des spectromètres portables et avec un capteur immergeable) étant donné que sa limite de détection était de 0.05 lx. En plus des intensités lumineuses, la technologie d'éclairage choisie dans l'expérience tend à se rapprocher au maximum des conditions réalistes d'exposition. Pour mimer LAN, des LEDs blanches sont utilisées, un type d'éclairage se répandant massivement et très rapidement pour des raisons économiques et esthétiques (Zissis and Bertoldi, 2018). En effet, en France, le nombre de LEDs vendues pour l'éclairage résidentiel a augmenté de 46 %


de 2016 à 2017 (Zissis et al., 2021). De plus, les LEDs blanches ont un large spectre caractérisé par un pic dans le bleu, dont les longueurs d'onde rendent le *skyglow* plus lumineux, pénètrent plus profondément dans le milieu marin et sont des signaux pour de multiples processus physiologiques (Grubisic et al., 2019; Kaniewska et al., 2015; Leach and Reitzel, 2020; Luginbuhl et al., 2014; Rivas et al., 2015).

Enfin, l'hypothèse testée ici est que la présence de LAN peut masquer ou en tout cas perturber la perception de l'alternance jour / nuit par les huitres et donc la synchronisation de leur horloge interne et de leur comportement avec le cycle journalier de la lumière. De plus, il est suspecté que ces effets surviennent de manière intensité-dépendante. Cette étude a donc évalué l'effet de LAN en utilisant la technologie LED sur le rythme journalier des huitres à deux niveaux : au niveau comportemental et au niveau moléculaire en fonction d'une gamme d'intensités de LAN allant de 0.1 à 25 lx.

## 2. Article: Artificial light at night at environmental intensities disrupts daily rhythm of the oyster *Crassostrea gigas*

Marine Pollution Bulletin 191 (2023) 114850

---




ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

**Marine Pollution Bulletin**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/marpolbul](http://www.elsevier.com/locate/marpolbul)




---

### Artificial light at night at environmental intensities disrupts daily rhythm of the oyster *Crassostrea gigas*

Audrey Botté, Laura Payton, Damien Tran<sup>\*</sup>

Univ. Bordeaux, CNRS, Bordeaux INP, EPOC, UMR 5805, F-33120 Arcachon, France



---

**ARTICLE INFO**

**Keywords:**  
 ALAN  
 Biological rhythm  
 Circadian clock  
*Crassostrea gigas*  
 Behavior

**ABSTRACT**

Artificial Light At Night (ALAN) masks the natural light cycles and thus can disturb the synchronization of organisms' biological rhythms with their environment. Although coastlines are highly exposed to this growing threat, studies concerning the impacts of ALAN on coastal organisms remain scarce. In this study, we investigated the ALAN exposure effects at environmentally realistic intensities (0.1, 1, 10, 25 lx) on the oyster *Crassostrea gigas*, a sessile bivalve subject to light pollution on shores. We focused on the effects on oyster's daily rhythm at behavioral and molecular levels. Our results showed that ALAN disrupts the oyster's daily rhythm by increasing valve activity and annihilating day / night differences of expression of circadian clock and clock-associated genes. ALAN effects occur starting from 0.1 lx, in the range of artificial skyglow illuminances. We concluded that realistic ALAN exposure affects oysters' biological rhythm, which could lead to severe physiological and ecological consequences.

---

**1. Introduction**

Natural light cycles play an important role in biological timings (Gaston et al., 2017). Indeed, predictable variations of light intensity over a day, a month, or a year are used as signals by organisms to synchronize their biological rhythms with their environment (Bradshaw and Holzapfel, 2010; Gaston et al., 2017). These biological rhythms are ubiquitous and find their origin in each cell with an endogenous clock, which uses environmental cues, such as natural light cycles, to synchronize organisms' physiological processes and behavior with their environment. This synchronization enables organisms to be fully adapted to their environment and to anticipate its changes (Cermakian and Sassone-Corsi, 2000; Partch et al., 2014). However, Artificial Light At Night (ALAN) affects the natural nocturnal lighting levels, which can disrupt the organisms' perception of natural variations of light, and affect organisms' biological rhythms (daily, lunar, seasonal) and their physiology (Falchi et al., 2011; Gaston and Bennie, 2014). For example, it can disrupt migration, reproduction, foraging, or prey/predator interactions (Davies et al., 2014; Gaston et al., 2017; Longcore and Rich, 2004; Navara and Nelson, 2007). These ALAN's effects on organisms' physiology and behavior occur in a large range of species, including diurnal ones, and at low intensities (below 1 lx) (Sanders et al., 2021). Thus ALAN can have consequences at the individual, population, and

ecosystem scale. Nocturnal artificial lighting affects the whole world (Falchi et al., 2016) and spreads fast with a 6 % increase in the sky luminosity per year (Hölker et al., 2010). The negative effects of ALAN on organism behavior or physiology become increasingly studied over the years (Davies and Smyth, 2018) but they remain widely investigated for terrestrial organisms. However, ALAN effects on marine organisms, and especially benthic organisms, recently received more attention. Studying the impacts of ALAN on species living in coastal ecosystems is of great importance considering that already 22.2 % of the world's coasts are exposed to ALAN as well as 35 % of marine protected areas (Davies et al., 2014, 2016), percentages that certainly will increase since the human population living in coastal areas is predicted to grow (Kummu et al., 2016). Furthermore, ALAN's negative effects could be worsened by the increasing use of LED (Light-Emitting Diode) in public lighting (Gaston, 2018; Zisis and Bertoldi, 2018). Indeed, LED lights spectrum contains more short-wavelength than spectra of other lighting types such as HPS (High-Pressure Sodium) lighting (Bierman, 2012; Falchi et al., 2011; Longcore et al., 2018; Luginbuhl et al., 2014). Considering that short-wavelength, such as blue wavelength, go further into seawater (Davies et al., 2014; Grubisic et al., 2019) and that marine organisms would be highly sensitive to blue wavelength (Grubisic, 2018), the negative effects of ALAN could be amplified on the coastal fauna. Therefore, ALAN becomes over the years a growing threat to

---

<sup>\*</sup> Corresponding author.  
 E-mail address: [damien.tran@u-bordeaux.fr](mailto:damien.tran@u-bordeaux.fr) (D. Tran).  
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114850>

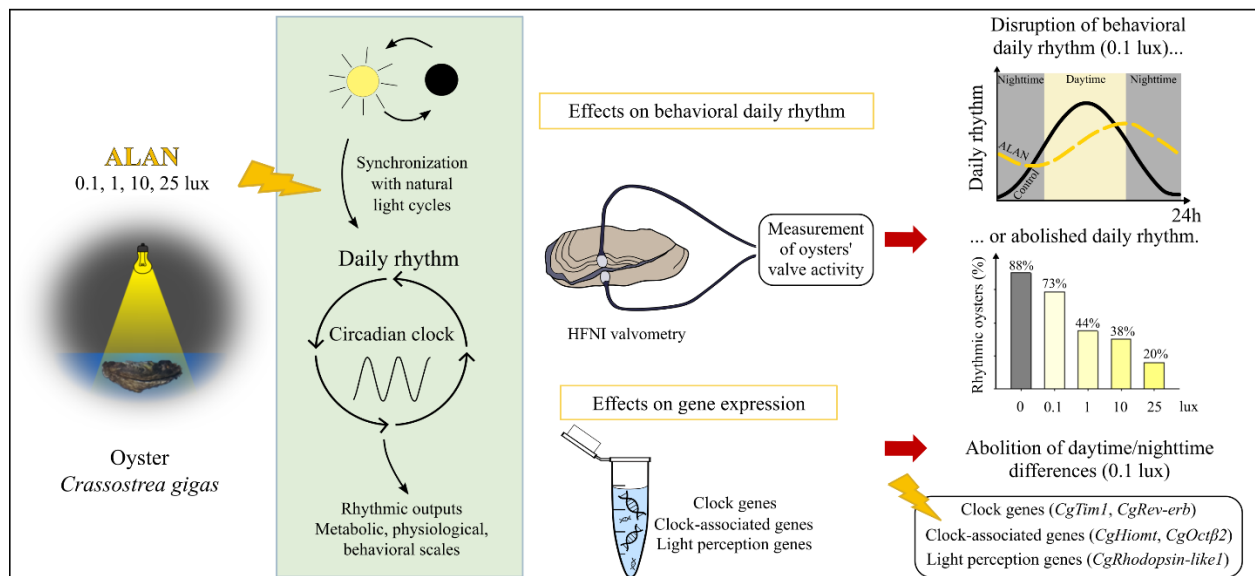
Botté, A., Payton, L., Tran, D., 2023a. Artificial light at night at environmental intensities disrupts daily rhythm of the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Pollut. Bull.* 191. 10.1016/j.marpolbul.2023.114850

## Abstract

Artificial Light At Night (ALAN) masks the natural light cycles and thus can disturb the synchronization of organisms' biological rhythms with their environment. Although coastlines are highly exposed to this growing threat, studies concerning the impacts of ALAN on coastal organisms remain scarce. In this study, we investigated the ALAN exposure effects at environmentally realistic intensities (0.1, 1, 10, 25 lx) on the oyster *Crassostrea gigas*, a sessile bivalve subject to light pollution on shores. We focused on the effects on oyster's daily rhythm at behavioral and molecular levels. Our results showed that ALAN disrupts the oyster's daily rhythm by increasing valve activity and annihilating day / night differences of expression of circadian clock and clock-associated genes. ALAN effects occur starting from 0.1 lx, in the range of artificial skyglow illuminances. We concluded that realistic ALAN exposure affects oysters' biological rhythm, which could lead to severe physiological and ecological consequences.

Keywords: ALAN, biological rhythm, circadian clock, *Crassostrea gigas*, behavior

## Graphical abstract



## Introduction

Natural light cycles play an important role in biological timings (Gaston et al., 2017). Indeed, predictable variations of light intensity over a day, a month, or a year are used as signals by organisms to synchronize their biological rhythms with their environment (Bradshaw and Holzapfel, 2010; Gaston et al., 2017). These biological rhythms are ubiquitous and find their origin in each cell with an endogenous clock, which uses environmental cues, such as natural light cycles, to synchronize organisms' physiological processes and behavior with their environment. This synchronization enables organisms to be fully adapted to their environment and to anticipate its changes (Cermakian and Sassone-Corsi, 2000; Partch et al., 2014). However, Artificial Light At Night (ALAN) affects the natural nocturnal lighting levels, which can disrupt the organisms' perception of natural variations of light, and affect organisms' biological rhythms (daily, lunar, seasonal) and their physiology (Falchi et al., 2011; Gaston and Bennie, 2014). For example, it can disrupt migration, reproduction, foraging, or prey/predator interactions (Davies et al., 2014; Gaston et al., 2017; Longcore and Rich, 2004; Navara and Nelson, 2007). These ALAN's effects on organisms' physiology and behavior occur in a large range of species, including diurnal ones, and at low intensities (below 1 lx) (Sanders et al., 2021). Thus ALAN can have consequences at the individual, population, and ecosystem scale. Nocturnal artificial lighting affects the whole world (Falchi et al., 2016) and spreads fast with a 6% increase in the sky luminosity per year (Hölker et al., 2010). The negative effects of ALAN on organism behavior or physiology become increasingly studied over the years (Davies and Smyth, 2018) but they remain widely investigated for terrestrial organisms. However, ALAN effects on marine organisms, and especially benthic organisms, recently received more attention. Studying the impacts of ALAN on species living in coastal ecosystems is of great importance considering that already 22.2 % of the world's coasts are exposed to ALAN as well as 35% of marine protected areas (Davies et al., 2014; Davies et al., 2016), percentages that certainly will increase since the human population living in coastal areas is predicted to grow (Kummu et al., 2016). Furthermore, ALAN's negative effects could be worsened by the increasing use of LED (Light-Emitting Diode) in public lighting (Gaston, 2018; Zisis and Bertoldi, 2018). Indeed, LED lights spectrum contains more short-wavelength than spectra of other lighting types such as HPS (High-Pressure Sodium) lighting (Bierman, 2012; Falchi et al., 2011; Longcore et al., 2018; Luginbuhl et al., 2014). Considering that short-wavelength, such as blue wavelength, go further into seawater (Davies et al., 2014; Grubisic et al., 2019) and that marine organisms would be highly sensitive to blue wavelength (Grubisic, 2018), the



negative effects of ALAN could be amplified on the coastal fauna. Therefore, ALAN becomes over the years a growing threat to marine life.

The oyster *Crassostrea gigas* is a marine bivalve of commercial importance with a large distribution. Oysters are also sessile organisms living in benthic areas, thus inevitably exposed to ALAN through direct or indirect sources of artificial light. The direct sources of lighting on the coast are for example streetlights on a pier, harbors, etc. The indirect source of ALAN is called skyglow, with a lower light intensity but much more spatially extensive than direct lighting. It takes its source mostly in big cities from which artificial lights are diffused into the atmosphere, resulting in a global lightening of the sky at night (Gaston, 2018). Both of these ALAN sources could disrupt oysters' biological rhythms. These oysters' biological rhythms related to daily (Mat et al., 2012), tidal (Tran et al., 2011), lunar (Payton and Tran, 2019), and seasonal (Payton et al., 2017a) natural cycles have already been described. Concerning their daily rhythm, oysters have a plastic endogenous circadian rhythm generated by a molecular clock (Mat et al., 2012; Mat et al., 2014; Payton et al., 2017b; Perrigault and Tran, 2017; Tran et al., 2020a). This plasticity enables oysters to easily adapt to new environments but it also could make them vulnerable to disruption by ALAN, which could have consequences on their physiology and ecology.

The objective of this study is to evaluate the effects of several ALAN intensities encountered in the environment on the daily rhythm of the oyster *C. gigas*. To achieve that, valve behavior rhythm and circadian clock genes expression were studied. We exposed oysters during 7 days to ALAN intensities ranging from 0.1 to 25 lx with the lowest intensity representing a skyglow intensity (Gaston, 2018) and the highest intensity being in the range of direct ALAN due to a lighted parking lot (Rich and Longcore, 2006). We hypothesized that ALAN would disrupt oysters' daily rhythm at the behavioral and molecular levels. We assumed that ALAN exposure disrupts the oysters' circadian clock machinery, impairing the clock's outputs such as clock-associated genes' expression and rhythmic behavior, and may also lead to a direct behavioral response during nighttime. Finally, we hypothesized that some of these effects would occur in an intensity-dependent manner.

## Materials and methods

### *General conditions*

The experiment was conducted from January to April 2021 in the Marine Station of Arcachon on 160 oysters ( $85.8 \pm 0.7$  mm shell length;  $48.4 \pm 0.5$  mm shell width; mean  $\pm$  SE) coming from an oyster's farm source of the Arcachon bay (France). During the acclimation and experimental duration, oysters were placed into tanks (L x W x H: 74.8 x 54.8 x 40.8 mm) continuously supplied with natural seawater from the Arcachon bay, which was filtered ( $< 1\mu\text{m}$ ), oxygenized, and the temperature was monitored ( $T = 15.0 \pm 0.1$  °C). Tanks were placed in an isolated room and equipped with an antivibration bench to minimize external disturbances to animal behavior. The oysters were not fed during the experiment.

### *Experimental protocol*

Oysters were maintained under a L:D 10:14 cycle with daytime from 7:00 to 17:00 h (all times noted in local time, UTC +1) (Fig. S1A). The light intensity during daytime varied gradually to mimic the natural cycle of light using programmable white (413–688 nm, peak at 551 nm; Fig. S2A) LED light bars (MH3SP3 DSunY). The maximum intensity during daytime was  $1473.42 \pm 106.21$  lx (mean  $\pm$  SE) (Tab. S.1) between 11:30 to 12:30 h. After 7 to 9 days of acclimation to the experimental setup, the proper experiment started for a duration of 7 days. There were 5 conditions: a control condition and 4 conditions where oysters were exposed to several ALAN intensities (Tab. S1): 0.1, 1, 10, and 25 lx. In the 4 ALAN conditions, oysters were exposed to ALAN from 17:30 to 6:30 h (Fig. S1B) using white (411–687 nm, peak at 563 nm; Fig. S2B–S2E) LED strips (MiBoxer Mi-Light WL5). Illuminances underwater were measured at five positions in the tank (Fig. S3) using a handheld spectroradiometer (Blue-Wave UVN-100, StellarNet Inc.). The control group was in the complete dark at night, with a light intensity inferior to the detection limit of the spectroradiometer (0.05 lx), mentioned in the study as 0 lx for convenience. For each of the 5 experimental conditions, 32 oysters were placed in the same tank, and the valve activity of 16 of them was continuously measured using a High Frequency–Non Invasive (HFNI) valvometer technology (Andrade et al., 2016). For each experimental conditions, 32 different oysters were used. On the 7<sup>th</sup> day of the experiment, the gill tissue of 8 oysters were sampled during daytime at 12:00 h and during nighttime at 19:00 h and stored in Tri Reagent (Invitrogen) at  $-80$  °C for further molecular analysis.

### *Behavioral measurements*

For valve activity measurement using HFNI valvometer technology, lightweight's electromagnets were glued on each valve of oysters and linked to a valvometer device using flexible wires (Andrade et al., 2016). The electromagnetic current generated between the two electromagnets allows to measure oyster valve activity. For each individual, the signal was recorded every 4.8s. Data were processed using Labview 8.0 (National Instrument, Austin, TX, USA). The study focused on the hourly Valve Opening Duration (VOD) meaning that we determined the percentage of time each individual spent with its valve open for each hour. For example, an individual with its valves open during a whole hour corresponds to a VOD of 100 %, while an individual with its valves closed during one hour corresponds to a VOD of 0 %.

### *Chronobiological analyses*

Chronobiological analysis of the hourly VOD data were performed at groups and individual levels using the software Time Series Analysis Serie Cosinor 8.0 (Expert Soft Technologies). First, data quality was evaluated using the autocorrelation diagram to control the absence of random repartition of data, and the Partial Autocorrelation Function (PACF) calculation to assess the absence of stationary character (Gouthière and Mauvieux, 2003). Then the Lomb and Scargle periodogram was used to search for periodicity in the data (Scargle, 1982). A significant period was accepted for  $p > 0.95$ . Data rhythmicity was then modeled using the Cosinor model, which uses a cosine function calculated by regression (Bingham et al., 1982). For a given period, the model is written as:  $Y(t) = A \cos\left(\frac{2\pi t}{\tau} + \phi\right) + M + \varepsilon(t)$  where A is the amplitude (difference between the average level and the highest value of the rhythm),  $\phi$  the acrophase (the highest value of the rhythm),  $\tau$  the given period (interval between two identical events), M the mesor (average level of the rhythm), and  $\varepsilon(t)$  the relative error. Then the calculated model and the existence of rhythmicity were validated by two tests: the ellipse test had to be rejected, and the probability for the null amplitude hypothesis had to be lower than 0.05. The percent rhythm (PR), a chronobiometric parameter, had been calculated and represents the percentage of cyclic behavior explained by the model, meaning the strength of the rhythm.

### *Total RNA extraction and cDNA synthesis*

Total RNA was extracted from gills using Tri reagent (Invitrogen) and an SV Total RNA Isolation System kit (Promega). The total RNA quantity and quality were assessed by spectrophotometry (OD230, OD260, OD280). RNA reverse transcription was realized using Goscript™ Reverse Transcription System kits (Promega).

### *mRNA expression analysis by Real-Time PCR*

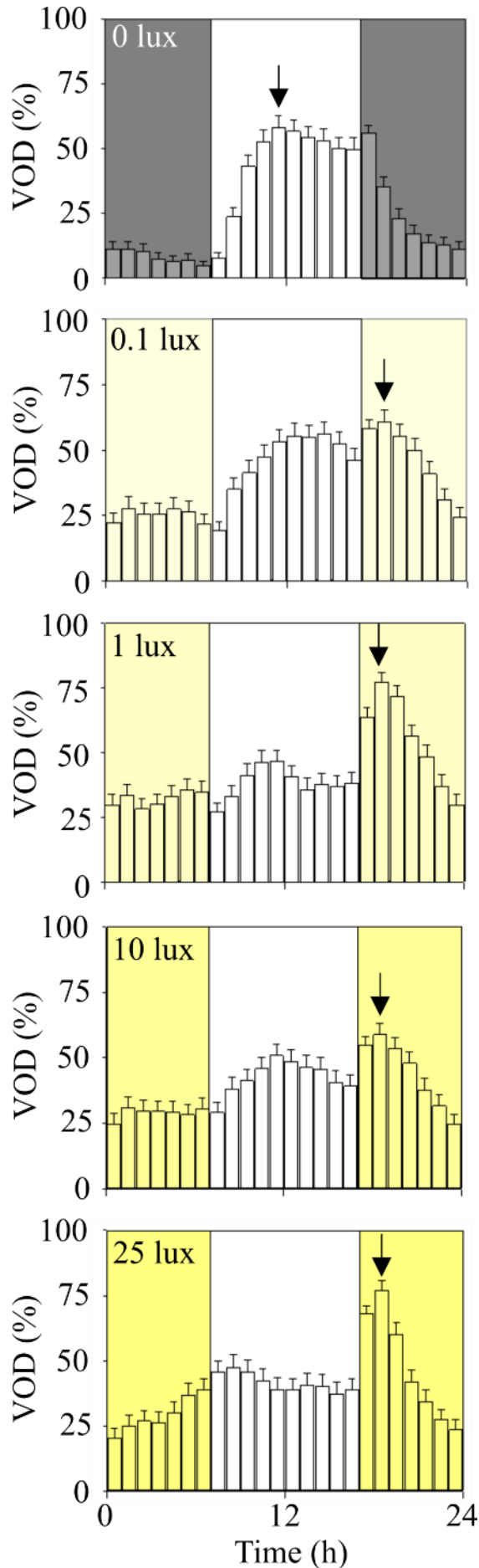
Real-Time qPCR was realized using GoTaq® qPCR Master Mix kit (Promega). Primers sets of clock and clock-associated genes (*CgClock*, *CgBmal*, *CgCry*, *CgPer*, *CgTim1*, *CgCry1*, *CgReverberb*, *CgRor*, *CgHiomt-like*, *CgOctβ2*, *CgRhodopsin-like 1*, *CgRhodopsin-like 2*, *CgRhodopsin-like 3*), and housekeeping genes (*CgEfl*, *Cg28S*, *CgGadph*) are listed in the table S2. qPCR reactions were realized as follows: 95 °C for 2 min to activate the GoTaq polymerase, 40 cycles of 95 °C for 15 seconds (denaturation), and 60 °C for 1 minute (annealing and extension) for amplification of target cDNA, followed by 2 minutes at 60 °C for the final elongation. In the end, melting curves were generated by gradually decreasing the temperature from 95 °C to 60 °C to control the primer specificity. The comparative Ct method  $2^{-\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001) was used to determine the relative transcript level of clock and clock-associated genes, where  $\Delta Ct = Ct(\text{target gene}) - Ct(\text{housekeeping gene})$ . Gene's expression was normalized with the geometric mean of the housekeeping genes *CgEfl* and *Cg28S*, based on stability values (Xie et al., 2012).

### *Statistical analysis*

All statistical analysis were performed using SigmaPlot software (version 13.0; Systat Software, USA). T-tests were performed for two groups' comparisons after checking assumptions (normality of data and equal variance) and if they were not validated the non-parametric Mann-Whitney rank sum test was performed. Two groups' comparisons were used for molecular analysis results. For multiple comparisons, one-way ANOVA were used after checking assumptions (normality of data and equal variance). When assumptions were not validated, the non-parametric Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks test was performed. In case of significant differences, a Tukey test was realized for all pairwise multiple comparisons unless the groups did not have equal size, in which case the Dunn's test was realized. Multiple comparisons were performed for behavioral analyses. On the whole molecular data, a two-way ANOVA was also performed after checking assumptions (normality of data and equal variance), and in case of significant differences, a Tuckey test was used for all pairwise multiple comparisons. For all test results, a difference was considered significant when  $p < 0.05$ .

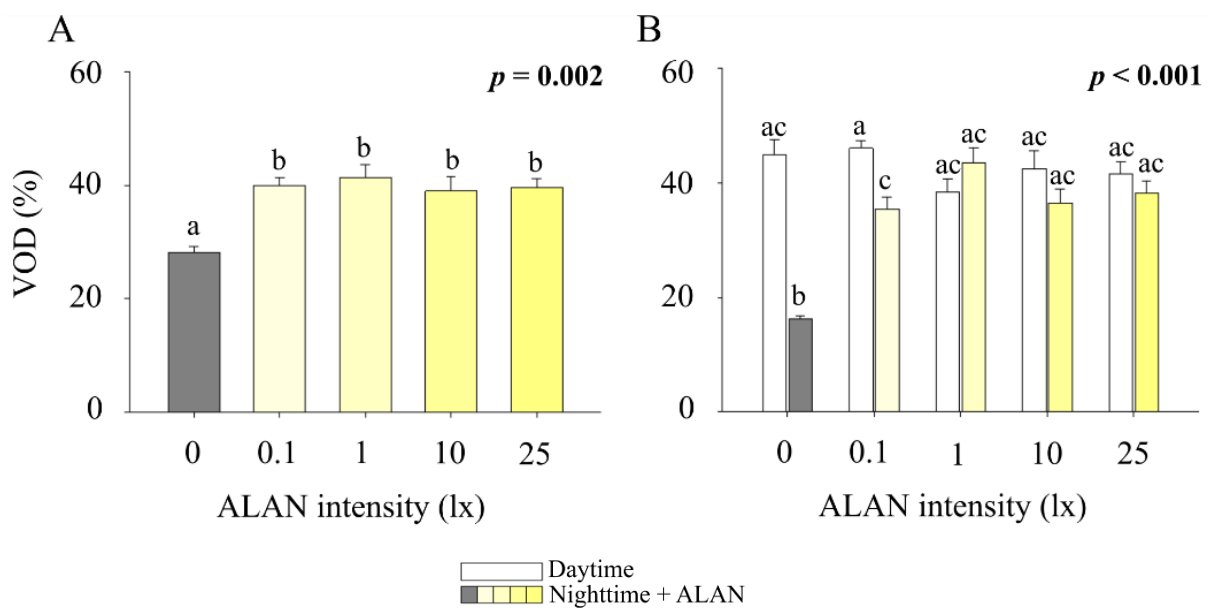
## Results

Figure 1 shows the behavioral mean daily pattern of oysters in the control condition, and exposed to ALAN ranging from 0.1 to 25 lx. In the control condition, we show a diurnal pattern with a maximal VOD at 11–12 h (peak showed by the black arrow). When exposed to ALAN, the overall daily pattern of oysters' behavior is modified, with an increase of the hourly VOD during nighttime and a 7-hours shift of the daily VOD peak, delayed from daytime to nighttime, for all ALAN intensities starting from 0.1 lx.



**Figure 1.** Behavioral daily pattern of oysters ( $n = 15\text{--}16$  oysters) in control condition (0 lx) and exposed to different ALAN intensities (0.1 lx, 1 lx, 10 lx, and 25 lx). Mean hourly VOD data are shown as mean  $\pm$  SE ( $n = 7$  days). White backgrounds indicate daytime and yellow and black backgrounds indicate nighttime. Arrows indicate the VOD peak during the day.

Statistical analysis of the mean daily VOD shows a significant increase from 0.1 lx, of the mean VOD when oysters are exposed to ALAN for all of the tested intensities ( $p = 0.002$ ; Fig. 2A), without an intensity effect. The figure 2B shows no significant differences in VOD during daytime between all conditions. However, ALAN causes a significant increase of the mean VOD during nighttime starting from 0.1 lx. The significant difference of VOD between daytime and nighttime observed in the control condition decreases at 0.1 lx and significantly disappears at 1, 10, and 25 lx.



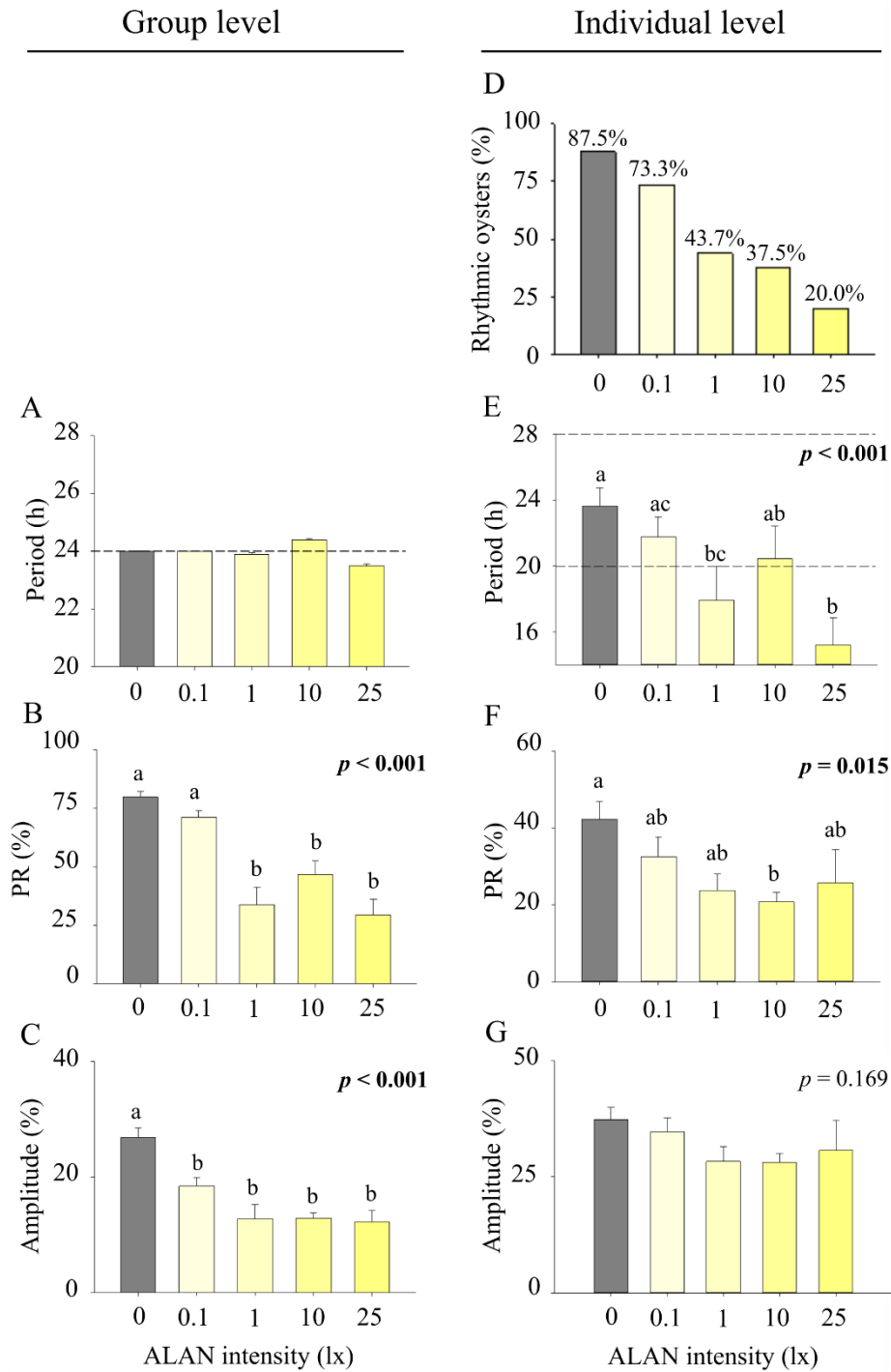
**Figure 2.** Effect of ALAN intensity on (A) the mean daily valve opening duration (VOD), and (B) the mean VOD during the daytime and the nighttime. Data are expressed in mean  $\pm$  SE ( $n = 7$  days). Different letters indicate significant differences between ALAN conditions and between daytime and nighttime ( $p < 0.05$ ).

Figure 3 shows chronobiological analysis, characterizing the effects of ALAN exposure on the oysters' daily behavioral rhythm at the group and individual levels (detailed results in Table S3 and Table S4). At the group level, a significant daily rhythm persists in all conditions with no significant differences of period length between the conditions (Fig. 3A). However, ALAN affected several parameters of this rhythm. Indeed, there is a significant decrease ( $p < 0.001$ ) of the percent rhythm (PR, %) of the daily rhythm when oysters are exposed to ALAN starting from 1 lx (Fig. 3B). Furthermore, the amplitude of the daily rhythm decreases significantly ( $p < 0.001$ ) in all ALAN conditions, starting from 0.1 lx and without significant ALAN intensity-effect (Fig. 3C). At the individual level, results show an ALAN intensity-dependent decrease of the percentage of oysters having a significant daily rhythm (Fig. 3D). Figure 3E shows a

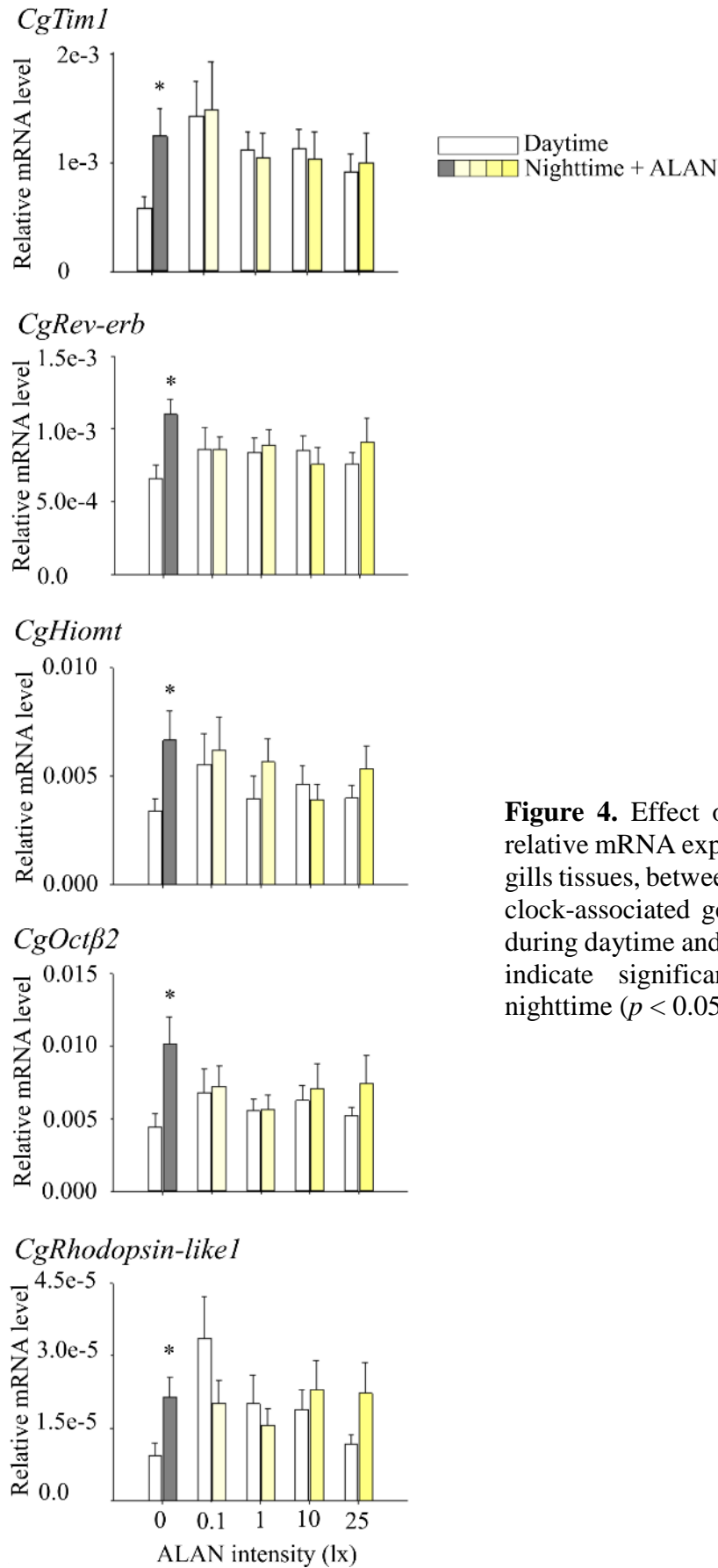
decrease ( $p < 0.001$ ) of the individual rhythmic period lengths, getting out the daily range for many individuals exposed to ALAN (Table S3). The mean period of oysters exposed to 1 lx and 25 lx are  $17.9 \pm 2.1$  and  $15.2 \pm 1.7$  h respectively, under the circadian range (20-28 h), explaining the global loss of rhythmicity at the daily scale shown in figure 3D. Furthermore, the PR of oysters having a daily rhythm tends to decrease starting from 0.1 lx, and it decreases significantly ( $p = 0.015$ ) when they are exposed to 10 lx (Fig. 3F). Finally, the amplitude of oysters having a daily rhythm show no significant differences ( $p = 0.169$ ) but a trend to decrease when oysters are exposed to ALAN (Fig 3G).

Figures 4 and S4 shows the mRNA level during daytime and nighttime of thirteen circadian clock (*CgClock*, *CgBmal*, *CgCry*, *CgPer*, *CgTim1*, *CgCry1*, *CgRev-erb*, *CgRor*) and clock-associated (*CgHiomt-like*, *CgOct $\beta$ 2*, *CgRhodopsin-like 1*, *CgRhodopsin-like 2*, *CgRhodopsin-like 3*) genes for all of the tested ALAN intensities. No significant differences of gene expression are observed between the control and the ALAN conditions neither at daytime nor at nighttime. However, results show significant differences of mRNA expression levels between daytime and nighttime in the control condition for five genes (two circadian clock genes: *CgTim1* and *CgRev-erb*; and three clock-associated genes: *CgHiomt-like*, *CgOct $\beta$ 2* and *CgRhodopsin-like 1*), with an increase of expression during nighttime (Fig. 4). This daytime / nighttime difference of gene expression significantly disappears in all of the five genes for all ALAN intensities tested.





**Figure 3.** Effect of ALAN intensity on oysters daily rhythm characteristics: (A) the period at group level, (B) the percent rhythm (PR) at group level, (C) amplitude of the rhythm at group level, (D) the percentage of oysters having a daily rhythm, (E), period of individual rhythmic oysters, dotted lines define the daily range, (F) the PR at individual level of oysters having a daily rhythm, (G) amplitude of the rhythm at the individual level of oysters having a daily rhythm. Data are expressed in mean  $\pm$  SE. For A-C, the SE shows the daily variability of the group's significant rhythm parameters ( $n = 7$  days). For E-G the SE shows the individual variability ( $n = 15-16$  oysters). Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).



**Figure 4.** Effect of ALAN intensity on the difference in relative mRNA expression level (mean  $\pm$  SE, n = 8) on oyster gills tissues, between daytime and nighttime of five clock and clock-associated genes. White bars indicate the gene level during daytime and, colored bars during nighttime. Asterisks indicate significant differences between daytime and nighttime ( $p < 0.05$ ).

Finally, the table 1 shows the results of a two-way ANOVA, testing the effects of the period of the day (daytime and nighttime), ALAN intensities, and their interaction on the overall relative mRNA levels of the thirteen genes studied. These results reveal a significant difference ( $p = 0.046$ ) of the overall mRNA level between daytime and nighttime only for the control condition ( $p = 0.014$ ). In all ALAN conditions, the daytime / nighttime difference of gene expression is abolished.

**Table 1.** Two-Way Analysis of Variance testing the effect of Daytime/Nighttime and the ALAN intensity (0 lx, 0.1 lx, 1 lx, 10 lx, 25 lx) on the relative mRNA expression level on gill tissues of 13 clock and clock-associated genes. In bold, significant  $p$ -values ( $p < 0.05$ ).

Source of variation	$p$ -value	df	F
Daytime/Nighttime	<b>0.046</b>	1	3.996
ALAN intensity	0.886	4	0.288
Daytime/Nighttime x ALAN intensity	0.462	4	0.902
Daytime/Nighttime within 0 lx	<b>0.014</b>		
Daytime/Nighttime within 0.1 lx	0.743		
Daytime/Nighttime within 1 lx	0.652		
Daytime/Nighttime within 10 lx	0.903		
Daytime/Nighttime within 25 lx	0.261		

## Discussion

Our study shows that ALAN affects the daily behavioral rhythm and the molecular clock of oysters starting from the lowest ALAN intensity tested, 0.1 lx, in the range of artificial skyglow. Multiples ALAN's effects on oyster's behavioral rhythm are observed: a decrease of the percentage of oysters having a daily rhythm, a decrease of the rhythm's robustness, a decrease of the rhythmic amplitude, an increase of the mesor (mean VOD), and a shift from a diurnal to a nocturnal peak activity. At the molecular level, the overall difference of clock and clock-associated gene expression observed in control condition between daytime and nighttime is abolished when oysters are exposed to ALAN. While a clear ALAN intensity-effect is observed at the individual level regarding the percentage of oysters having a daily behavioral rhythm, most of ALAN's effects at both behavioral and molecular levels occur from 0.1 to 25 lx without significant intensity-effect.

We showed that ALAN exposure leads to an increase of oysters' VOD, explained by an increase of activity during nighttime leading to a decrease (at 0.1 lx) or a loss (at 1, 10, and 25 lx) of daytime / nighttime differences of valve behavior and a shift of peak activity from daytime to nighttime. Activity increase during nighttime as an effect of ALAN has been also shown in other marine organisms, such as the diurnal fish *Girella laevis* exposed to 70 lx at night (Pulgar et al., 2019). On the contrary, the nocturnal crayfish *Pacifastacus leniusculus* showed a decrease of activity during nighttime when exposed to ALAN at 12 lx using a HPS streetlight bulb (Thomas et al., 2016). ALAN effects on organisms' behavior have also been investigated in juvenile gastropods *Concholepas concholepas*, in which ALAN at an intensity of 329.9 lx (LED technology) induces a less efficient search for prey during nighttime (Manriquez et al., 2019). Moreover, some previous results of bivalve behavior disruption by ALAN was shown by Christoforou (2022), which investigated the effects of several ALAN wavelengths at an intensity of 19.86 lx using LED lightings on the behavior of the mussel *Mytilus edulis*. The exposure of mussels to white ALAN induces a decrease during both nighttime and daytime of the open/close frequency valve events. However, in this study, no chronobiological analysis were performed and the relatively invasive experimental device used to record mussels' behavior could have mask ALAN effects on mussels valve activity. In our study, we went further in the investigation of ALAN's impacts on daily behavioral rhythm using chronobiological analysis and lower ALAN intensities, using a non-invasive biosensor (Andrade et al., 2016).

Daily rhythms and more generally biological rhythms are of great importance since they enable organisms to anticipate cyclic changes in their environment and regulate accordingly the temporal organization of their physiological processes such as feeding, respiration, immunity, or growth (Helm et al., 2017; Yerushalmi and Green, 2009). Thus, the clear disruption of oysters' daily rhythm by ALAN observed in this study, starting from 0.1 lx, could have deep consequences on organism's physiology and fitness. The oysters were not fed during the experiments to avoid an effect of food supply that may fluctuate, and thus acts as a zeitgeber of daily rhythm. However, during our experimentation duration in the control condition, we did not observe a modification of behavior, showing that food absence did not affect ALAN's effects on oysters' daily rhythm. Furthermore, the experiments were conducted in winter, when the food supply is very low in the environment. Moreover, the rhythm at the daily scale could not be the only rhythm that can be disrupted by ALAN. It has been shown that oysters have other biological rhythms. For example, oysters showed a lunar rhythm i.e. their valve behavior is synchronized with lunar cycles by detecting moonlight illumination cycle (Payton and Tran,

2019). This lunar rhythm could be affected by ALAN since the maximal intensity of the moonlight ranges from 0.1 to 0.3 lx (Rich and Longcore, 2006), thus the natural variations of moonlight intensity can be easily masked by ALAN intensities, such as the skyglow. The masking effect of lunar cycles by ALAN using LED has been investigated in the corals *Acropora millepora* and *Acropora digitifera*, in which exposition to ALAN delayed or masked their gametogenesis leading to a spawning desynchronization (Ayalon et al., 2021). Another example of ALAN effect on lunar rhythm is the disruption of the monthly nocturnal foraging pattern of the gastropod *Nucella lapillus*, based on the lunar cycle, by ALAN produced by LED lighting at an intensity of 10 lx (Tidau et al., 2022). Moreover, oysters' seasonal rhythms could be disrupted by ALAN. Oysters use the variation of photoperiod through the year to anticipate seasonal changes and synchronize physiological processes such as behavior, growth, and spawning (Bernard et al., 2016; Payton et al., 2017a). However, ALAN being often present during dusk and dawn, it can mask these two natural phenomena, preventing oysters to detect the variation of photoperiod along the year, which could affect several seasonal physiological processes and decrease the fitness of organisms (Gaston et al., 2017). ALAN's effects on organisms' physiological processes and fitness have been shown for example in the amphipod *Orchestoidea tuberculata*, in which ALAN (halogen light) induces a decrease of growth (Luarte et al., 2016), and in barnacles, in which ALAN (LED lighting) affects the settlement process (Lynn et al., 2021; Manriquez et al., 2021). Moreover, ALAN's effects on organisms' fitness have also been observed in the juvenile crabs *Neohelice granulata* since it increases mortality, mainly by increasing cannibalistic interactions with adults at an intensity of approximately 40 lx (LED lighting) (Nunez et al., 2021).

In addition to the effects on the oyster's behavioral daily rhythm, this study also showed that ALAN disturbs the circadian clockwork of *C. gigas* by annihilating differences between daytime and nighttime in clock and clock-associated genes expression starting from the intensity 0.1 lx. Genes for which their expression was mainly affected by ALAN are *CgTim1*, *CgRev-erb*, *CgHiomt-like*, *CgOctβ2*, and *CgRhodopsin-like 1*. *CgTim1* and *CgRev-erb* are both involved in the regulation's feedback loops of the oysters' molecular clock and thus are core clock genes (Perrigault and Tran, 2017). On the other hand, *CgHiomt-like*, *CgOctβ2*, and *CgRhodopsin-like 1* are clock-associated genes. The first one is a homologue of the mammal gene *Hiomt* involved in the final step of the synthesis of melatonin, known to be a key molecule of the day / night rhythm and a potent antioxidant with a proposed role in immune function (Jones et al., 2015; Pevet et al., 1980). *CgOctβ2* is the gene of the octopamine receptor β-2R. Octopamine is a biogenic amine well studied in arthropods and gastropods where it functions

as a neurotransmitter and hormone, fulfilling the roles played by adrenalin in vertebrates. It is an extremely pleiotropic substance, participating in invertebrate development such as growth, maturation, and reproduction by activating their corresponding G protein-coupled receptors (GPCRs), and may interact with the circadian clock (Roeder, 2020). Finally, the last gene to show a disrupted expression in presence of ALAN is the gene of the rhodopsin (*CgRhodopsin-like 1*), a photoreceptor involved in oysters' light-sensitivity (Wu et al., 2018). Thus, ALAN affects five of the thirteen genes studied here. This relative low transcriptional response observed might be due to the fact that oysters have been sampled at only two sampling times over the daily cycle. Indeed, a stronger transcriptional disruption might possibly have been revealed by sampling at another time of the day. However, our results still show that ALAN can affect genes of the molecular clock of *C. gigas* (*CgTim1*, *CgRev-erb*), suggesting that the observed disruption of oyster's daily behavioral rhythm would be a real consequence of the circadian clock disruption and not only a direct reaction of light perception in presence of ALAN. ALAN also affects essential clock-associated genes (*CgHiomt*, *CgOctβ2*, *CgRhodopsin-like 1*) involved in physiological processes regulation. Thus, we can imagine that, by cascading effect, the expression of other genes involved in several physiological functions can also be disrupted by ALAN. For example, ALAN at 0.1–0.3 lx using a fluorescent bulbs induces the suppression of the increase of melatonin during nighttime in *Salvelinus alpinus* (Liu et al., 2019). Moreover, in the European perch *Perca fluviatilis* and the roach *Rutilus rutilus* the impairment of circadian melatonin pattern by ALAN (HPS lamps) is associated with a decrease of the mRNA expression of gonadotropins, which could disrupt their reproduction (Bruning et al., 2018a).

## Conclusion

This study is the first to investigate ALAN effects at environmentally realistic intensities on oysters, a key species of the benthic coastal ecosystems. Our results reveal deep impacts on the daily behavioral rhythm of *C. gigas*, from ALAN intensities starting from 0.1 lx, comparable to the skyglow intensities. We also found that the expression of some of the clock and clock-associated genes of the oyster's molecular clock was affected by ALAN, suggesting a disruption of the endogenous clock and potential cascading physiological consequences. However, studies focusing on the ALAN's effects on oysters' biological rhythms and the consequences of their disruption on their fitness and physiology are needed. Furthermore, given that ALAN spreads fast in coastal environments in which oysters are a key species, ALAN's effects on this

organism could have ecological consequences that should be investigated to get a global picture of how ALAN will affect coastal ecosystems.

**Ethics:** All experiments complied with the laws in effect in France and they conformed to international ethical standards.

**Data accessibility:** The data underlying this study are available on Supplementary data.

**Author contributions:** Study design and methodology, D.T., A.B., L.P.; experimentation, A.B., D.T.; molecular analysis: A.B., L.P.; data treatment, A.B.; interpretation, A.B., D.T., L.P.; manuscript writing, A.B.; review and editing, all authors; funding, D.T. All authors contributed critically to the drafts, and gave final approval for publication.

**Competing interests:** We have no competing interests.

## **Funding**

This work was supported by the financial support of the French Nation Research Agency (ANR), LUCIOLE project, PRC (2022-2026) and a Bordeaux University PhD scholarship for A. Botté.

## **Acknowledgments**

We kindly thank Pierre Ciret, Christian Portier, and Christelle Teillet for their help during the setup of the experiments.

## References

- Andrade, H., Massabuau, J.-C., Cochrane, S., Ciret, P., Tran, D., Sow, M., Camus, L., 2016. High Frequency Non-invasive (HFNI) Bio-Sensors As a Potential Tool for Marine Monitoring and Assessments. *Front. Mar. Sci.* 3. 10.3389/fmars.2016.00187
- Ayalon, I., Rosenberg, Y., Benichou, J. I. C., Campos, C. L. D., Sayco, S. L. G., Nada, M. A. L., Baquiran, J. I. P., Ligson, C. A., Avisar, D., Conaco, C., Kuechly, H. U., Kyba, C. C. M., Cabaitan, P. C., Levy, O., 2021. Coral Gametogenesis Collapse under Artificial Light Pollution. *Curr. Biol.* 31(2), 413-419 e413. 10.1016/j.cub.2020.10.039
- Bernard, I., Massabuau, J. C., Ciret, P., Sow, M., Sottolichio, A., Pouvreau, S., Tran, D., 2016. In situ spawning in a marine broadcast spawner, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Timing and environmental triggers. *Limnol. Oceanogr.* 61(2), 635-647. 10.1002/lno.10240
- Bierman, A., 2012. Will switching to LED outdoor lighting increase sky glow? *Light. Res. Technol.* 44(4), 449-458. 10.1177/1477153512437147
- Bingham, C., Arbogast, B., Guillaume, G. C., Lee, J. K., Halberg, F., 1982. Inferential statistical methods for estimating and comparing cosinor parameters. *Chronobiologia* 9, 397-439.
- Bradshaw, W. E., Holzapfel, C. M., 2010. Light, time, and the physiology of biotic response to rapid climate change in animals. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 147-166. 10.1146/annurev-physiol-021909-135837
- Bruning, A., Kloas, W., Preuer, T., Holker, F., 2018. Influence of artificially induced light pollution on the hormone system of two common fish species, perch and roach, in a rural habitat. *Conserv. Physiol.* 6(1), coy016. 10.1093/conphys/coy016
- Cermakian, N., Sassone-Corsi, P., 2000. Multilevel regulation of the circadian clock. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1(1), 59-67. 10.1038/35036078
- Christoforou, E., 2022. Effects of microfiber and light pollution on coastal ecosystem services provided by the blue mussel, *Mytilus edulis*. University of Glasgow. <https://theses.gla.ac.uk/82885/>
- Davies, T. W., Duffy, J. P., Bennie, J., Gaston, K. J., 2014. The nature, extent, and ecological implications of marine light pollution. *Front. Ecol. Environ.* 12(6), 347-355. 10.1890/130281
- Davies, T. W., Duffy, J. P., Bennie, J., Gaston, K. J., 2016. Stemming the Tide of Light Pollution Encroaching into Marine Protected Areas. *Conserv. Lett.* 9(3), 164-171. 10.1111/conl.12191



- Davies, T. W., Smyth, T., 2018. Why artificial light at night should be a focus for global change research in the 21st century. *Glob. Chang. Biol.* 24(3), 872-882. 10.1111/gcb.13927
- Falchi, F., Cinzano, P., Elvidge, C. D., Keith, D. M., Haim, A., 2011. Limiting the impact of light pollution on human health, environment and stellar visibility. *J Environ. Manage.* 92(10), 2714-2722. 10.1016/j.jenvman.2011.06.029
- Falchi, F., Cinzano, P., Duriscoe, D., Kyba, C. C., Elvidge, C. D., Baugh, K., Portnov, B. A., Rybnikova, N. A., Furgoni, R., 2016. The new world atlas of artificial night sky brightness. *Sci. Adv.* 2(6), e1600377. 10.1126/sciadv.1600377
- Gaston, K. J., Bennie, J., 2014. Demographic effects of artificial nighttime lighting on animal populations. *Environ. Rev.* 22(4), 323-330. 10.1139/er-2014-0005
- Gaston, K. J., Davies, T. W., Nedelec, S. L., Holt, L. A., 2017. Impacts of Artificial Light at Night on Biological Timings. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 48(1), 49-68. 10.1146/annurev-ecolsys-110316-022745
- Gaston, K. J., 2018. Lighting up the nighttime. *Science* 362(6416), 744-746. 10.1126/science.aau8226
- Gouthière, L., Mauvieux, B., 2003. Etapes essentielles dans l'analyse des rythmes: qualité des données expérimentales, recherche de périodes par analyses spectrales de principes divers, modélisation. XXXVème Congrès Société Francoph Chronobiol, Université de Saint-Etienne.
- Grubisic, M., 2018. Waters under Artificial Lights: Does Light Pollution Matter for Aquatic Primary Producers? *Limnol. Oceanogr. Bull.* 27(3), 76-81. 10.1002/lob.10254
- Grubisic, M., Haim, A., Bhusal, P., Dominoni, D. M., Gabriel, K. M. A., Jechow, A., Kupprat, F., Lerner, A., Marchant, P., Riley, W., Stebelova, K., van Grunsven, R. H. A., Zeman, M., Zubidat, A. E., Hölker, F., 2019. Light Pollution, Circadian Photoreception, and Melatonin in Vertebrates. *Sustainability* 11(22). 10.3390/su11226400
- Helm, B., Visser, M. E., Schwartz, W., Kronfeld-Schor, N., Gerkema, M., Piersma, T., Bloch, G., 2017. Two sides of a coin: ecological and chronobiological perspectives of timing in the wild. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B., Biol. Sci.* 372(1734). 10.1098/rstb.2016.0246
- Hölker, F., Moss, T., Griefahn, B., Kloas, W., Voigt, C. C., Henckel, D., Hänel, A., Kappeler, P. M., Völker, S., Schwoppe, A., Franke, S., Uhrlandt, D., Fischer, J., Klenke, R., Wolter, C., Tockner, K., 2010. The Dark Side of Light: A Transdisciplinary Research Agenda for Light Pollution Policy. *Ecol. Soc.* 15(4). 10.5751/es-03685-150413

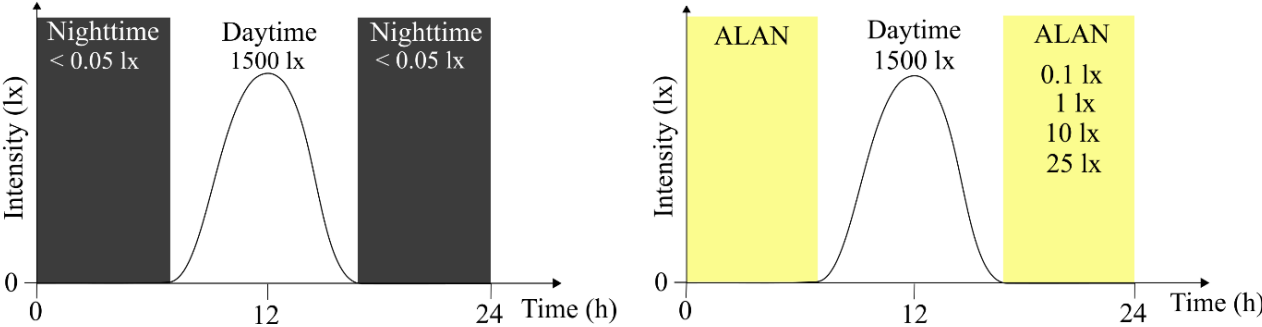
- Jones, T. M., Durrant, J., Michaelides, E. B., Green, M. P., 2015. Melatonin: a possible link between the presence of artificial light at night and reductions in biological fitness. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B., Biol. Sci.* 370(1667). 10.1098/rstb.2014.0122
- Kummu, M., de Moel, H., Salvucci, G., Viviroli, D., Ward, P. J., Varis, O., 2016. Over the hills and further away from coast: global geospatial patterns of human and environment over the 20th–21st centuries. *Environ. Res. Lett.* 11(3). 10.1088/1748-9326/11/3/034010
- Liu, Q., Manning, A. J., Duston, J., 2019. Light intensity and suppression of nocturnal plasma melatonin in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 228, 103-106. 10.1016/j.cbpa.2018.11.012
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4), 402-408. 10.1006/meth.2001.1262
- Longcore, T., Rich, C., 2004. Ecological light pollution. *Front. Ecol. Environ.* 2(4), 191-198. 10.1890/1540-9295(2004)002[0191:Elp]2.0.Co;2
- Longcore, T., Rodriguez, A., Witherington, B., Penniman, J. F., Herf, L., Herf, M., 2018. Rapid assessment of lamp spectrum to quantify ecological effects of light at night. *J. Exp. Zool. A: Ecol. Integr. Physiol.* 329(8-9), 511-521. 10.1002/jez.2184
- Luarte, T., Bonta, C. C., Silva-Rodriguez, E. A., Quijon, P. A., Miranda, C., Farias, A. A., Duarte, C., 2016. Light pollution reduces activity, food consumption and growth rates in a sandy beach invertebrate. *Environ. Pollut.* 218, 1147-1153. 10.1016/j.envpol.2016.08.068
- Luginbuhl, C. B., Boley, P. A., Davis, D. R., 2014. The impact of light source spectral power distribution on sky glow. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 139, 21-26. 10.1016/j.jqsrt.2013.12.004
- Lynn, K. D., Tummon Flynn, P., Manriquez, K., Manriquez, P. H., Pulgar, J., Duarte, C., Quijon, P. A., 2021. Artificial light at night alters the settlement of acorn barnacles on a man-made habitat in Atlantic Canada. *Mar. Pollut. Bull.* 163, 111928. 10.1016/j.marpolbul.2020.111928
- Manriquez, K., Quijon, P. A., Manriquez, P. H., Miranda, C., Pulgar, J., Quintanilla-Ahumada, D., Duarte, C., 2021. Artificial Light at Night (ALAN) negatively affects the settlement success of two prominent intertidal barnacles in the southeast Pacific. *Mar. Pollut. Bull.* 168, 112416. 10.1016/j.marpolbul.2021.112416
- Manriquez, P. H., Jara, M. E., Diaz, M. I., Quijon, P. A., Widdicombe, S., Pulgar, J., Manriquez, K., Quintanilla-Ahumada, D., Duarte, C., 2019. Artificial light pollution influences

- behavioral and physiological traits in a keystone predator species, *Concholepas concholepas*. *Sci. Total Environ.* 661, 543-552. 10.1016/j.scitotenv.2019.01.157
- Mat, A. M., Massabuau, J. C., Ciret, P., Tran, D., 2012. Evidence for a plastic dual circadian rhythm in the oyster *Crassostrea gigas*. *Chronobiol. Int.* 29(7), 857-867. 10.3109/07420528.2012.699126
- Mat, A. M., Massabuau, J.-C., Ciret, P., Tran, D., 2014. Looking for the clock mechanism responsible for circatidal behavior in the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 161(1), 89-99. 10.1007/s00227-013-2317-2
- Navara, K. J., Nelson, R. J., 2007. The dark side of light at night: physiological, epidemiological, and ecological consequences. *J. Pineal Res.* 43(3), 215-224. 10.1111/j.1600-079X.2007.00473.x
- Nunez, J. D., Bas, C. C., Perez Garcia, M., Ocampo, E. H., Ribeiro, P. D., Luppi, T. A., 2021. Artificial light at night may increase the predation pressure in a salt marsh keystone species. *Mar Environ Res* 167, 105285. 10.1016/j.marenvres.2021.105285
- Partch, C. L., Green, C. B., Takahashi, J. S., 2014. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol.* 24(2), 90-99. 10.1016/j.tcb.2013.07.002
- Payton, L., Perrigault, M., Hoede, C., Massabuau, J. C., Sow, M., Huvet, A., Boullot, F., Fabioux, C., Hegaret, H., Tran, D., 2017a. Remodeling of the cycling transcriptome of the oyster *Crassostrea gigas* by the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Sci. Rep.* 7(1), 3480. 10.1038/s41598-017-03797-4
- Payton, L., Sow, M., Massabuau, J. C., Ciret, P., Tran, D., 2017b. How annual course of photoperiod shapes seasonal behavior of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *PLoS One* 12(10), e0185918. 10.1371/journal.pone.0185918
- Payton, L., Tran, D., 2019. Moonlight cycles synchronize oyster behaviour. *Biol. Lett.* 15(1), 20180299. 10.1098/rsbl.2018.0299
- Perrigault, M., Tran, D., 2017. Identification of the Molecular Clockwork of the Oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One* 12(1), e0169790. 10.1371/journal.pone.0169790
- Pevet, P., Balemans, M. G., Legerstee, W. C., Vivien-Roels, B., 1980. Circadian rhythmicity of the activity of hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the formation of melatonin and 5-methoxytryptophol in the pineal, retina, and harderian gland of the golden hamster. *J. Neural Transm.* 49(4), 229-245. 10.1007/BF01252128
- Pulgar, J., Zeballos, D., Vargas, J., Aldana, M., Manriquez, P. H., Manriquez, K., Quijon, P. A., Widdicombe, S., Anguita, C., Quintanilla, D., Duarte, C., 2019. Endogenous cycles, activity patterns and energy expenditure of an intertidal fish is modified by artificial

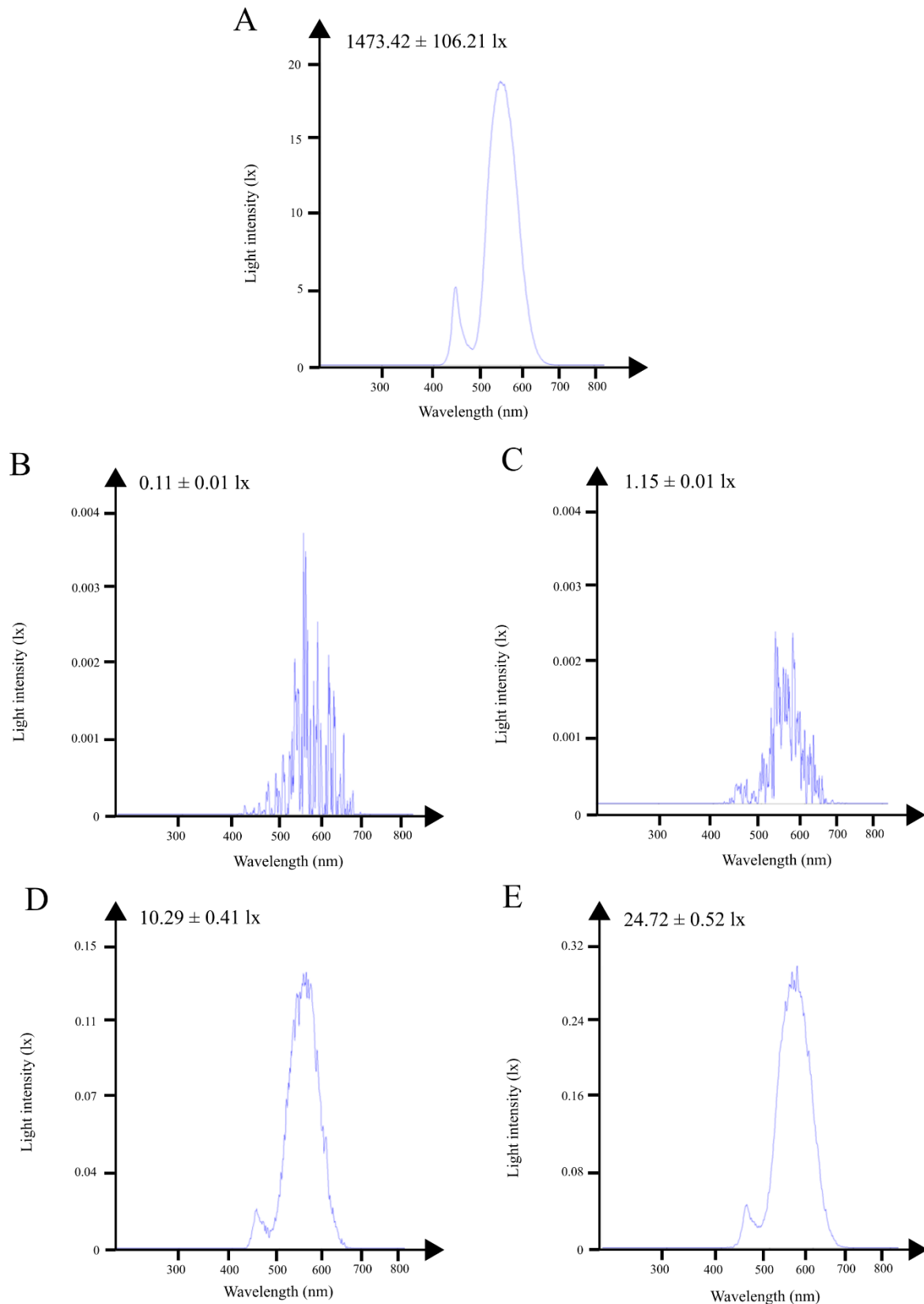
- light pollution at night (ALAN). *Environ. Pollut.* 244, 361-366.  
10.1016/j.envpol.2018.10.063
- Rich, C., Longcore, T., 2006. *Ecological Consequences of Artificial Night Lighting*. Island Press.
- Roeder, T., 2020. The control of metabolic traits by octopamine and tyramine in invertebrates. *J. Exp. Biol.* 223(Pt 7). 10.1242/jeb.194282
- Sanders, D., Frago, E., Kehoe, R., Patterson, C., Gaston, K. J., 2021. A meta-analysis of biological impacts of artificial light at night. *Nat Ecol Evol* 5(1), 74-81.  
10.1038/s41559-020-01322-x
- Scargle, J. D., 1982. *Studies in astronomical time series analysis. II - Statistical aspects of spectral analysis of unevenly spaced data*. *Astrophys. J.* 263. 10.1086/160554
- Thomas, J. R., James, J., Newman, R. C., Riley, W. D., Griffiths, S. W., Cable, J., 2016. The impact of streetlights on an aquatic invasive species: Artificial light at night alters signal crayfish behaviour. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 176, 143-149.  
10.1016/j.applanim.2015.11.020
- Tidau, S., Whittle, J., Jenkins, S. R., Davies, T. W., 2022. Artificial light at night reverses monthly foraging pattern under simulated moonlight. *Biol. Lett.* 18(7), 20220110.  
10.1098/rsbl.2022.0110
- Tran, D., Nadau, A., Durrieu, G., Ciret, P., Parisot, J. P., Massabuau, J. C., 2011. Field chronobiology of a molluscan bivalve: how the moon and sun cycles interact to drive oyster activity rhythms. *Chronobiol. Int.* 28(4), 307-317.  
10.3109/07420528.2011.565897
- Tran, D., Perrigault, M., Ciret, P., Payton, L., 2020. Bivalve mollusc circadian clock genes can run at tidal frequency. *Proc. Biol. Sci.* 287(1918), 20192440. 10.1098/rspb.2019.2440
- Wu, C., Jiang, Q., Wei, L., Cai, Z., Chen, J., Yu, W., He, C., Wang, J., Guo, W., Wang, X., 2018. A Rhodopsin-Like Gene May Be Associated With the Light-Sensitivity of Adult Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Front. Physiol.* 9, 221. 10.3389/fphys.2018.00221
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., Zhang, B., 2012. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant. Mol. Biol.* 10.1007/s11103-012-9885-2
- Yerushalmi, S., Green, R. M., 2009. Evidence for the adaptive significance of circadian rhythms. *Ecol. Lett.* 12(9), 970-981. 10.1111/j.1461-0248.2009.01343.x
- Zissis, G., Bertoldi, P., 2018. Status of LED-Lighting world market in 2017.

### 3. Annexes

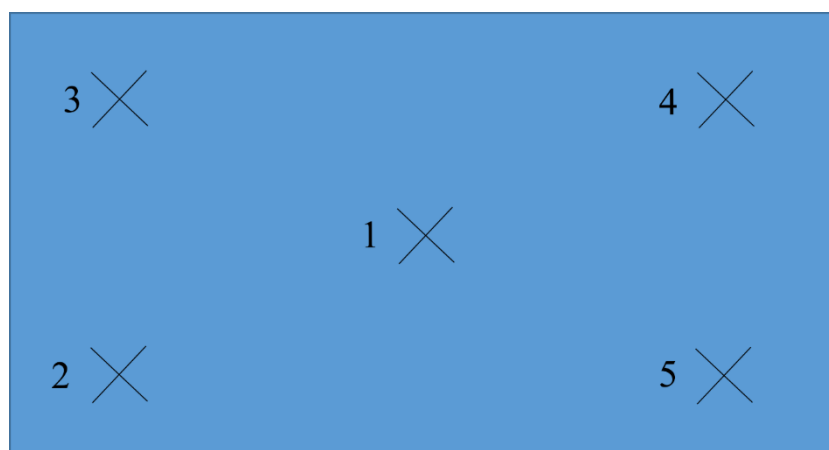
**Supplementary material:** Botté, A., Payton, L., Tran, D., 2023a. Artificial light at night at environmental intensities disrupts daily rhythm of the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Pollut. Bull.* 191. 10.1016/j.marpolbul.2023.114850



**Figure S1.** Daily light exposure of the control condition (A) and the ALAN conditions (B).



**Figure S2.** Spectrum of the maximum light intensity during daytime (A), and light spectra of ALAN intensities measured underwater near to the oysters: 0.1 lx (B), 1 lx (C), 10 lx (D), and 25 lx (E) conditions.



**Figure S3.** Five locations in the experimental tank used for underwater intensity measurements. The depth of the measure is done at the oyster level.

**Table S1.** Values of underwater measurements of the maximum light intensity during the daytime and ALAN intensities in the tank for each position in the tank, and the mean  $\pm$  SE.

Location in the tank	ALAN intensity (lx)				Maximum intensity during daytime (lx)
	0.1 lx	1 lx	10 lx	25 lx	
1	0.12	1.46	11.86	26.64	1813.99
2	0.11	1.23	10.33	23.82	1591.36
3	0.12	1.11	9.79	24.87	1192.62
4	0.11	0.84	9.73	23.94	1407.54
5	0.10	1.11	9.75	24.31	1361.59
<b>Mean <math>\pm</math> SE</b>	<b>0.11 <math>\pm</math> 0.01</b>	<b>1.15 <math>\pm</math> 0.01</b>	<b>10.29 <math>\pm</math> 0.41</b>	<b>24.72 <math>\pm</math> 0.52</b>	<b>1473.42 <math>\pm</math> 106.21</b>



**Table S2.** Forward, reverse primers sequences used for Real-Time PCR analysis in *Crassostrea gigas*.

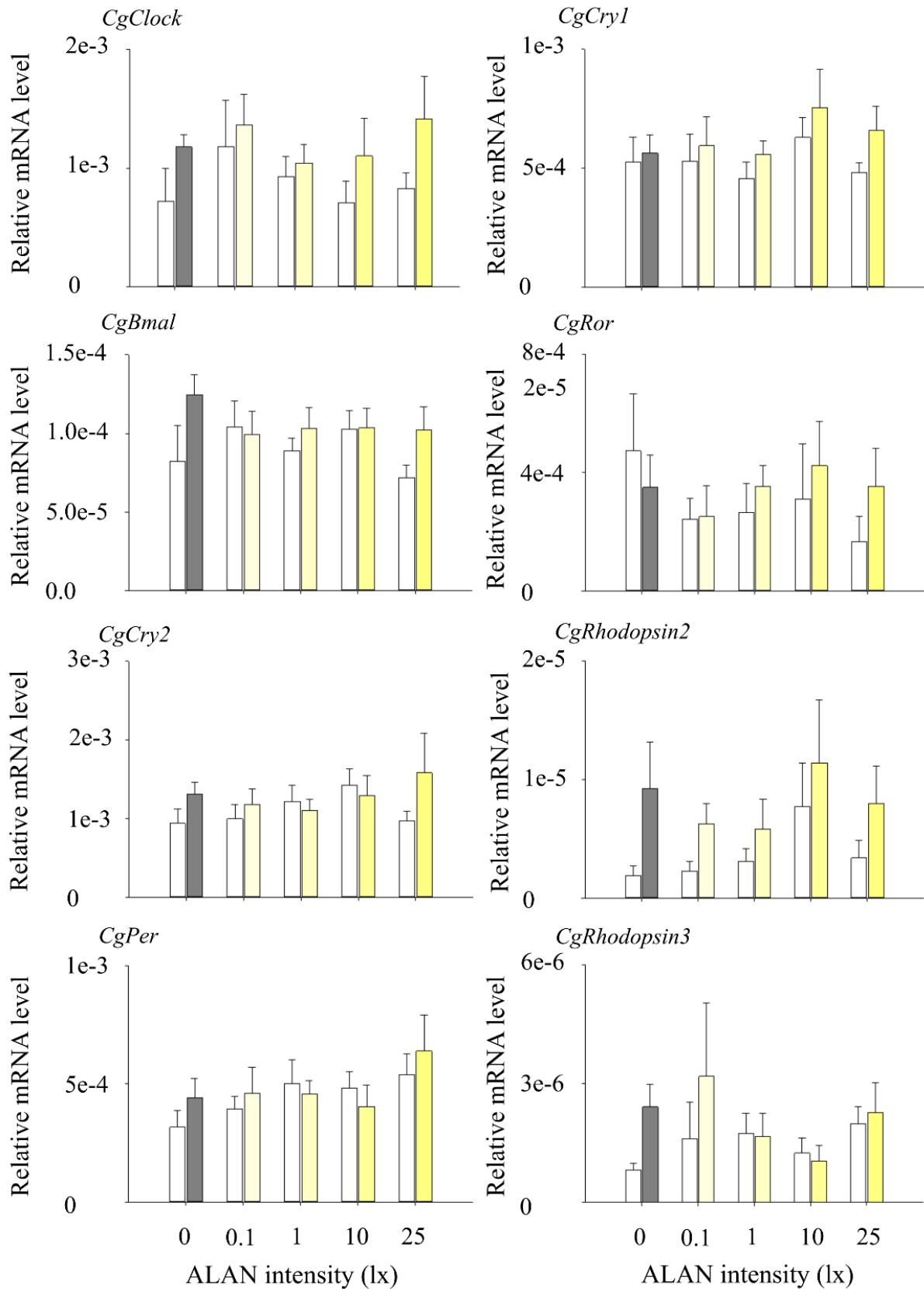
GeneBank access	Gene name	Forward primer	Reverse primer
<i>Crassostrea gigas</i> core clock genes			
KX371073	<i>CgClock (Clock)</i>	5'-TGGGAATGATGTCCAACAGAG-3'	5'-GGTCCATCAATGACAGGAAGT-3'
KX371075	<i>CgBmal (Bmal)</i>	5'-CACAAAGTTCAGGTCAGAGTGTAG-3'	5'-TCACCTGAGGTAGACTGGTTAT-3'
KX371074	<i>CgCryptochrome 2 (Cry2)</i>	5'-AACCTTACAGCAAGCACGAA-3'	5'-TGACATCTGGCTGTGGTTTC-3'
KX371076	<i>CgPeriod (Per)</i>	5'-CCGATGACAGAAATCCCAGTAG-3'	5'-CCATCCTATTCTCTGCTCTTG-3'
KX371077	<i>CgTimless 1 (Tim1)</i>	5'-AAAGATCCCGGACACAGTATG-3'	5'-TGGAACTCGTTCCTGACTTG-3'
KT991835	<i>CgCryptochrome 1 (Cry1)</i>	5'-TCATGAAGCAGCTCAGATACG-3'	5'-ACCTCCCAGTCAACCAAAG-3'
KJ188106	<i>CgRev-erb (Rev-erb)</i>	5'-GACTTTGCTGATCGCTTCAAC-3'	5'-CTTCCAAGTCTCCACATTTTC-3'
EKC18621	<i>CgRor (Ror)</i>	5'-CTACGTGAGCAGGTGTTTGA-3'	5'-CGTCCGCTATGTCCTTCAAT-3'
<i>Crassostrea gigas</i> clock-controlled genes			
EKC41768	<i>CgHiomt-like</i>	5'-CGGGTGGATCAGTGTTAGTAATG-3'	5'-TCTCTTGGCCCTGTGATAGA-3'
XM_011433587	<i>CgRhodopsin-like 1</i>	5'-TAGTTCGGCGTCGGAATTTATC-3'	5'-CTGTTTCAATCTCTGCTCTCAC-3'
XM_011448766	<i>CgRhodopsin-like 2</i>	5'-CCCTGAGTCATCCCAAATTCA-3'	5'-GATGTTCTCGGCGTAGCTTTA-3'
XM_020065754	<i>CgRhodopsin-like 3</i>	5'-TGACTTTGACGGCGATACTG-3'	5'-ATAGATCCGCCACCGAAATG-3'
XM_011427386	<i>CgOctβ2</i>	5'-AATCCAGCACACACTCCATAG-3'	5'-TCTGAGTCTCATCTGCGTTTG-3'
<i>Crassostrea gigas</i> housekeeping genes			
AB122066	<i>CgElongation Factor 1 (Efl)</i>	5'-ACCACCCTGGTGAGATCAAG-3'	5'-ACGACGATCGCATTCTCTT-3'
CAD67717	<i>CgGadph</i>	5'-CGTACCAGTTCAGATGTTTCC-3'	5'-GCCTTGATGGCTGCCTTAATA-3'
Z29546	<i>Cg28S</i>	5'-AAACACGGACCAAGGAGTCT-3'	5'-AGGCTGCCTTCACTTTCATT-3'

**Table S3.** Results of chronobiological analysis for the control condition and ALAN conditions at the group level. Rhythmic parameters are expressed as mean  $\pm$  standard error, where the standard error shows the daily variability (n = 7 days).

ALAN intensity (lx)	Period (h)	PR (%)	Amplitude (%)
0 lx	24.00 $\pm$ 0.02	79.80 $\pm$ 0.02	26.86 $\pm$ 1.61
0.1 lx	24.00 $\pm$ 0.02	71.20 $\pm$ 0.03	18.41 $\pm$ 1.45
1 lx	23.90 $\pm$ 0.04	33.90 $\pm$ 0.07	12.79 $\pm$ 2.43
10 lx	24.40 $\pm$ 0.04	46.80 $\pm$ 0.06	12.88 $\pm$ 0.87
25 lx	23.50 $\pm$ 0.05	29.40 $\pm$ 0.07	12.22 $\pm$ 2.01

ALAN intensity (lx)														
0 lx			0.1 lx			1 lx			10 lx			25 lx		
Period (h)	PR (%)	Amplitude (%)	Period (h)	PR (%)	Amplitude (%)	Period (h)	PR (%)	Amplitude (%)	Period (h)	PR (%)	Amplitude (%)	Period (h)	PR (%)	Amplitude (%)
23.7	62.62	46.7	24.3	38.78	40.2	23.9	20.46	18	23.8	15.40	24.6	20.9	13.67	21.7
23.3	18.57	22.8	23.7	20.28	29.4	23.5	26.14	31.6	22.4	18.10	26.7	23.8	42.58	43.5
24	75.95	56.9	24	38.74	37.2	24.1	15.37	25.9	23.5	17.51	24.7	22.8	20.74	26.7
25.9	24.84	28.5	23.9	60.09	49.8	22.9	16.00	25.5	25.3	18.12	26.3	12.3	–	–
23.7	47.88	38.8	23.7	18.23	26.4	23.4	15.35	25.2	24	32.67	37.2	7.55	–	–
24	28.21	25.7	24.1	16.64	27.4	23.3	24.82	26.7	24.4	22.51	29	10.1	–	–
24	36.84	38.7	24.2	60.73	51.1	24	48.08	45	8.6	–	–	12.2	–	–
24	61.35	49.9	23.8	26.86	28.5	11.8	–	–	17.4	–	–	17.1	–	–
23.9	62.35	48.7	24	16.71	19.6	7.96	–	–	33.2	–	–	12.1	–	–
25.1	33.97	28.9	24.9	39.95	41.8	9.69	–	–	18.1	–	–	10.9	–	–
24	23.76	30.8	23.1	21.88	30.3	12	–	–	12	–	–	17.4	–	–
24.2	41.95	37.1	16.5	–	–	8.37	–	–	12.6	–	–	n.s.	–	–
24.3	46.16	37.8	12.5	–	–	n.s.	–	–	n.s.	–	–	n.s.	–	–
24	26.95	30.3	12.1	–	–	n.s.	–	–	n.s.	–	–	n.s.	–	–
31.4	–	–	n.s.	–	–	n.s.	–	–	n.s.	–	–	n.s.	–	–
8.7	–	–	–	–	–	n.s.	–	–	n.s.	–	–	–	–	–

**Table S4.** Results of chronobiological analysis for the control condition and ALAN conditions at the individual level (n = 15-16 oysters / condition). The table indicates for the control condition and ALAN conditions: the period of rhythmic individuals (the periods out of the daily range of 24 – 28 h are in *italic*); and the percent rhythm (PR, %) and rhythm’s amplitude of individuals having a daily rhythm.



**Figure S4.** Relative mRNA expression level (expressed as mean  $\pm$  SE) between daytime and nighttime of eight clock and clock-associated genes according to ALAN intensities exposure. White bars indicate the gene level during daytime and, colored bars during nighttime. Differences between daytime and nighttime are significant for a  $p$ -value = 0.05.

## 4. Conclusion

Cette étude est la première à mettre en évidence les effets néfastes de LAN chez un bivalve dès l'intensité de 0.1 lx, qui est comparable à celle du *skyglow*. Jusqu'à présent, une seule étude portant sur les effets de LAN chez un bivalve, la moule *Mytilus edulis*, avait été réalisée mais en utilisant une intensité lumineuse unique relativement élevée de 19.86 lx et dont l'analyse était limitée (Christoforou et al., 2023). Le travail réalisé ici combine deux approches complémentaires (comportementale et moléculaire) permettant d'avoir une vision plus exhaustive de l'effet de LAN sur le rythme journalier de l'huitre *C. gigas*. Les résultats indiquent que LAN perturbe le comportement valvaire rythmique des huitres et l'expression de gènes de l'horloge moléculaire, suggérant son dysfonctionnement. Ces résultats permettent alors d'émettre l'hypothèse que les effets comportementaux observés ne seraient pas qu'une réaction directe à LAN, mais plutôt une conséquence de la perturbation du fonctionnement de l'horloge moléculaire. L'hypothèse émise au début de ce travail selon laquelle LAN aurait des effets intensité-dépendants a été vérifié pour un seul paramètre (pourcentage d'individus ayant un rythme journalier). Globalement, LAN affecte le rythme journalier des huitres dès l'intensité 0.1 lx, sans qu'il n'y ait d'effets intensité-dépendants significatifs, que ce soit pour les paramètres comportementaux ou moléculaires.

Cette étude s'est concentrée sur le rythme journalier de *C. gigas*. Cependant, il peut ne pas être le seul rythme impacté par LAN. Etant donné que les huitres synchronisent leur comportement valvaire avec les cycles lunaires et saisonniers, LAN pourrait perturber cette synchronisation, comme cela a déjà été montré chez d'autres organismes (Ayalon et al., 2021; Payton and Tran, 2019; Tidau et al., 2022). L'importance des rythmes biologiques dans l'organisation temporelle de la physiologie et la fitness des organismes a été largement établie (Hafker and Tessmar-Raible, 2020). Ainsi, la perturbation du rythme journalier de l'huitre peut avoir des conséquences désastreuses sur cet organisme clé des écosystèmes côtiers.

Pour aller plus loin dans la compréhension des effets de LAN sur *C. gigas*, après avoir étudié les effets en fonction de son intensité, j'ai étudié dans le chapitre suivant les effets de LAN en fonction de la qualité de la lumière, c'est-à-dire sa composition spectrale.

# Chapitre V

## Effets de la pollution lumineuse nocturne sur le rythme journalier de *C. gigas* en fonction de ses longueurs d’ondes

1. Préambule.....	127
2. Article: <i>The effects of Artificial Light at Night on behavioral rhythm and related gene expression are wavelength dependent in the oyster Crassostrea gigas</i> .....	129
3. Annexes.....	156
4. Conclusion.....	163

## 1. Préambule

Lors de l'étude précédente (Chapitre IV), l'effet de LAN sur le rythme journalier de l'huitre a été caractérisé selon son intensité lumineuse, indiquant que LAN perturbe ce rythme dès 0.1 lx. Une autre caractéristique de LAN qui peut avoir un effet important est la qualité de la lumière, c'est-à-dire la composition spectrale des longueurs d'ondes émises. Jouer sur la composition spectrale de LAN a été proposé comme stratégie d'atténuation de ses effets et peut être rendue possible grâce aux LEDs, qui ont la particularité d'être très modulables. L'idée est alors d'éclairer avec un spectre réduit, contenant uniquement les longueurs d'onde considérées comme les moins néfastes pour les organismes d'un environnement donné (Gaston, 2018). Etant donné la large diversité de sensibilité spectrale existante dans l'environnement, celle-ci doit être caractérisée pour un maximum d'organismes, dont la sensibilité à la lumière peut varier, pour que l'application de cette stratégie soit réellement bénéfique pour l'écosystème entier (Alaasam et al., 2021; Falcon et al., 2020). Cependant, très peu d'études évaluent les effets de LAN chez les organismes aquatiques en fonction de la longueur d'onde.

Ainsi, l'objectif du travail présenté dans ce chapitre est de contribuer à combler un vide dans la littérature en caractérisant les effets de LAN sur le rythme journalier de l'huitre en fonction de sa composition spectrale au niveau comportemental et moléculaire. Les effets de LAN monochromatiques seront comparés à ceux de LAN blanche (spectre complet du visible). Plus particulièrement, il s'agit ici de déterminer quelles couleurs testées ont les effets les moins importants et lesquelles ont les effets les plus importants. Les compositions spectrales testées ici sont un spectre de lumière blanche (410–680 nm) et trois spectres de lumière monochromatiques : une lumière bleue (447–511 nm), une lumière verte (494–554 nm) et une lumière rouge (594–640 nm). Pour chaque condition, l'intensité lumineuse de LAN est de 1 lx, choisie en s'appuyant sur les résultats de l'étude précédente (Chapitre IV). Il était primordial ici d'exposer les huitres à une intensité lumineuse de LAN faible et réaliste, mais suffisamment importante pour pouvoir dissocier les effets des différentes longueurs d'onde. Ainsi, l'intensité 1 lx a été choisie car elle a pour certains paramètres plus d'effets que l'intensité 0.1 lx en lumière blanche mais reste une intensité lumineuse faible et réaliste de LAN. L'hypothèse émise au début de ce travail est que les effets de LAN sur le rythme journalier de l'huitre dépendent de sa composition spectrale. Plus précisément, LAN composée uniquement de courtes longueurs d'onde aurait le plus d'effets néfastes puisque la lumière bleue sert de signal pour de multiples processus biologiques (Kaniewska et al., 2015; Leach and Reitzel, 2020; Rivas et al., 2015).


Ainsi, les longueurs d'onde intermédiaires (vertes) et longues (rouges) auraient les effets les moins importants (que la lumière bleue) puisqu'elles sont les moins énergétiques.




## 2. Article: The effects of Artificial Light at Night on behavioral rhythm and related gene expression are wavelength dependent in the oyster *Crassostrea gigas*.

Environmental Science and Pollution Research  
<https://doi.org/10.1007/s11356-023-30793-1>

RESEARCH ARTICLE



### The effects of artificial light at night on behavioral rhythm and related gene expression are wavelength dependent in the oyster *Crassostrea gigas*

Audrey Botte<sup>1</sup> · Laura Payton<sup>1</sup> · Damien Tran<sup>1</sup> 

Received: 7 June 2023 / Accepted: 27 October 2023  
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

**Abstract**  
 Artificial light at night (ALAN) constitutes a growing threat to coastal ecosystems by altering natural light cycles, which could impair organisms' biological rhythms, with resulting physiological and ecological consequences. Coastal ecosystems are strongly exposed to ALAN, but its effects on coastal organisms are poorly studied. Besides ALAN's intensity, ALAN's quality exposure may change the impacts on organisms. This study aims to characterize the effects of different ALAN's spectral compositions (monochromatic wavelength lights in red (peak at 626 nm), green (peak at 515 nm), blue (peak at 467 nm), and white (410–680 nm) light) at low and realistic intensity (1 lx) on the oyster *Crassostrea gigas* daily rhythm. Results reveal that all ALAN's treatments affect the oysters' daily valve activity rhythm in different manners and the overall expression of the 13 studied genes. Eight of these genes are involved in the oyster's circadian clock, 2 are clock-associated genes, and 3 are light perception genes. The blue light has the most important effects on oysters' valve behavior and clock and clock-associated gene expression. Interestingly, red and green lights also show significant impacts on the daily rhythm, while the lowest impacts are shown with the green light. Finally, ALAN white light shows the same impact as the blue one in terms of loss of rhythmic oysters' percentage, but the chronobiological parameters of the remaining rhythmic oysters are less disrupted than when exposed to each of the monochromatic light's treatments alone. We conclude that ALAN's spectral composition does influence its effect on oysters' daily rhythm, which could give clues to limit physiological and ecological impacts on coastal environments.

**Keywords** ALAN · Light spectrum · *Crassostrea gigas* · Circadian clock · Daily rhythm · Oyster behavior · Valvometry


**Introduction**  
 ALAN is a worldwide phenomenon whose amplitude is still growing since its radiance increases each year (1.8%) as well as lit areas (2.2%) (Falchi et al. 2016; Kyba et al. 2017). Despite some positive aspects for human activities (security, social activities, advertising, or aesthetic), nocturnal lighting constitutes a threat to public health and ecosystems by affecting organisms' physiology, behavior, communication, reproduction, or communities structure (Brayley et al. 2022; Sanders et al. 2021). To limit these harmful effects, mitigation strategies have been suggested by varying lighting intensity, spectrum, or duration (Gaston 2018). The growing use of light-emitting diodes (LEDs) can facilitate the application of these strategies since their lighting characteristics (intensity, timing, spectrum) can be easily modulated compared to previous lighting technologies (Gaston 2018). Narrow white LED spectrum to contain only the wavelengths least harmful to organisms in a given environment could mitigate the increasing ALAN impacts caused by the widespread use of white LED, which are rich in short wavelengths (Kyba 2018; Longcore and Rich 2016).  
 The increase in blue-rich sources of ALAN is shown to make brighter the anthropogenic nocturnal skyglow and can be even more harmful to marine organisms since blue and green ones can penetrate deeper in seawater, depending on its composition (Falcon et al. 2020). Finally, blue wavelengths are more susceptible to affect organisms' physiology since they are used as signals in many biological processes,

---

Responsible Editor: Philippe Garrigues

✉ Damien Tran  
 damien.tran@u-bordeaux.fr

<sup>1</sup> University of Bordeaux, CNRS, Bordeaux INP, EPOC, UMR 5805, 33120 Arcachon, France



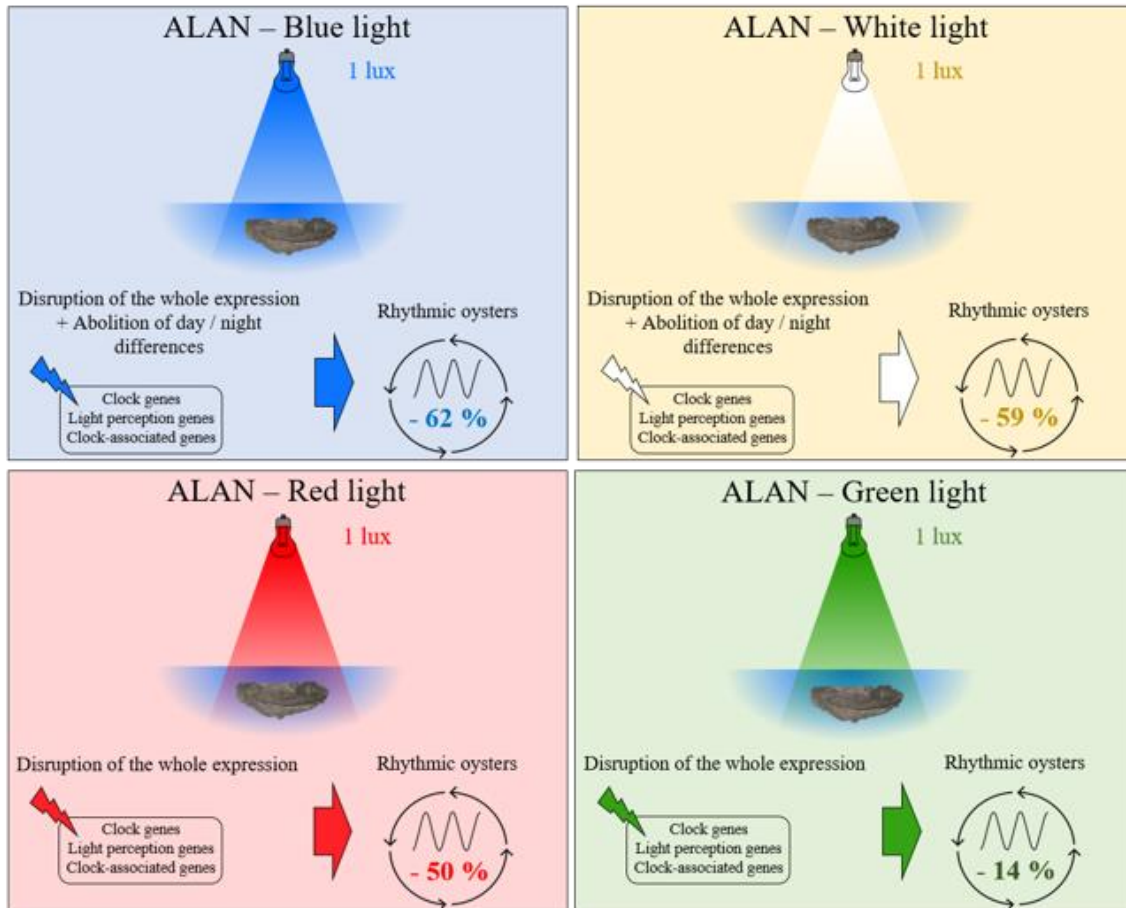
Botté, A., Payton, L., Tran, D. The effects of Artificial Light at Night on behavioral rhythm and related gene expression are wavelength dependent in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 10.1007/s11356-023-30793-1

## Abstract

Artificial Light At Night (ALAN) constitutes a growing threat to coastal ecosystems by altering natural light cycles, which could impair organisms' biological rhythms, with resulting physiological and ecological consequences. Coastal ecosystems are strongly exposed to ALAN but its effects on coastal organisms are poorly studied. Besides ALAN's intensity, ALAN's quality exposure may change the impacts on organisms. This study aims to characterize the effects of different ALAN's spectral compositions (monochromatic wavelength lights in red (594–640 nm, peak at 626 nm), green (494–554 nm, peak at 515 nm), blue (447–511 nm, peak at 467 nm) and white (410–680 nm, peak at 558 nm) light) at low and realistic intensity (1 lx) on the oyster *Crassostrea gigas* daily rhythm. Results reveal that all ALAN's treatments affect the oysters' daily valve activity rhythm in different manners and the overall expression of the 13 studied genes. 8 of these genes are involved in the oyster's clock functioning, 2 are clock associated genes and 3 are light perception genes. The blue light has the most important effects on oysters' valve behavior and clock and clock-associated gene expression. Interestingly, red and green lights also show significant impacts on the daily rhythm, while the lowest impacts are shown with the green light. Finally, ALAN white light shows the same impact as the blue one in terms of loss of rhythmic oysters' percentage, but the chronobiological parameters of the remaining rhythmic oysters are less disrupted than when exposed to each of the monochromatic light's treatments alone. We conclude that ALAN's spectral composition does influence its effect on oysters' daily rhythm, which could give clues to limit physiological and ecological impacts on coastal environments.

Keywords: ALAN, light spectrum, *Crassostrea gigas*, circadian clock, daily rhythm, oyster behavior, valvometry

Graphical abstract



## Introduction

ALAN is a worldwide phenomenon whose amplitude is still growing since its radiance increases each year (1.8%) as well as lit areas (2.2%) (Falchi et al., 2016; Kyba et al., 2017a). Despite some positive aspects for human activities (security, social activities, advertising, or aesthetic), nocturnal lighting constitutes a threat to public health and ecosystems by affecting organisms' physiology, behavior, communication, reproduction, or communities structure (Brayley et al., 2022; Sanders et al., 2021). To limit these harmful effects, mitigation strategies have been suggested by varying lighting intensity, spectrum, or duration (Gaston, 2018). The growing use of Light-Emitting Diodes (LEDs) can facilitate the application of these strategies since their lighting characteristics (intensity, timing, spectrum) can be easily modulated compared to previous lighting technologies (Gaston, 2018). Narrow white LED spectrum to contain only the wavelengths least harmful to organisms in a given environment could mitigate the increasing ALAN impacts caused by the widespread use of white LED, which are rich in short wavelengths (Kyba, 2018; Longcore and Rich, 2016).

The increase in blue-rich sources of ALAN is shown to make brighter the anthropogenic nocturnal skyglow and can be even more harmful to marine organisms since blue and green ones can penetrate deeper in seawater, depending on its composition (Falcon et al., 2020). Finally, blue wavelengths are more susceptible to affect organisms' physiology since they are used as signals in many biological processes, such as reproduction, daily activity patterns, or orientation (Kaniewska et al., 2015; Leach and Reitzel, 2020; Rivas et al., 2015).

Disruption of organisms' biological rhythms is an essential target of ALAN physiological and ecological putative damages. Biological rhythms are ubiquitous and arise from an autonomous internal clock present in each cell of organisms, coordinating physiological processes and behavior (Gaston et al., 2017). Endogenous clocks are synchronized by the environment using reliable cues such as daily, annual, or lunar natural light cycles, enabling organisms to anticipate predictable changes of their environment and to organize accordingly their biological processes, improving their fitness and survival. They are also crucial for synchronizing intra-specific interactions (reproduction) and inter-specific interactions (foraging and predation), and consequently play a major role in ecosystems' functionality (Gaston et al., 2017). However, by masking natural light cycles, ALAN impairs the synchronization of biological clocks. Considering the colossal diversity of light detection systems in the realm of life, organisms' spectral sensitivity needs to be characterized to successfully apply the alteration of ALAN spectral composition as a mitigation strategy (Alaasam et al., 2021; Falcon et al., 2020).

Coastal ecosystems are strongly exposed to ALAN with 1.6 million km<sup>2</sup> of the coastal seas affected by this phenomenon at 10 m depth (Smyth et al., 2021). The importance of studying ALAN's effects on coastal organisms has been addressed mainly recently and first studies show that ALAN affects a large diversity of coastal organisms (Davies et al., 2014; Hussein et al., 2021; Marangoni et al., 2022). A keystone species in coastal environments is the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, which is today the most globalized marine invertebrate, mainly due to its rapid growth and large tolerance to diverse environmental conditions (Ruesink et al., 2005). These advantages for culture also confer to wild oysters the ability to colonize diversified environments, making *C. gigas* an invasive species. Living in intertidal and subtidal areas and being a sessile mollusk, oysters are likely exposed to ALAN, which could disrupt their daily, lunar, and annual rhythms synchronized with natural variations of light (Payton et al., 2017a; Payton and Tran, 2019; Tran et al., 2020a). Moreover, genes involved in the clock mechanism of *C. gigas* and its light perception were sequenced (Payton et al., 2017b; Perrigault and Tran, 2017). Finally, it was recently shown that ALAN with a white spectrum disrupts the daily rhythm of oyster's valve activity as well as its molecular clock, starting from a low intensity of 0.1 lx (Botté et al., 2023a). Therefore, characterizing ALAN's effects on oysters according to its spectral composition could give supplementary clues to help preserve coastal ecosystems.

This study evaluates the effects of several monochromatic wavelengths of light (red, green, and blue wavelengths) and white light spectrum as sources of ALAN on the daily valve behavioral rhythm and mRNA level of genes involved in clockwork mechanism, light perception and melatonin synthesis of the oyster *C. gigas*. A low and realistic ALAN intensity of 1 lx was chosen according to Botté et al. (2023a) findings (Hänel et al., 2018; Rich and Longcore, 2006). The objective of this study is to establish if ALAN's spectral composition modulates in a specific manner its effects on the oysters' daily rhythm and to determine which ALAN wavelength is likely to cause the most and least damages. We hypothesized that ALAN effect on oyster's daily rhythm is wavelength dependent. Thus, we also hypothesize that ALAN blue and white lights have the most important effects, while the green and red lights would have the least harmful effects.

## Material and methods

### *Experimental procedure*

In this experiment, 160 oysters ( $85.2 \pm 0.8$  mm shell length;  $45.6 \pm 0.5$  mm shell width, mean  $\pm$  SE) were used, coming from an oyster's farm in Arcachon Bay (France) and collected at the Bay of Arguin (44.59; -1.24). Oysters were placed in group of 32 individuals into a tank (L x W x H: 74.8 x 54.8 x 40.8 mm) continuously supplied with natural oxygenized and filtered ( $< 1 \mu\text{m}$ ) seawater from the Arcachon Bay with a monitored temperature ( $T = 19.9 \pm 0.1$  °C). The tank was placed in an isolated room and equipped with an antivibration system to avoid external disturbances for the oysters. The experiments were performed in the Marine Station of Arcachon from June to October 2021. During the experiments, oysters were kept under a 12L:12D light cycle performed by programmable white LED light bars (MH3SP3 DSunY, 413–685 nm, peak at 553 nm; Fig. S1A). Daytime was from 06:00 to 18:00 h (all times noted in local time, UTC +2) (Fig. S2) during which the light intensity varied to mimic the natural light cycle with maximum intensity from 11:30 to 12:30 h of  $1514.0 \pm 140.6$  lx (mean  $\pm$  SE) (Tab. S1). The equivalent measured irradiance is  $170.60 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ . After 7 days of acclimation, oysters were exposed to 5 different conditions lasting 7 days each. There were 4 ALAN conditions in which oysters were exposed from 18:30 to 05:30 h to 4 different ALAN's spectral compositions (Fig. S1B and Fig. S2B) produced by LED strips (MiBoxer Mi-Light WL5): white light (410–680 nm, peak at 558 nm, 6000 K), red light (594–640 nm, peak at 626 nm), green light (494–554 nm, peak at 515 nm), and blue light (447–511 nm, peak at 467 nm). The ALAN intensity applied (1 lx) was chosen according to previous results (Botté et al., 2023a):  $1.41 \pm 0.08$  lx in white light,  $1.30 \pm 0.04$  lx in red light,  $1.19 \pm 0.05$  lx in green light, and  $1.32 \pm 0.05$  lx in blue light. Equivalent irradiance values were:  $0.04 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  in white light,  $0.05 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  in red light,  $0.03 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  in green light, and  $0.10 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  in blue light. Illuminances were measured underwater at the oysters' depth, at five positions in the tank (Fig. S3 and Tab. S1), using a handheld spectroradiometer (Blue-Wave UVN-100, StellarNet Inc.). Underwater irradiances were measured using a waterproofed handheld radiometer (MICRO Class, Profiling (in-water), E (irradiance) PAR sensor, Biospherical Instrument Inc.). The last condition was the control condition in which oysters weren't exposed to ALAN and thus were in the complete dark at night with a measured light intensity below 0.05 lx, which is the spectroradiometer detection limit (Fig. S2A). The oysters were not fed during the experiments to avoid any influence of potential food availability variations on their daily rhythmic behavior. The absence of food did

not influence the behavior of oysters since no modification of behavior was observed along the 16<sup>th</sup> days of the control experiment.

#### *Behavioral monitoring*

For each experiment, the valve activity of 16 oysters was continuously recorded using a High Frequency–Non Invasive (HFNI) valvometer technology (Tran et al., 2020a). It consists of lightweight electromagnets glued on each valve of each oyster between which an electromagnetic current is formed and allows to record each individual's valve activity every 4.8 s (Tran et al., 2023). Data were processed using Labview 8.0 (National Instrument, Austin, TX, USA). The studied valve activity parameter is the hourly Valve Opening Duration (VOD), meaning the percentage of time that each oyster spends with its valves open per hour. For instance, a VOD of 100% means that the individual spent an entire hour with its valves open.

#### *Chronobiological analyses*

From hourly VOD data, chronobiological analyses are conducted using the software Time Series Analysis Serie Cosinor 8.0 (Expert Soft Technologies) (for details, see Payton et al. (2017a)). The spectral method of the Lomb and Scargle periodogram was performed to search for a periodicity in the dataset, considering a periodicity as significant for  $p > 0.95$ . When a period was statistically validated, the dataset rhythmicity was modeled using the Cosinor model, which is characterized by its amplitude (difference between the rhythm highest value and average level), period (interval between two identical events), acrophase (the rhythm highest value), and mesor (the rhythm average level). This model gives another chronobiological parameter, the Percent Rhythm (PR), representing the percentage of cyclic behavior explained by the model, meaning the strength of the rhythm. These chronobiological analyses are conducted at the group and individual levels, two complementary approaches. Analyses at the group level are performed on the mean VOD of the oysters' group (without taking into account if the oysters are rhythmic individually), while analyses at the individual level are conducted on the VOD data of each individual having a significant daily rhythm (i.e. with a period ranging from 20 to 28 h).

#### *Molecular analyses*

On the 7<sup>th</sup> day of the experiment, the gill tissue of 8 oysters was sampled during daytime at 12:00 h and during nighttime at 20:00 h. They were stored in Tri Reagent (Invitrogen) at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analysis. From gills tissues, total RNA was extracted using a SV Total RNA Isolation System kit (Promega). The quantity and quality of the total RNA were evaluated by spectrophotometry (OD230, OD260, OD280). The RNA was reverse transcribed using

Goscript™ Reverse Transcription System kits (Promega). The next step was to perform Real-Time qPCR using the GoTaq® qPCR Master Mix kit (Promega). Primers sets of clock, clock-associated (*CgClock*, *CgBmal*, *CgCry2*, *CgPer*, *CgTim1*, *CgCry1*, *CgRev-erb*, *CgRor*, *CgHiomt-like*, *CgOctβ2*, *CgRhodopsin-like 1*, *CgRhodopsin-like 2*, *CgRhodopsin-like 3*), and housekeeping genes (*CgEfl*, *Cg28S*, *CgGadph*) used are described in the Tab. S2. The comparative Ct method  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001) was used to determine the relative mRNA expression level of studied genes, where  $\Delta Ct = Ct_{(\text{target gene})} - Ct_{(\text{housekeeping gene})}$ . Genes' expression levels were normalized using the geometric mean of the housekeeping genes *CgGadph* and *CgEfl*, based on stability values.

### *Statistical analyses*

Statistical analyses were performed using the software SigmaPlot (version 13.0; Systat Software, USA). T-tests were used for two groups' comparisons and One-Way ANOVA for multiple groups' comparisons, after checking prerequisites (homogeneity of variances, equal data). If the prerequisites were not validated, non-parametric tests were performed instead: Mann Whitney rank sum for two groups' comparisons and Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks for multiple groups' comparisons. A Three-Way ANOVA was performed on molecular analyses results after checking assumptions (homogeneity of variances, equal data). For One-Way and Three-Way ANOVA tests, if significant differences were found, the Fisher LSD test was performed for all pairwise multiple comparisons. In the case of a non-parametric Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks test, the Student-Newman-Keuls test was used for all pairwise multiple comparisons. For all test results, a difference was considered significant when  $p < 0.05$ .

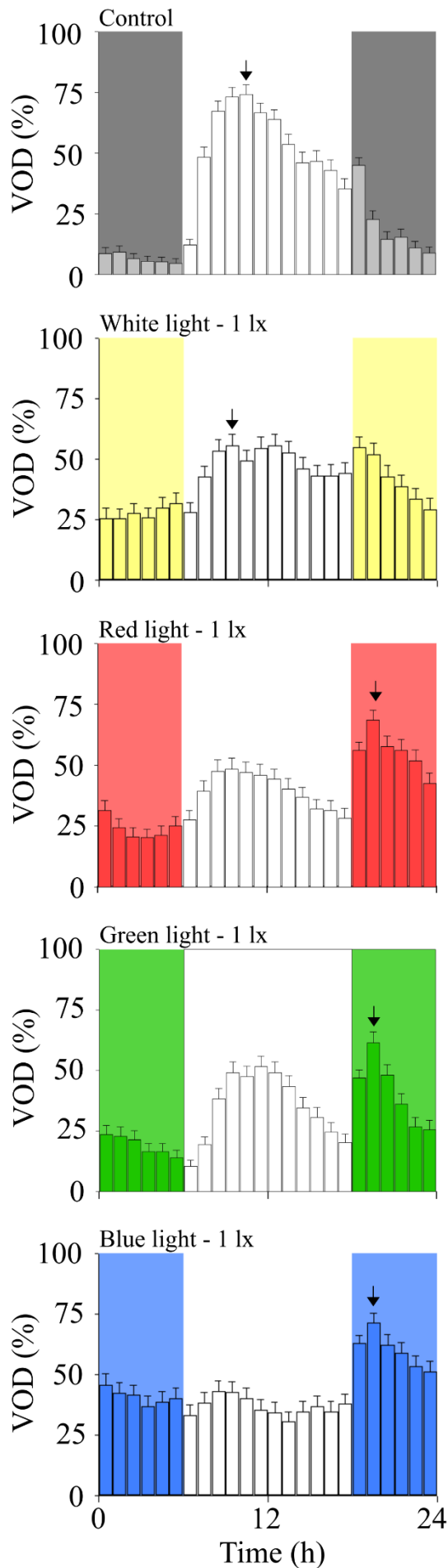
## **Results**

### **The oysters' valve activity is the most increased by ALAN in blue light**

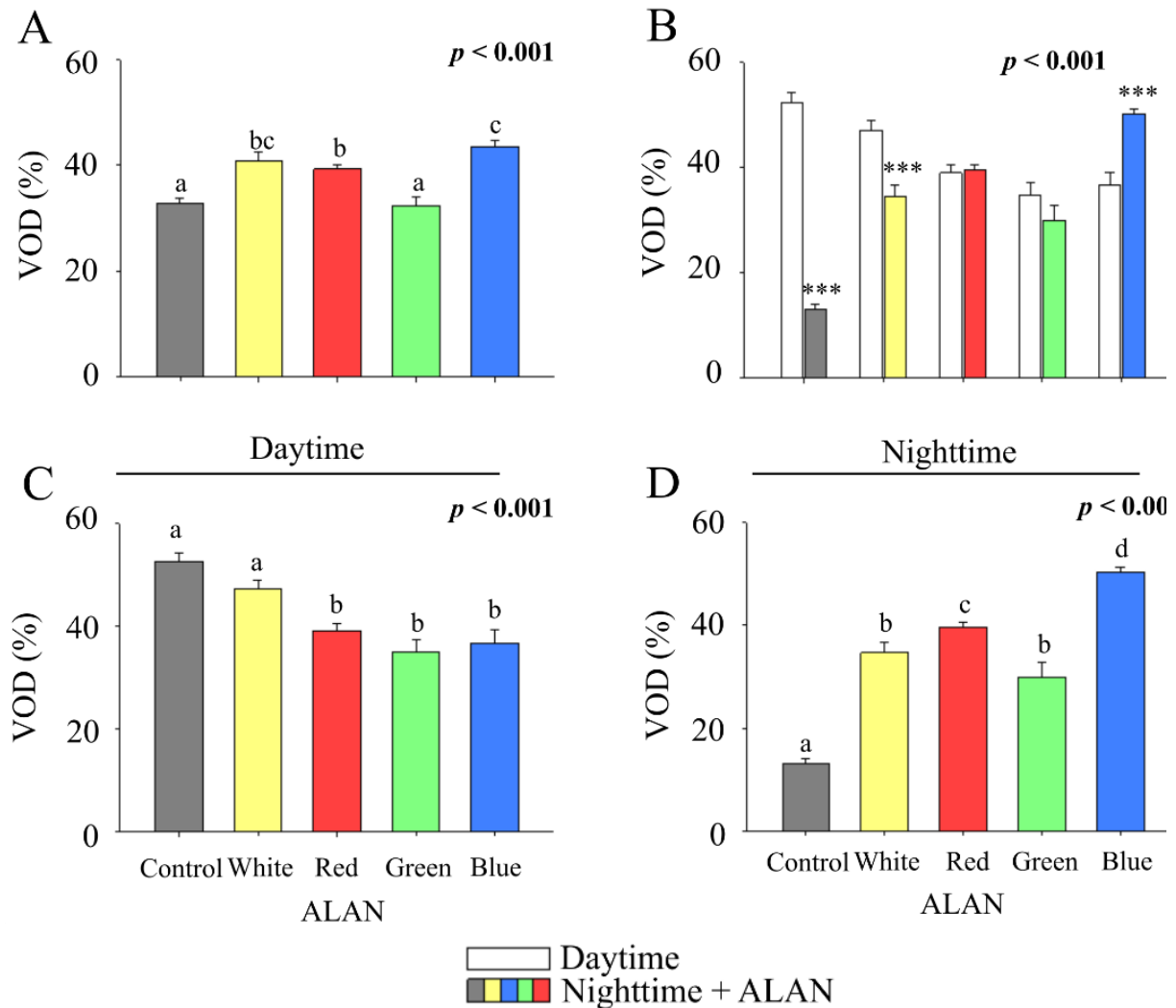
Figure 1 shows the overall oysters' behavioral mean daily pattern in the control condition and the four ALAN conditions. In the control condition, oysters exhibit a diurnal behavioral pattern with a daily VOD peak at 10–11 h. When exposed to ALAN, oysters show a disruption of their diurnal behavioral pattern for all ALAN's treatments. Mainly, the principal daily VOD peak shifts by 9 hours, being delayed from daytime to nighttime, for the red, green, and blue light treatments. In the white light treatment, the main VOD peak remains slightly dominant during daytime. The mean daily VOD (Fig. 2A) shows a significant increase when oysters are exposed



to ALAN, except for the green wavelength, with an increase significantly higher for the blue wavelength, and intermediate for the white light and the red wavelength ( $p < 0.001$ ). Figure 2B shows significant daytime / nighttime differences of the mean VOD in the control condition with an increase during daytime, expressing a diurnal pattern. When oysters are exposed to ALAN, this diurnal trend tends to decrease in the white light condition but disappears in the green and red wavelength treatments. Finally, when exposed to ALAN with the blue wavelength treatment, oysters change their behavior from a diurnal to a nocturnal pattern, characterized by a mean VOD significantly higher during nighttime than during daytime. During daytime, the figure 2C shows a significant decrease in oysters' mean VOD for the red, green, and blue wavelength treatments ( $p < 0.001$ ), but not for the white light treatment. On the contrary, during nighttime, the figure 2D reveals a significant increase in oysters' mean VOD for all ALAN treatments ( $p < 0.001$ ), with the smallest increase in the white and green light conditions, intermediate for the red wavelength and the highest for the blue wavelength.



**Figure 1.** Behavioral daily valve activity of oysters in the control condition (< 0.05 lx) and exposed to different ALAN spectral compositions (white light, and red, green, blue wavelengths) at an intensity of 1 lx at the depth of the oysters (n = 14–16 oysters / condition). Mean hourly valve opening duration (VOD, %) data are expressed as mean ± SE (n = 7 days). White backgrounds indicate daytime and black, yellow, red, green, and blue backgrounds indicate nighttime. Arrows show the peak of maximal hourly VOD during the day.



**Figure 2.** Effect of ALAN spectral composition on (A) the mean daily valve opening duration (VOD, %), (B) the mean VOD difference between daytime and nighttime, (C) the mean VOD during daytime, and (D) the mean VOD during nighttime. Data are expressed in mean  $\pm$  SE ( $n = 7$  days). Different letters indicate significant differences between ALAN conditions, and asterisks indicate significant differences between daytime and nighttime ( $p < 0.05$ ).

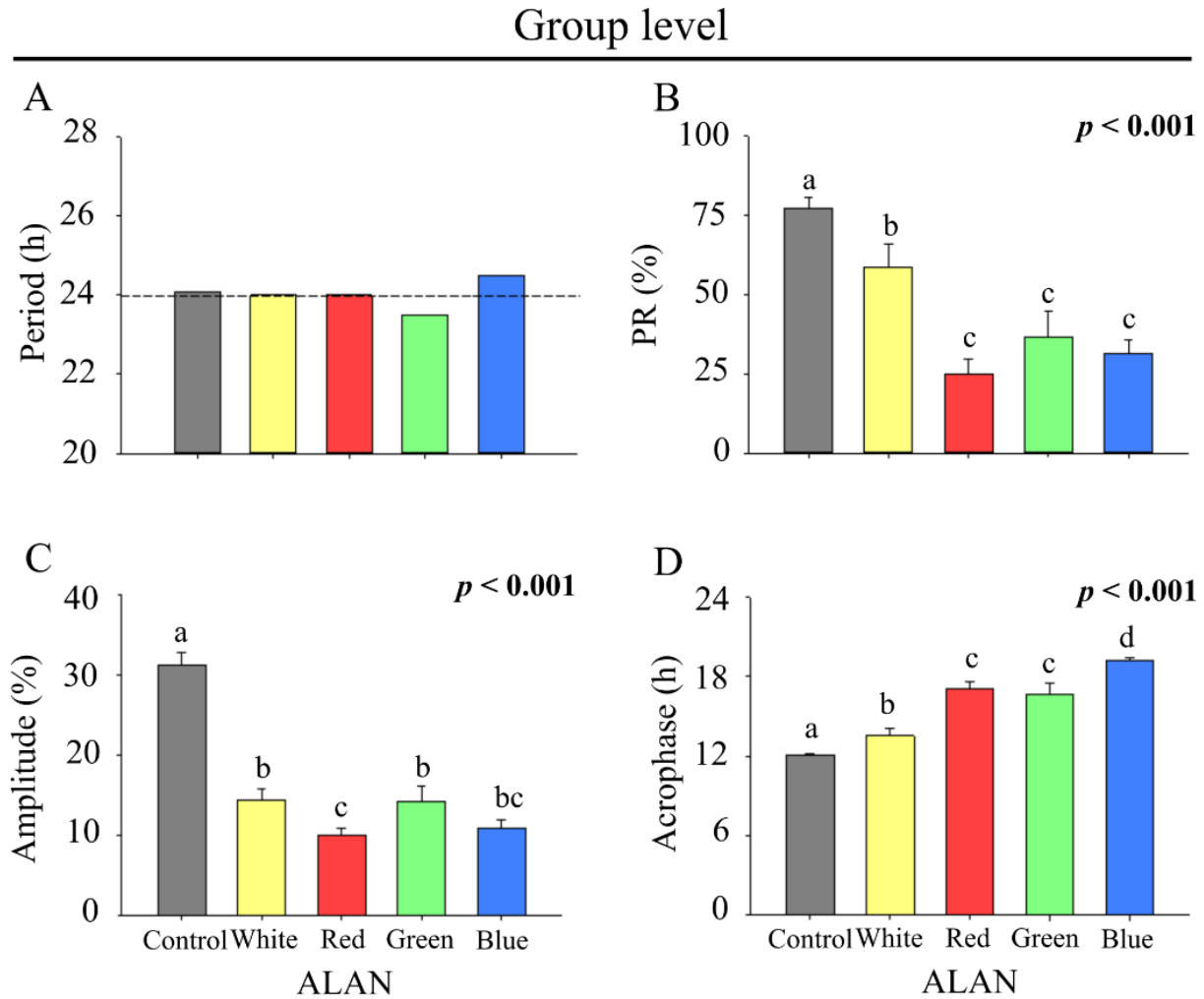
### The oysters’ behavioral daily rhythm is the most disrupted by ALAN in blue and white light

Figure 3 shows the results of the chronobiological parameters analyses (period, amplitude, acrophase, and percent rhythm (PR)), characterizing ALAN effects according to its spectral composition on the oysters’ daily behavioral rhythm at the group level (detailed results in Table S3). Oysters show a significant daily rhythm (rhythm with a period in the circadian range of 20-28 h) that persists for all conditions (Fig. 3A). However, all of the ALAN treatments affect the chronobiological parameters of this daily behavioral rhythm. The strength of the rhythm (PR) decreases significantly for all wavelengths tested, and also for the white light treatment

with a PR intermediate between the control and the monochromatic lights ( $p < 0.001$ ; Fig. 3B). ALAN also induces a significant decrease of the daily rhythm's amplitude. This decrease of amplitude is maximal in red and blue wavelength and is less intense in green and white lights ( $p < 0.001$ ; Fig. 3C). Finally, the results show a significantly delayed acrophase for all ALAN treatments, with a minimum shift in white light, intermediate in red and green wavelength conditions and maximal in the blue wavelength treatment ( $p < 0.001$ ; Fig. 3D). Then, chronobiological analyses were performed at the individual level (Fig. 4; detailed results in Table S4). Results show a decrease in the percentage of oysters having a significant daily behavioral rhythm according to the ALAN treatments (Fig. 4A). In the control condition, the percentage of oysters having a significant daily rhythm is 87.5 %. This percentage decreases to 75.0 %, 43.7 %, 35.7 %, and 33.3 % for the green, red, white, and blue light treatments, respectively, which corresponds to a loss of 14.3 %, 50.1 %, 59.2 %, and 61.9 % of individuals having a daily rhythm compared to the control. Therefore, ALAN with the blue and white light treatments cause the most important loss of oysters with a daily rhythm. Concerning oysters maintaining a daily behavioral rhythm, the chronobiological parameters are also disrupted by ALAN. The PR decreases significantly for the red, green, and blue wavelength conditions but not for the white light ( $p = 0.004$ ; Fig. 4B). The rhythm amplitude decreases significantly only for the green wavelength treatment ( $p = 0.022$ ; Fig. 4C). Finally, the acrophase significantly shifts to a later hour during nighttime for the red, green and blue wavelength treatments, but not for the white light condition ( $p = 0.038$ ; Fig. 4D).

### **The daytime/nighttime difference of relative expression of clock, light perception and clock-controlled genes is abolished by ALAN in blue and white light**

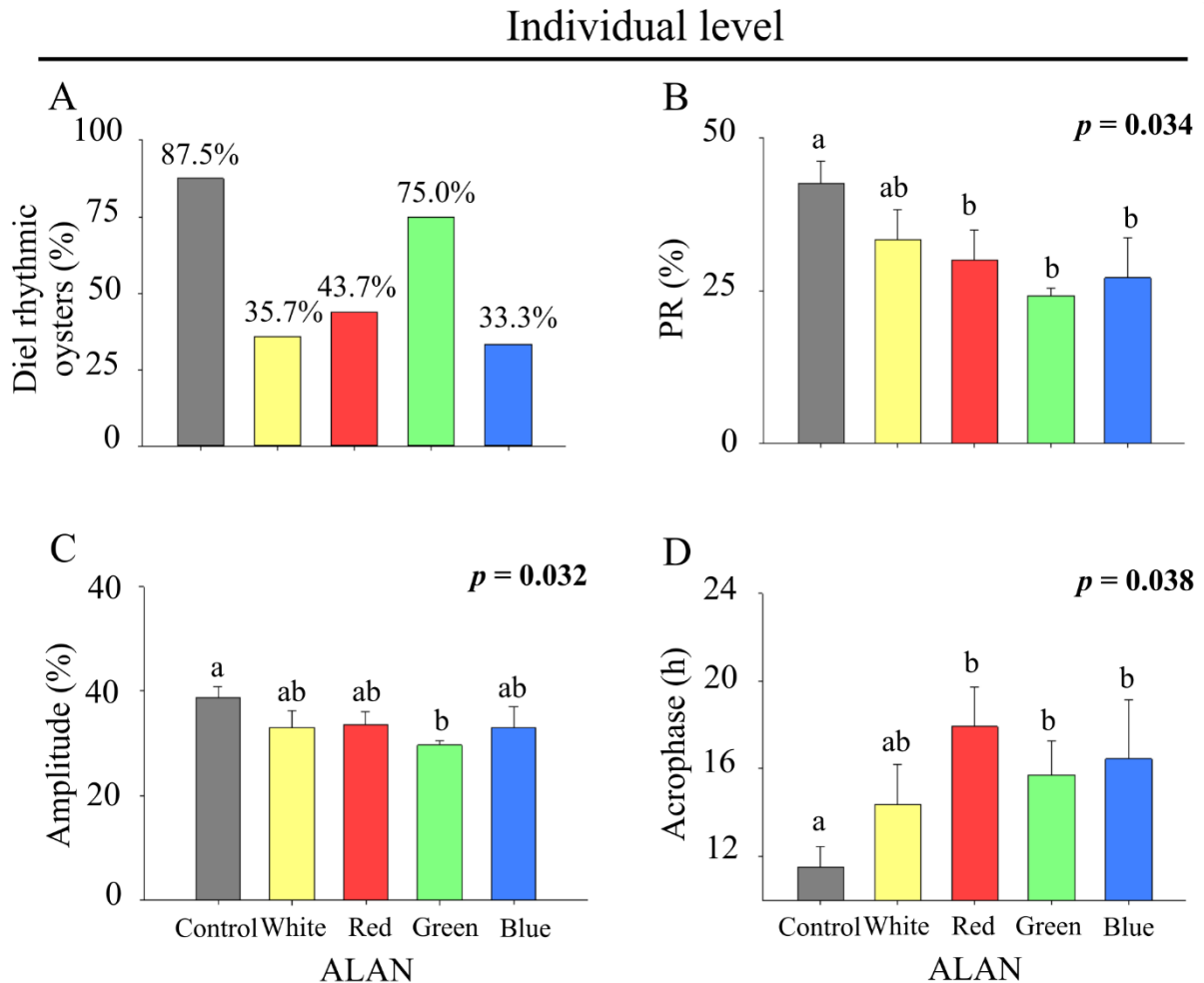
Figures 5 and S4 show the relative expression of thirteen clock (*CgClock*, *CgBmal*, *CgCry2*, *CgPer*, *CgTim1*, *CgCry1*, *CgRev-erb*, *CgRor*), clock-associated (*CgHiomt-like*, *CgOctβ2*), and putative light signalization (*CgRhodopsin-like 1*, *CgRhodopsin-like 2*, *CgRhodopsin-like 3*) genes for all conditions. For each gene, the left graph shows the daytime / nighttime expression difference while the middle and right graphs show the expression difference between the experimental conditions during daytime and nighttime respectively. ALAN affects the expression of three clock genes (*CgBmal*, *CgTim1*, *CgCry1*) and one clock-associated gene (*CgHiomt*) (Fig. 5). ALAN affects *CgBmal* expression during nighttime by causing a significant decrease only for the white light condition ( $p = 0.037$ ). Concerning *CgTim1*, its expression is significantly different between daytime and nighttime in the control condition, as well as in the red and blue wavelength treatments.

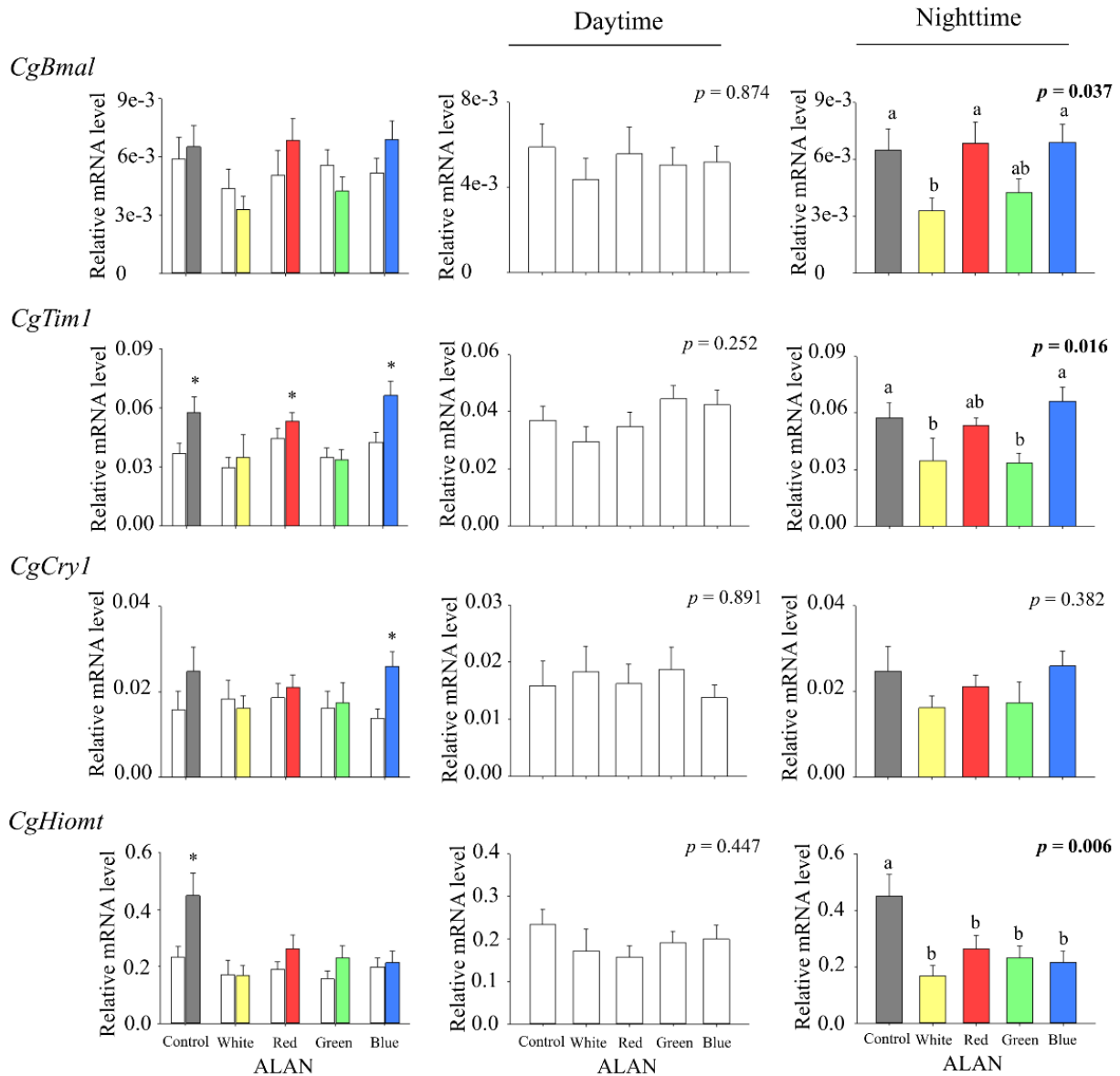


**Figure 3.** Effect of ALAN spectral composition (white light, and red, green, blue wavelengths) on chronobiological parameters of oysters' daily rhythm at the group level: (A) the period, (B) the percent rhythm (PR), (C) amplitude of the rhythm, (D) the acrophase of the rhythm. Data are expressed in mean  $\pm$  SE with the SE showing the daily variability of the group's significant rhythm parameters ( $n = 7$  days). Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

This daytime / nighttime difference is lost for the green and white light treatments, consequently to a decrease of the relative mRNA level during nighttime ( $p = 0.016$ ). The expression of *CgCry1* shows a significant daytime / nighttime difference for the blue wavelength treatment, which is not significant for the control condition and the other ALAN treatments. Finally, the clock-associated gene *CgHiomt* shows a gene expression significantly higher during nighttime compared to daytime in the control condition, and this daytime / nighttime difference disappears for all ALAN's treatments. Furthermore, there is a significant decrease, in comparison to the control condition, of *CgHiomt* expression during nighttime for all ALAN treatments ( $p =$

0.006). The figure S4 shows that the daytime or nighttime expression of the remaining five clock genes (*CgClock*, *CgCry2*, *CgPer*, *CgRev-erb*, *CgRor*), one clock-associated genes (*CgOctβ2*), and the three light perception genes (*CgRhodopsin-like 1*, *CgRhodopsin-like 2*, *CgRhodopsin-like 3*) is not affected by ALAN treatments ( $p > 0.05$ ).





**Figure 5.** Effect of ALAN spectral composition on the difference in relative mRNA level in oyster gills tissues, between daytime and nighttime (left column), between conditions during daytime (middle column), and between conditions during nighttime (right column) of four clock and clock-associated genes (mean  $\pm$  SE, n = 8 oysters). White bars indicate the gene level during daytime and, colored bars during nighttime. Asterisks indicate significant differences between daytime and nighttime, and different letters indicate differences between conditions ( $p < 0.05$ ).

To evaluate an overall effect on all genes expression of ALAN treatments, table 1 shows the results of a Three-Way ANOVA, testing the effects of ALAN treatments, the moment of the day (Daytime / Nighttime), and different gene expressions. This analysis reveals a significant ALAN effect on the overall mRNA level ( $p = 0.001$ ). More precisely, a significant difference in expression is observed between the control condition and all ALAN treatments, as well as

between the red wavelength and the white light treatments. This three-way ANOVA shows as well a significant difference in the overall gene expression between nighttime and daytime ( $p = 0.005$ ). Moreover, the interactions tested show a significant difference ( $p = 0.002$ ) in the overall mRNA level between daytime and nighttime in the control condition, as well as the red and green wavelength treatments. On the contrary, this daytime / nighttime difference in gene expression is abolished for the white ( $p = 0.213$ ) and blue light treatments ( $p = 0.081$ ).

**Table 1.** Three-Way Analysis of Variance testing the effect of the ALAN spectral composition (control condition, white light, and red, green, blue wavelengths), Daytime / Nighttime, and the genes, on the relative mRNA level on gill tissues of 13 clock and clock-associated genes. In bold, significant  $p$ -values ( $p < 0.05$ ).

Source of variation	$p$ -value
ALAN treatment	<b>0.001</b>
Control x White	<b>&lt;0.001</b>
Control x Red	<b>0.042</b>
Control x Green	<b>0.011</b>
Control x Blue	<b>0.005</b>
Red x White	<b>0.032</b>
Red x Green	0.984
Red x Blue	0.933
Green x White	0.499
Green x Blue	0.999
Blue x White	0.661
Daytime / Nighttime	<b>0.005</b>
Daytime / Nighttime x ALAN wavelength	<b>0.002</b>
Daytime / Nighttime within Control	<b>&lt;0.001</b>
Daytime / Nighttime within White	0.213
Daytime / Nighttime within Red	<b>0.004</b>
Daytime / Nighttime within Green	<b>&lt;0.001</b>
Daytime / Nighttime within Blue	0.081
Gene x Daytime / Nighttime x ALAN wavelength	<b>0.008</b>



## Discussion

This study aims to evaluate ALAN effects according to its spectral composition (red, green, blue monochromatic wavelengths and also full visible spectrum, i.e. white light), using LED technology lighting, on the daily rhythm of the oyster *C. gigas*. Results reveal that at 1 lx, all tested ALAN monochromatic wavelengths and white light deeply disrupt the oyster's behavioral daily rhythm as well as gene expression involved in the molecular circadian clock mechanism, and melatonin synthesis, and this with different effects according to ALAN' light quality.

First, a question that could be raised is if ALAN affects directly valve behavior or through a disruption of the clock mechanism. In this study, all ALAN's treatments affect oysters' behavioral daily rhythm and the overall expression of the thirteen studied genes (clock, clock-associated, and light perception genes). Therefore, ALAN's effects on oyster's behavior might not be due, or at least not only, to a direct reaction of oysters to nocturnal lighting, but to a disruption of their internal clock by ALAN. This finding has been already suggested by Botté et al. (2023a), which has evaluated ALAN's effects on oyster's daily rhythm according to its intensity. Previous results also revealed that the majority of ALAN's effects on oysters occurred starting from 0.1 lx. However, some observed ALAN's effects at the behavioral level occurred starting from the 1 lx intensity (Botté et al., 2023a). Here, we confirm that ALAN affects oysters' daily rhythm at 1 lx whatever the light quality.

Daily rhythms play a fundamental role in organisms to anticipate predictable changes in their environment and optimize their physiological and behavioral processes according to the moment of the day, improving then their fitness (Hafker and Tessmar-Raible, 2020). A clue supporting the idea that loss of fitness can result from the disruption of oysters' daily rhythm by ALAN is the impairment of diurnal behavior observed in our study. Indeed, oysters have been shown in the field to be nocturnal during autumn and winter, and diurnal during spring and summer. This annual alternation of daily behavior is suspected to have an internal origin and to be an adaptive advantage related to seasonal variations of phytoplankton availability and energy needs (Mat et al., 2012). Indeed, during spring and summer, the daytime is longer and the phytoplankton abundance is higher (Glé et al., 2008). Therefore being diurnal enable oysters to be open most of the day, increasing their ability to consume food in order to answer the high oyster's energy needs, mainly due to gametogenesis and growth (Enríquez-Díaz et al., 2008; Payton et al., 2017a). Thus, losing diurnal behavior or switching from a diurnal to a nocturnal activity pattern could impair food intake and thus induce an imbalance between energy

generation and metabolic demand. A second clue suggesting that physiological consequences can result from the disruption of oysters' daily rhythm is the significant decrease of the clock-associated gene *CgHiomt-like* expression during nighttime, whatever the ALAN spectral composition tested. Previous results have shown that ALAN in white spectrum also disrupts oysters *CgHiomt-like* gene expression starting from 0.1 lx (Botté et al., 2023a). This gene is a homolog of the mammalian gene *Hiomt*, involved in the melatonin synthesis directly under the control of the circadian clock. This hormone is involved in many physiological processes (homeostasis, reproduction, immunology ...). Its daily rhythmic synthesis is believed to give organisms information about day and night length (Tan et al., 2010). In oysters, even if the melatonin molecule has not been isolated, the presence of the gene *CgHiomt* strongly suggest that this organism produce melatonin. Thus, the disruption of the expression of the *CgHiomt* gene by ALAN lead us to believe that ALAN would induce a disruption of the melatonin synthesis, whatever its wavelength. Similar results have been found in aquatic species such as the fish *Rutilus rutilus* and *Perca fluviatilis*. ALAN in white, blue, red, and green lights at comparable intensities disrupted their melatonin production rhythm by decreasing its production (Bruning et al., 2016; Bruning et al., 2018b). Given the multiple physiological functions that melatonin fulfills, the impairment of the expression of the gene *CgHiomt-like*, involved in this molecule synthesis, could induce negative consequences on oyster physiology even though mitigation strategies focusing on ALAN's spectral composition or intensities are implemented. In addition to daily light cycles, oysters' behavior is synchronized with tidal, lunar or annual light cues. ALAN effects on these oysters' biological rhythms are currently not known and should be investigated.

Among the ALAN treatments, the blue and white light conditions have the most important effects on oysters' daily rhythm, while red wavelength induces intermediate effects and the green light treatment the least important effects. Indeed, for the blue and white lights only, results reveal an overall abolition of the daytime / nighttime gene expression difference as well as a stronger loss of rhythmic individuals. The blue wavelength causes the most impacting effects on the oysters' diurnal behavior by making it nocturnal and on most of the chronobiological parameters of the daily rhythm at the group (mesor, acrophase, PR), and individual levels (% rhythmic oysters, PR, acrophase in oysters that keep a daily rhythm). The second most harmful ALAN treatment is the white light since it causes a strong loss of rhythmic oysters in the same order as the blue wavelength treatment. But, unlike in the blue light condition, most of the chronobiological parameters at the group level (mesor, PR, acrophase)

are not significantly affected by the white light condition. This could be due to the few rhythmic individuals (35.7 %) that maintain a daily rhythm without significant impacts on chronobiological parameters. The red wavelength treatment shows intermediate effects on the oysters' daily rhythm at the group (mesor, acrophase) and individual levels (% rhythmic oysters). Finally, the green monochromatic light has the least important effects on the oysters' daily rhythm (mesor, amplitude). Especially, the green light condition causes a loss of only 14 % of oysters having a daily rhythm, while other monochromatic lights induce a loss of more than 50 %. The wavelengths in the green light range from 494 to 554 nm and thus contain some wavelengths belonging to the blue light (447–511 nm). Blue wavelengths having the most harmful effects on oysters, green light impacts might have been even lower if its spectrum had strictly contained wavelengths corresponding to a green light.

Although studies about the effects of different ALAN wavelengths on marine organisms remain scarce, oysters are not the only ones to show differential responses according to wavelengths. Christoforou et al. (2023) showed that ALAN (19.86 lx) affects the pattern of the valve activity (expressed as the gaping frequency) of the mussel *Mytilus edulis*. Mussels were less active in white and red ALAN with a decrease of gaping frequency by 32 % and 41 % respectively. However, when exposed to ALAN in green monochromatic wavelength, mussels were more active with a 10 % increase in the gaping frequency (Christoforou et al., 2023). Thus, these results show that changing the ALAN monochromatic wavelength can induce opposite effects on mussels' valve behavior, contrary to oysters, highlighting the diversity of responses to ALAN among ecosystems. However, the devices and methodology used by Christoforou et al. (2023) to measure mussels' valve activity were more invasive and less accurate than the ones used in this study. Another marine organism able to discriminate wavelengths and to have a greater sensitivity to short wavelengths like oysters is the sea anemone *Nematostella vectensis* (Leach and Reitzel, 2020). Indeed, the blue light is able to entrain a circadian activity profile in *N. vectensis*, contrary to the red one: *N. vectensis* expresses under red light an activity profile following the one expressed under constant darkness, suggesting a low sensitivity to the red light. In oysters, this red monochromatic wavelength shows intermediate but significant effects on the behavioral daily rhythm and impacts the overall gene expression. This impact on gene expression has also been revealed by Leach and Reitzel (2020) on *N. vectensis* even if behavioral effects were absent. In oysters, in contrast to the red light, the green wavelength is efficient to entrain a circadian activity in the sea anemone, while oysters were the least sensitive to it. Contrary to our study, Li et al. (2022) demonstrated that ALAN's effects on the

reproduction, development, and defenses in response to predation risk of the freshwater crustacean *Daphnia magna* were the least important when using a blue light compared to white, red, or green lights. Bruning et al. (2016) made the same analysis in the European perch *Perca fluviatilis* by studying ALAN effects in blue, green, and red wavelengths at comparable intensities on melatonin production. All ALAN's wavelengths tested induced a disruption of the European perch daily melatonin synthesis rhythm. Also, a loss of daily rhythmicity of melatonin concentration for the green and red wavelength treatments are shown, whereas under the blue wavelength, the melatonin production was reduced but kept its daily rhythmicity (Bruning et al., 2016).

Therefore, our study shows that the oyster *C. gigas* perceives light even though it's an eyeless organism, contrary to other bivalve mollusks such as hammer oysters or scallops for instance, which possess more or less primitive eyes (Audino et al., 2020). Photoreceptors along with photopigments can be associated with an eye structure or not and therefore be visual or not visual (Falcon et al., 2020). Each cell is able of non-visual photodetection by using photoreceptors such as the cryptochrome, which is usually involved in the internal clock molecular machinery (Cronin and Johnsen, 2016; Falcon et al., 2020). Another example is the opsins, which are the most widespread and diverse photopigments family that can be involved in visual or non-visual functions (Cronin and Johnsen, 2016). This ability to detect light without an eye is of great importance since it enables oysters to synchronize their internal clock with daily, lunar, or seasonal natural light cycles (Mat et al., 2012; Payton et al., 2017a; Payton and Tran, 2019). Light detection in organisms without visual structures is also found for example in corals, which are able to detect light intensity as low as moonlight (Kaniewska et al., 2015). Here, we learn a bit more about the ability of the eyeless *C. gigas* to perceive light since our study shows that they react differently according to the wavelength. Oysters seem to have a higher sensitivity to the blue wavelength, a moderate sensitivity to the red wavelength, and the lowest sensitivity to the green wavelength. These wavelength-dependent effects do not result from the penetration difference between wavelengths occurring in seawater since the 1 lux intensity was measured at the depth of the oysters for all tested wavelengths. Therefore, the wavelength-dependent effects result from real biological reactions due to the spectral sensitivity of oysters' photoreceptors. One of them is the cryptochrome 1, which is known to be involved in the entrainment of oysters' daily rhythm (Mat et al., 2016; Perrigault and Tran, 2017). Even if its spectral sensitivity in oysters isn't established, cryptochromes are believed to be receptors of blue and ultraviolet lights (Lin and Todo, 2005). Here, ALAN affects the cryptochrome

l'expression only in the blue wavelength condition and therefore might explain that oysters' daily rhythm is more sensitive to short wavelengths. In addition to cryptochrome, other known oysters' photoreceptors might be involved in the light-entrainment of *C. gigas* daily rhythm and therefore in its spectral sensitivity, such as rhodopsin (Wu et al., 2018). For instance, in *Drosophila melanogaster* rhodopsins seem to play a role in the light-entrainment of its internal clock in addition to cryptochromes (Senthilan et al., 2019). Another example is the marine bristle worm *Platynereis dumerilii*, which reproduces by synchronized swarming followed by nocturnal mass spawning during specific nights of the month and especially specific hours during these nights (Poehn et al., 2022; Zurl et al., 2022). To synchronize this process, two distinct photoreceptors interact: a cryptochrome (L-Cry) is used to discriminate sunlight versus moonlight and an opsin (r-Opn1) is used to sense moonrise (Zurl et al., 2022). Here, the expression of the three studied rhodopsin-like genes in oyster gills was not affected by ALAN's treatments and thus does not seem to be involved in the disruption mechanism of the oysters' daily rhythm. However, cryptochrome and rhodopsins might not be the only non-visual photoreceptors in oysters to be involved in the daily rhythm light-entrainment, since a large diversity of them exists in the opsin family for instance (Falcon et al., 2020). On the thirteen genes studied the expression of only four of them is significantly affected by ALAN while the expression of five clock, one clock associated and the 3 light perception genes are not affected by ALAN treatments. This weak molecular response to ALAN could be due to the fact that oysters have been sampled at only two-time points over the daily cycle. For instance, investigating the genes relative expression at more than 6 point could have allowed us to detect changes in the genes' rhythm of expression. Thus, here with only two-time points we could have missed a stronger molecular response. Finally, a stronger transcriptional response might also be observed in other tissues, such as the mantle edge, which is, as the gills, at the interface between the environment and more inner tissue.

## Conclusion

This study contributes to fill a gap by characterizing the effects of different ALAN monochromatic wavelengths on a marine bivalve, the oyster *Crassostrea gigas*, a key species of coastal ecosystems. Results reveal that ALAN's effects on oysters' daily rhythm are influenced by its wavelength at the behavioral and molecular levels with the blue monochromatic wavelength and the white light having the most deleterious effects, while the

green wavelength seems to have the least important impact. Thus, to limit ALAN's effects on oysters by altering its spectral composition, green nocturnal lighting could be used, instead of the red one usually advocated. Considering ALAN harmful effects on oysters' daily rhythm and its potential physiological and ecological consequences, which need to be investigated, limiting ALAN effects on coastal organisms is of great importance and this study gives a clue to reduce its impact. However, other studies need to complete our knowledge concerning the diversity of spectral sensitivities among coastal organisms to find an ALAN spectral composition affecting the least the coastal communities.

## References

- Alaasam VJ, Kernbach ME, Miller CR, Ferguson SM (2021) The Diversity of Photosensitivity and its Implications for Light Pollution. *Integr Comp Biol* 61(3): 1170-1181. 10.1093/icb/icab156
- Audino, J.A., Serb, J.M., Marian, J., 2020. Hard to get, easy to lose: Evolution of mantle photoreceptor organs in bivalves (Bivalvia, Pteriomorpha). *Evolution* 74(9), 2105-2120. 10.1111/evo.14050
- Botté, A., Payton, L., Tran, D., 2023. Artificial light at night at environmental intensities disrupts daily rhythm of the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Pollut. Bull.* 191, 114850. 10.1016/j.marpolbul.2023.114850
- Brayley, O., How, D.M., Wakefield, D.A., 2022. Biological Effects of Light Pollution on Terrestrial and Marine Organisms. *Int. J. Sustain. Light.* 24(1), 13-38. 10.26607/ijsl.v24i1.121
- Bruning, A., Holker, F., Franke, S., Kleiner, W., Kloas, W., 2016. Impact of different colours of artificial light at night on melatonin rhythm and gene expression of gonadotropins in European perch. *Sci Total Environ* 543(Pt A), 214-222. 10.1016/j.scitotenv.2015.11.023
- Bruning, A., Holker, F., Franke, S., Kleiner, W., Kloas, W., 2018. Influence of light intensity and spectral composition of artificial light at night on melatonin rhythm and mRNA expression of gonadotropins in roach *Rutilus rutilus*. *Fish. Physiol. Biochem.* 44(1), 1-12. 10.1007/s10695-017-0408-6

- Christoforou, E., Dominoni, D., Lindström, J., Diamantopoulou, C., Czyzewski, J., Mirzai, N., Spatharis, S., 2023. The effects of artificial light at night (ALAN) on the gaping activity and feeding of mussels. 10.1101/2023.03.10.532051
- Cronin, T.W., Johnsen, S., 2016. Extraocular, Non-Visual, and Simple Photoreceptors: An Introduction to the Symposium. *Integr Comp Biol* 56(5), 758-763. 10.1093/icb/icw106
- Davies, T.W., Duffy, J.P., Bennie, J., Gaston, K.J., 2014. The nature, extent, and ecological implications of marine light pollution. *Front. Ecol. Environ.* 12(6), 347-355. 10.1890/130281
- Enríquez-Díaz, M., Pouvreau, S., Chávez-Villalba, J., Le Pennec, M., 2008. Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquac. Int.* 17(5), 491-506. 10.1007/s10499-008-9219-1
- Falchi, F., Cinzano, P., Duriscoe, D., Kyba, C.C., Elvidge, C.D., Baugh, K., Portnov, B.A., Rybnikova, N.A., Furgoni, R., 2016. The new world atlas of artificial night sky brightness. *Sci Adv* 2(6), e1600377. 10.1126/sciadv.1600377
- Falcon, J., Torriglia, A., Attia, D., Vienot, F., Gronfier, C., Behar-Cohen, F., Martinsons, C., Hicks, D., 2020. Exposure to Artificial Light at Night and the Consequences for Flora, Fauna, and Ecosystems. *Front Neurosci* 14, 602796. 10.3389/fnins.2020.602796
- Gaston, K.J., Davies, T.W., Nedelec, S.L., Holt, L.A., 2017. Impacts of Artificial Light at Night on Biological Timings. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 48(1), 49-68. 10.1146/annurev-eolsys-110316-022745
- Gaston, K.J., 2018. Lighting up the nighttime. *Science* 362(6416), 744-746. 10.1126/science.aau8226
- Glé, C., Del Amo, Y., Sautour, B., Laborde, P., Chardy, P., 2008. Variability of nutrients and phytoplankton primary production in a shallow macrotidal coastal ecosystem (Arcachon Bay, France). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 76(3), 642-656. 10.1016/j.ecss.2007.07.043
- Hafker, N.S., Tessmar-Raible, K., 2020. Rhythms of behavior: are the times changin'? *Curr Opin Neurobiol* 60, 55-66. 10.1016/j.conb.2019.10.005
- Hänel, A., Posch, T., Ribas, S.J., Aubé, M., Duriscoe, D., Jechow, A., Kollath, Z., Lolkema, D.E., Moore, C., Schmidt, N., Spoelstra, H., Wuchterl, G., Kyba, C.C.M., 2018. Measuring night sky brightness: methods and challenges. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 205, 278-290. 10.1016/j.jqsrt.2017.09.008
- Hussein, A.A.A., Bloem, E., Fodor, I., Baz, E.S., Tadros, M.M., Soliman, M.F.M., El-Shenawy, N.S., Koene, J.M., 2021. Slowly seeing the light: an integrative review on ecological

- light pollution as a potential threat for mollusks. *Environ Sci Pollut Res Int* 28(5), 5036-5048. 10.1007/s11356-020-11824-7
- Kaniewska, P., Alon, S., Karako-Lampert, S., Hoegh-Guldberg, O., Levy, O., 2015. Signaling cascades and the importance of moonlight in coral broadcast mass spawning. *Elife* 4. 10.7554/eLife.09991
- Kyba, C.C.M., Kuester, T., Sanchez de Miguel, A., Baugh, K., Jechow, A., Holker, F., Bennie, J., Elvidge, C.D., Gaston, K.J., Guanter, L., 2017. Artificially lit surface of Earth at night increasing in radiance and extent. *Sci. Adv.* 3(11), e1701528. 10.1126/sciadv.1701528
- Kyba, C.C.M., 2018. Is light pollution getting better or worse? *Nat Astron* 2(4), 267-269. 10.1038/s41550-018-0402-7
- Leach, W.B., Reitzel, A.M., 2020. Decoupling behavioral and transcriptional responses to color in an eyeless cnidarian. *BMC Genom* 21(1), 361. 10.1186/s12864-020-6766-y
- Li, D., Huang, J., Zhou, Q., Gu, L., Sun, Y., Zhang, L., Yang, Z., 2022. Artificial Light Pollution with Different Wavelengths at Night Interferes with Development, Reproduction, and Antipredator Defenses of *Daphnia magna*. *Environ Sci Technol* 56(3), 1702-1712. 10.1021/acs.est.1c06286
- Lin, C., Todo, T., 2005. The cryptochromes. *Genome Biol* 6(5), 220. 10.1186/gb-2005-6-5-220
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4), 402-408. 10.1006/meth.2001.1262
- Longcore, T., Rich, C., 2016. Artificial night lighting and protected lands: Ecological effects and management approaches. Natural Resource Report NPS/NRSS/NSNS/NRR—2016/1213. National Park Service, F.C., Colorado.
- Marangoni, L.F.B., Davies, T., Smyth, T., Rodriguez, A., Hamann, M., Duarte, C., Pendoley, K., Berge, J., Maggi, E., Levy, O., 2022. Impacts of artificial light at night in marine ecosystems-A review. *Glob Chang Biol.* 10.1111/gcb.16264
- Mat, A.M., Massabuau, J.C., Ciret, P., Tran, D., 2012. Evidence for a plastic dual circadian rhythm in the oyster *Crassostrea gigas*. *Chronobiol. Int.* 29(7), 857-867. 10.3109/07420528.2012.699126
- Mat, A.M., Perrigault, M., Massabuau, J.C., Tran, D., 2016. Role and expression of cry1 in the adductor muscle of the oyster *Crassostrea gigas* during daily and tidal valve activity rhythms. *Chronobiol. Int.* 33(8), 949-963. 10.1080/07420528.2016.1181645



- Payton, L., Sow, M., Massabuau, J.C., Ciret, P., Tran, D., 2017a. How annual course of photoperiod shapes seasonal behavior of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. PLoS One 12(10), e0185918. 10.1371/journal.pone.0185918
- Payton, L., Perrigault, M., Hoede, C., Massabuau, J.C., Sow, M., Huvet, A., Boullot, F., Fabioux, C., Hegaret, H., Tran, D., 2017b. Remodeling of the cycling transcriptome of the oyster *Crassostrea gigas* by the harmful algae *Alexandrium minutum*. Sci. Rep. 7(1), 3480. 10.1038/s41598-017-03797-4
- Payton, L., Tran, D., 2019. Moonlight cycles synchronize oyster behaviour. Biol. Lett. 15(1), 20180299. 10.1098/rsbl.2018.0299
- Perrigault, M., Tran, D., 2017. Identification of the Molecular Clockwork of the Oyster *Crassostrea gigas*. PLoS One 12(1), e0169790. 10.1371/journal.pone.0169790
- Poehn, B., Krishnan, S., Zurl, M., Coric, A., Rokvic, D., Hafker, N.S., Jaenicke, E., Arboleda, E., Orel, L., Raible, F., Wolf, E., Tessmar-Raible, K., 2022. A Cryptochrome adopts distinct moon- and sunlight states and functions as sun- versus moonlight interpreter in monthly oscillator entrainment. Nat Commun 13(1), 5220. 10.1038/s41467-022-32562-z
- Rich, C., Longcore, T. Rich, C., Longcore, T., 2006. Ecological Consequences of Artificial Night Lighting. Island Press.
- Rivas, M.L., Santidrián Tomillo, P., Diéguez Uribeondo, J., Marco, A., 2015. Leatherback hatchling sea-finding in response to artificial lighting: Interaction between wavelength and moonlight. J Exp l Mar Biol Ecol 463, 143-149. 10.1016/j.jembe.2014.12.001
- Ruesink, J.L., Lenihan, H.S., Trimble, A.C., Heiman, K.W., Micheli, F., Byers, J.E., Kay, M.C., 2005. Introduction of Non-Native Oysters: Ecosystem Effects and Restoration Implications. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 36(1), 643-689. 10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152638
- Sanders, D., Frago, E., Kehoe, R., Patterson, C., Gaston, K.J., 2021. A meta-analysis of biological impacts of artificial light at night. Nat. Ecol. Evol. 5(1), 74-81. 10.1038/s41559-020-01322-x
- Senthilan, P.R., Grebler, R., Reinhard, N., Rieger, D., Helfrich-Forster, C., 2019. Role of Rhodopsins as Circadian Photoreceptors in the *Drosophila melanogaster*. Biology (Basel) 8(1). 10.3390/biology8010006
- Smyth, T.J., Wright, A.E., McKee, D., Tidau, S., Tamir, R., Dubinsky, Z., Iluz, D., Davies, T.W., 2021. A global atlas of artificial light at night under the sea. Elementa: Science of the Anthropocene. 9(1). 10.1525/elementa.2021.00049

- Tan, D.X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Paredes, S.D., Korkmaz, A., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Fuentes-Broto, L., Reiter, R.J., 2010. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev Camb Philos Soc* 85(3), 607-623. 10.1111/j.1469-185X.2009.00118.x
- Tran, D., Perrigault, M., Ciret, P., Payton, L., 2020. Bivalve mollusc circadian clock genes can run at tidal frequency. *Proc. Biol. Sci.* 287(1918), 20192440. 10.1098/rspb.2019.2440
- Tran, D., Andrade, H., Camus, L., Leopold, P., Ballantine, C., Berge, J., Durier, G., Sow, M., Ciret, P., 2023. Evidence of separate influence of moon and sun on light synchronization of mussel's daily rhythm during the polar night. *iScience* 26(3), 106168. 10.1016/j.isci.2023.106168
- Wu, C., Jiang, Q., Wei, L., Cai, Z., Chen, J., Yu, W., He, C., Wang, J., Guo, W., Wang, X., 2018. A Rhodopsin-Like Gene May Be Associated With the Light-Sensitivity of Adult Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Front Physiol* 9, 221. 10.3389/fphys.2018.00221
- Zurl, M., Poehn, B., Rieger, D., Krishnan, S., Rokvic, D., Veedin Rajan, V.B., Gerrard, E., Schlichting, M., Orel, L., Coric, A., Lucas, R.J., Wolf, E., Helfrich-Forster, C., Raible, F., Tessmar-Raible, K., 2022. Two light sensors decode moonlight versus sunlight to adjust a plastic circadian/circalunidian clock to moon phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 119(22), e2115725119. 10.1073/pnas.2115725119

## **Author contributions**

Study conception, design and methodology, D.T., A.B., L.P.; experimentation, A.B., D.T.; molecular analysis: A.B., L.P.; data treatment, A.B.; interpretation, A.B., D.T., L.P.; manuscript writing, A.B.; review and editing, all authors; funding, D.T. All authors contributed critically to the drafts, and gave final approval for publication.

## **Funding**

This work was supported by the financial support of the French Nation Research Agency (ANR), LUCIOLE project (ANR-22-CE34-0010-01) and a Bordeaux University PhD scholarship for A. Botté.

## **Data availability**

Data that support the findings of this study are available upon reasonable request.

## **Declarations**

### **Ethics Approval**

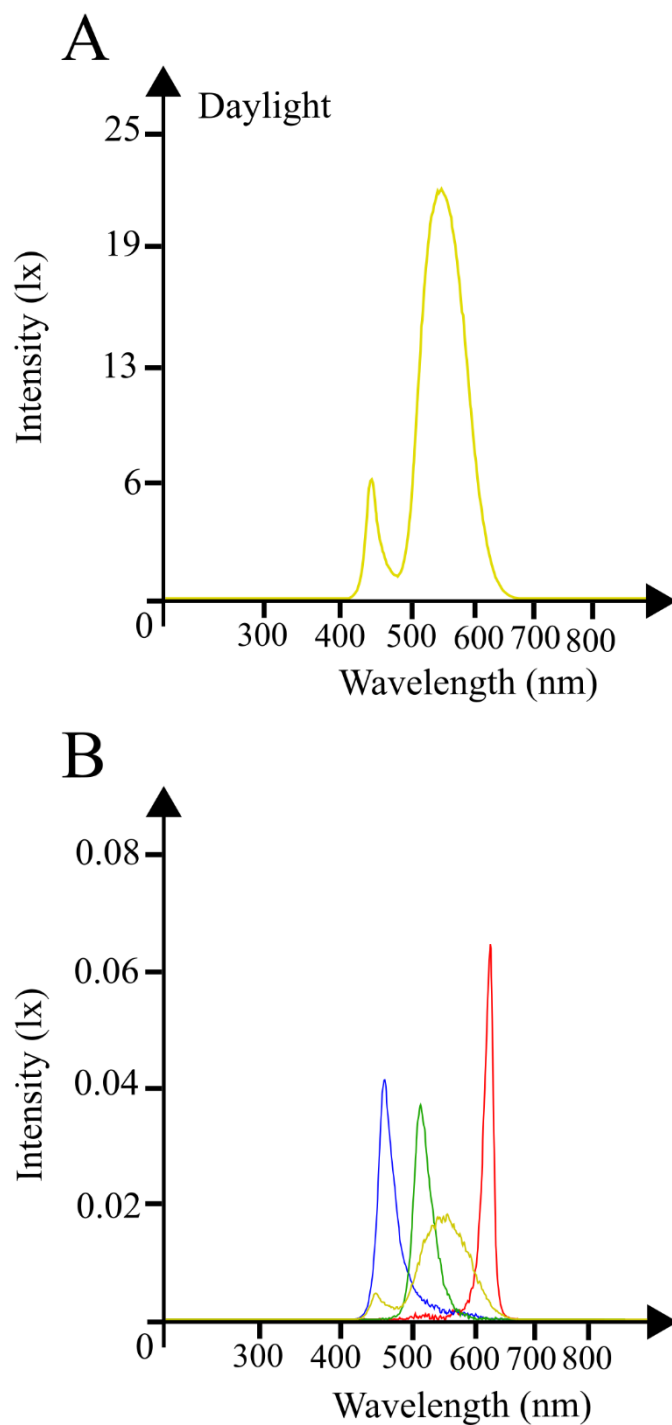
All experiments complied with the laws in effect in France and they conformed to international ethical standards.

### **Consent to participate**

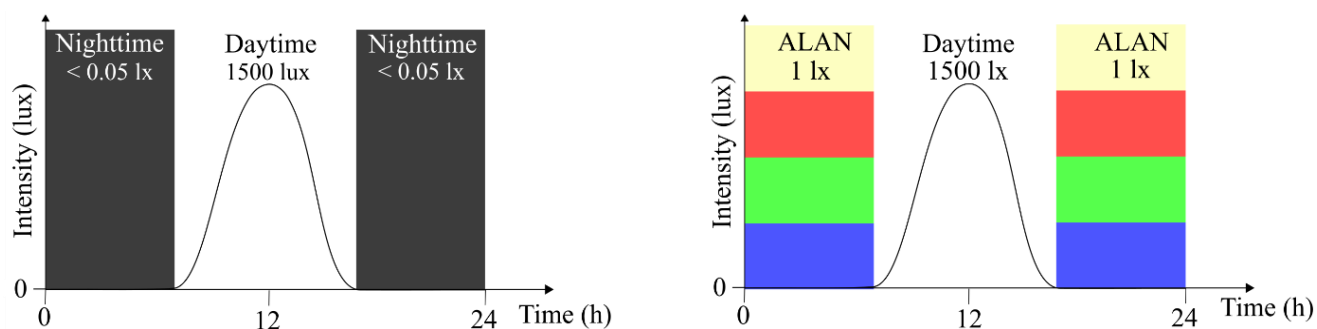
There are no human subjects in this article and consent to participate is not applicable.

### 3. Annexes

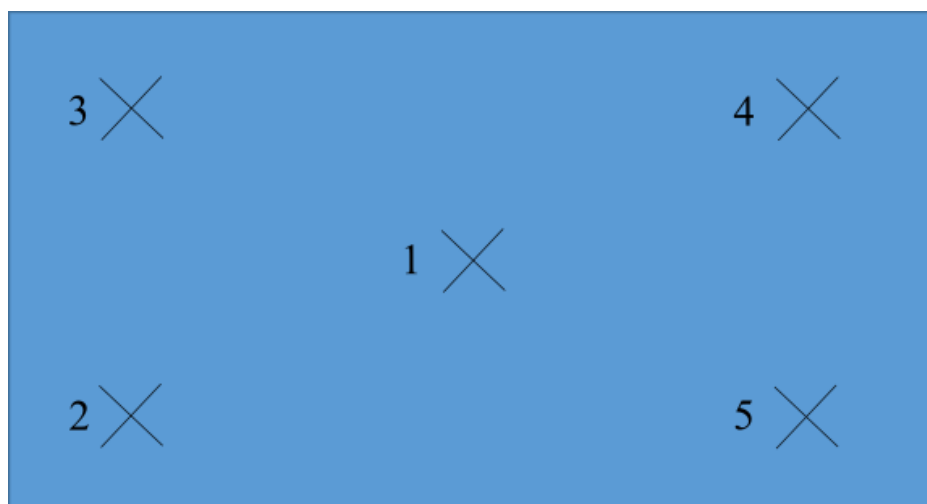
**Supplementary material:** Botté, A., Payton, L., Tran, D. The effects of Artificial Light at Night on behavioral rhythm and related gene expression are wavelength dependent in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 10.1007/s11356-023-30793-1



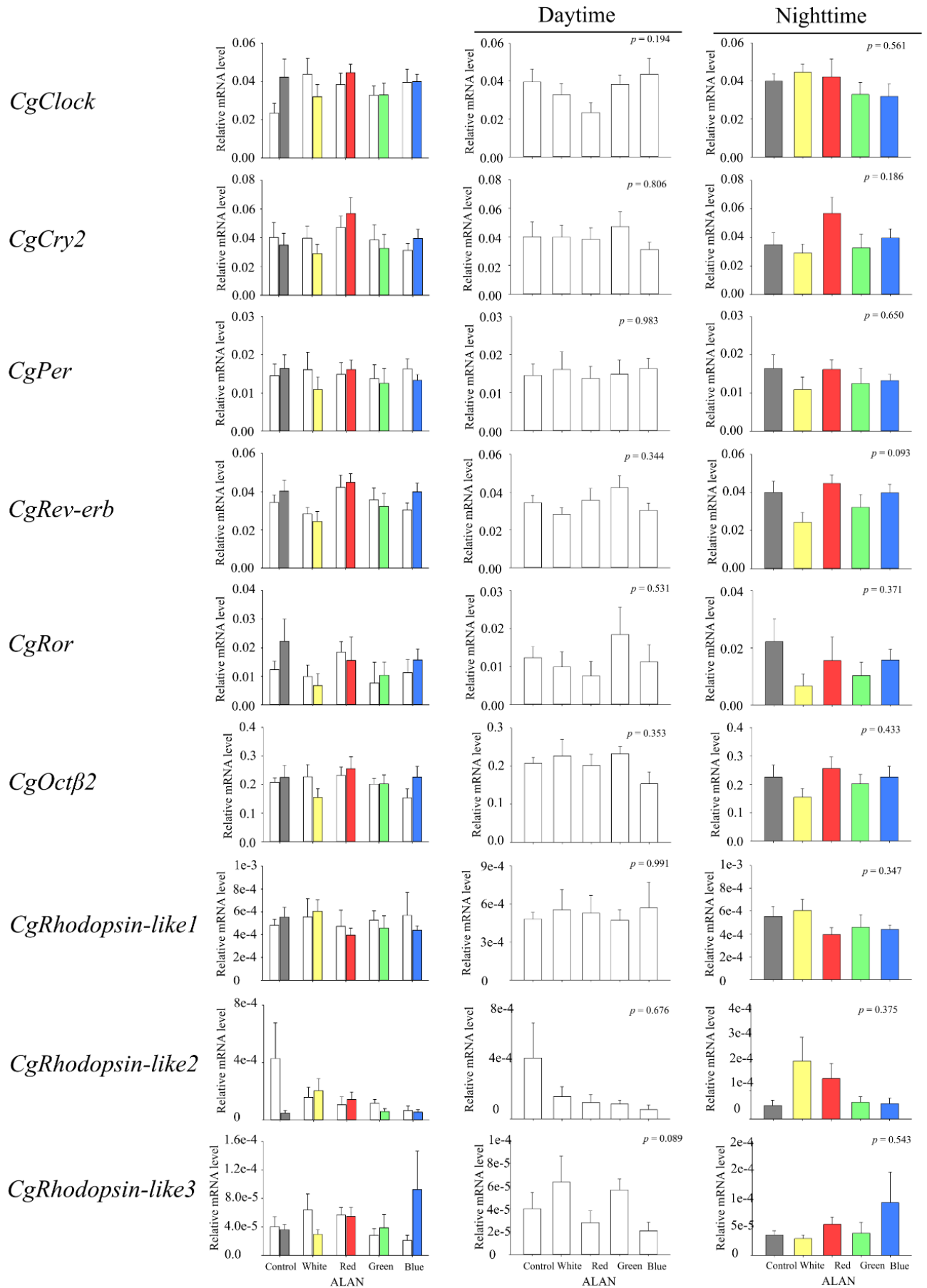
**Figure S1.** Spectrum of the maximum light intensity (A) during daytime, and (B) of ALAN spectra measured underwater near the oysters: white light (yellow line), and red (red line), green (green line), blue wavelengths (blue line).



**Figure S2.** Daily light during the 7 days of exposure to the control condition (A) and the ALAN treatments (white light, and red, green, blue wavelengths at an intensity of 1 lx) (B).



**Figure S3.** Five locations in the experimental tank (L x W x H: 74.8 x 54.8 x 40.8 mm) used for under water intensity and spectral measurements. The measure is done at the depth of the oysters.



**Figure S4.** Effect of ALAN spectral composition on the difference in relative mRNA level in oyster gills tissues, between daytime and nighttime (left column), between conditions during daytime (middle column) and between conditions during nighttime (right column) of nine clock and clock-associated genes (mean  $\pm$  SE, n = 8 oysters). White bars indicate the gene level during daytime and, colored bars during nighttime. Asterisks indicate significant differences between daytime and nighttime, and different letters indicate differences between conditions ( $p < 0.05$ ).

**Table S1.** Values of underwater measurements of the maximum light intensity during the daytime and ALAN intensities during nighttime for each position in the tank, and the mean  $\pm$  SE.

Location in the tank	Maximum intensity during the daytime (lx)	ALAN intensities (lx)			
		White light	Red wavelengths	Green wavelengths	Blue wavelengths
1	2064.67	1.72	1.39	1.35	1.49
2	1280.48	1.33	1.24	1.22	1.23
3	1413.92	1.27	1.30	1.11	1.24
4	1359.86	1.39	1.36	1.15	1.33
5	1450.91	1.34	1.20	1.11	1.30
<b>Mean <math>\pm</math> SE</b>	<b>1513.97 <math>\pm</math> 140.63</b>	<b>1.41 <math>\pm</math> 0.08</b>	<b>1.30 <math>\pm</math> 0.04</b>	<b>1.19 <math>\pm</math> 0.05</b>	<b>1.32 <math>\pm</math> 0.05</b>



**Table S2.** Forward, reverse primers sequences used for Real-Time PCR analysis in *Crassostrea gigas*.

GeneBank access	Gene name	Forward primer	Reverse primer
<i>Crassostrea gigas</i> core clock genes			
KX371073	<i>CgClock (Clock)</i>	5'-TGGGAATGATGTCCAACAGAG-3'	5'-GGTCCATCAATGACAGGAAGT-3'
KX371075	<i>CgBmal (Bmal)</i>	5'-CACAAAGTTCAGGTCAGAGTGTAG-3'	5'-TCACCTGAGGTAGACTGGTTAT-3'
KX371074	<i>CgCryptochrome 2 (Cry2)</i>	5'-AACCTTACAGCAAGCACGAA-3'	5'-TGACATCTGGCTGTGGTTTC-3'
KX371076	<i>CgPeriod (Per)</i>	5'-CCGATGACAGAAATCCCAGTAG-3'	5'-CCATCCTATTCTCTGCTCTTG-3'
KX371077	<i>CgTimless 1 (Tim1)</i>	5'-AAAGATCCCGGACACAGTATG-3'	5'-TGGAAGCTGTTCCCTGACTTG-3'
KT991835	<i>CgCryptochrome 1 (Cry1)</i>	5'-TCATGAAGCAGCTCAGATACG-3'	5'-ACCTCCCAGTTCAACCAAAG-3'
KJ188106	<i>CgRev-erb (Rev-erb)</i>	5'-GACTTTGCTGATCGCTTCAAC-3'	5'-CTTTCCAAGTCTCCACATTTC-3'
EKC18621	<i>CgRor (Ror)</i>	5'-CTACGTGAGCAGGTGTTTGA-3'	5'-CGTCCGCTATGTCCTTCAAT-3'
<i>Crassostrea gigas</i> clock-controlled genes			
EKC41768	<i>CgHiomt-like</i>	5'-CGGGTGGATCAGTGTTAGTAATG-3'	5'-TCTCTTGGCCCTGTGATAGA-3'
XM_011433587	<i>CgRhodopsin-like 1</i>	5'-TAGTTCGGCGTCGGAATTTATC-3'	5'-CTGTTCGAATCTCTGCTCTCAC-3'
XM_011448766	<i>CgRhodopsin-like 2</i>	5'-CCCTGAGTCATCCCAAATTCA-3'	5'-GATGTTCTCGGCGTAGCTTTA-3'
XM_020065754	<i>CgRhodopsin-like 3</i>	5'-TGACTTTGACGGCGATACTG-3'	5'-ATAGATCCGCCACCGAAATG-3'
XM_011427386	<i>CgOctβ2</i>	5'-AATCCAGCACACACTCCATAG-3'	5'-TCTGAGTCTCATCTGCGTTTG-3'
<i>Crassostrea gigas</i> housekeeping genes			
AB122066	<i>CgElongation Factor 1 (Efl)</i>	5'-ACCACCCTGGTGAGATCAAG-3'	5'-ACGACGATCGCATTCTCTTT-3'
CAD67717	<i>CgGadph</i>	5'-CGTACCAGTTCAGATGTTTCC-3'	5'-GCCTTGATGGCTGCCTTAATA-3'
Z29546	<i>Cg28S</i>	5'-AAACACGGACCAAGGAGTCT-3'	5'-AGGCTGCCTTCACTTTCATT-3'

**Table S3.** Results of chronobiological analysis for the control and ALAN conditions at the group level. When daily rhythms are significant ( $p < 0.05$ ), rhythmic parameters are expressed as mean  $\pm$  standard error, where the standard error shows the daily variability ( $n = 7$  days).

ALAN spectral composition	Period (h)	PR (%)	Amplitude (%)	Acrophase (h)
Control	24.10 $\pm$ 0.02	77.00 $\pm$ 3.37	31.21 $\pm$ 1.48	12.10 $\pm$ 0.11
White light	24.00 $\pm$ 0.03	58.70 $\pm$ 7.36	14.43 $\pm$ 1.32	13.52 $\pm$ 0.60
Red wavelengths	24.00 $\pm$ 0.10	24.90 $\pm$ 4.59	10.09 $\pm$ 0.80	17.08 $\pm$ 0.60
Green wavelengths	23.50 $\pm$ 0.05	36.60 $\pm$ 7.91	14.20 $\pm$ 1.94	16.64 $\pm$ 0.83
Blue wavelengths	24.50 $\pm$ 0.05	31.30 $\pm$ 4.23	10.86 $\pm$ 1.09	19.18 $\pm$ 0.20

ALAN spectral composition (ix)																			
Control					White light					Red wavelengths			Green wavelengths			Blue wavelengths			
Period (h)	PR (%)	Amplitude (%)	Acrophase (h)	Period (h)	PR (%)	Amplitude (%)	Acrophase (h)	Period (h)	PR (%)	Amplitude (%)	Acrophase (h)	Period (h)	PR (%)	Amplitude (%)	Acrophase (h)	Period (h)	PR (%)	Amplitude (%)	Acrophase (h)
24.4	49.5	41.6	12.9	23.7	21.9	23.2	8.7	24.1	14.9	24.8	18.6	24.6	19.8	29.3	21.7	24.3	52.6	48.4	23.1
24.3	44.4	42	11.2	23.8	35.0	33.3	10.9	23.9	48.9	41.5	11.7	24.1	19.4	25.8	19.9	24.6	15.2	24.9	18.3
23.7	47.9	38.5	16.9	24.9	32.4	37.2	11.5	24	43.9	39.6	21.3	24.7	26.3	28.7	12.2	23.4	21.9	29.9	20.3
24.2	31.2	35.6	12	23.9	26.9	30	19.4	24.1	34.3	36.5	12.3	24.9	17.3	26.2	16.3	27.1	23.3	30.5	8.8
21.7	17.1	24.9	0.9	23.7	50.8	41.6	11.3	22.8	15.5	26.1	23.8	23.6	25.5	31	14.4	23.5	22.8	30.9	11.7
24.2	52.6	45	11.9	19.6	-	-	-	25	25.2	32.8	21.7	22.9	34.2	34.4	18.3	12.1	-	-	-
24.1	58.3	48	12.1	12.2	-	-	-	25.3	28.0	34.1	16.2	23.6	27.8	33	25.1	12.7	-	-	-
24.4	55.3	43.3	10.5	11.9	-	-	-	10.6	-	-	-	27.2	27.3	30.6	15.7	11.9	-	-	-
24	56.0	48	12.2	12	-	-	-	15.8	-	-	-	23.9	22.0	28.5	12.9	12.1	-	-	-
24	38.5	39.7	12.2	n.s.	-	-	-	11.9	-	-	-	21.7	21.1	26.2	3.9	13.1	-	-	-
25.2	20.4	27.8	9.6	n.s.	-	-	-	12	-	-	-	24.2	22.9	29.9	14.2	18.4	-	-	-
24	35.6	31.8	11.4	n.s.	-	-	-	13.1	-	-	-	23.9	26.5	32.8	14	n.s.	-	-	-
24	55.6	47.2	12.2	n.s.	-	-	-	14	-	-	-	17.4	-	-	-	n.s.	-	-	-
24	34.0	29.8	15.1	n.s.	-	-	-	n.s.	-	-	-	12.1	-	-	-	n.s.	-	-	-
19.2	-	-	-	-	-	-	-	n.s.	-	-	-	7.82	-	-	-	n.s.	-	-	-
11.8	-	-	-	-	-	-	-	n.s.	-	-	-	n.s.	-	-	-	n.s.	-	-	-

**Table S4.** Results of chronobiological analysis for the control condition and ALAN conditions at the individual level (n = 14-16 oysters / condition). The table indicates for the control condition and ALAN conditions: the period of rhythmic individuals (the periods out of the daily range of 24 – 28 h are in italic); and the percent rhythm (PR, %), rhythm’s amplitude and acrophase of individuals having a significant daily rhythm ( $p < 0.05$ ). No significant rhythms are indicated by “n.s.”.

## 4. Conclusion

Cette étude indique que toutes les compositions spectrales de LAN testées (lumière blanche et trois couleurs monochromatiques : bleu, vert et rouge) ont des effets néfastes sur le rythme journalier des huitres au niveau comportemental et moléculaire. De plus, chacune des longueurs d'onde testées affectent l'expression du gène impliqué dans la synthèse de la mélatonine, elles ont donc toutes le potentiel d'altérer la physiologie de *C. gigas*. Ce travail met également en évidence que la lumière blanche et le bleu ont le plus d'effets néfastes, confirmant une partie de notre hypothèse de départ. Cependant, de façon surprenante et contrairement à l'hypothèse émise, la lumière verte était celle ayant le moins d'effets négatifs et non la lumière rouge, dont les effets sont intermédiaires. Les résultats obtenus ne vérifient donc pas tous l'hypothèse de départ qui est que plus la longueur d'onde est courte, plus énergétique et pénétrante, et plus les effets attendus sont importants.

L'un des effets les plus marquants provoqués par la lumière bleue dès 1 lux est la transition d'un comportement diurne à nocturne. Au laboratoire comme sur le terrain, il a été montré que les huitres expriment un comportement diurne pendant l'été et le printemps, période pendant laquelle se sont passées les expérimentations (Mat et al., 2012; Payton et al., 2017a). Ce comportement diurne leur permet d'optimiser leur consommation de nourriture en étant ouverte lorsque le phytoplancton est le plus abondant à la période de l'année où les besoins énergétiques sont les plus importants (gamétogénèse, croissance) (Enríquez-Díaz et al., 2008; Payton et al., 2017a). Ainsi, en condition de lumière bleue, adopter un comportement nocturne ne permettrait pas de répondre aux besoins énergétiques et donc pourrait avoir des conséquences désastreuses sur divers processus métaboliques.

Ainsi, ces résultats indiquent que l'huitre, un bivalve dépourvue d'yeux, est capable de percevoir de très faibles intensités lumineuses avec une sensibilité différente pour chaque longueur d'onde. Cette perception lumineuse est certainement due à la sensibilité spectrale de photorécepteurs et photopigments qui restent à étudier. Chez l'huitre, deux types de photorécepteurs potentiels ont été découverts : les cryptochromes (Tran et al., 2015), récepteurs de lumière bleue (Lin and Todo, 2005), et les rhodopsines (Tran et al., 2020a; Wu et al., 2018), appartenant à la famille des opsines (Cronin and Johnsen, 2016). Le cryptochrome 1 est impliqué dans l'horloge moléculaire de *C. gigas* ce qui pourrait en partie expliquer sa forte sensibilité aux courtes longueurs d'onde. Concernant les rhodopsines, les résultats de ce travail indiquent qu'elles ne seraient pas impliquées dans le mécanisme de l'horloge moléculaire, bien

que leur sensibilité spectrale et leur rôle ne soient pas connus. Cependant, il est également possible que le choix du tissu étudié (la branchie) et du temps de prélèvement (1 temps de prélèvement la nuit et le jour) ait fait manquer une réponse transcriptionnelle des rhodopsines. De plus, peu de chose sont connus à l'heure actuelle sur la façon que l'huitre a de percevoir son environnement lumineux. Ainsi, d'autres photorécepteurs restant à découvrir pourraient intervenir dans ce sens.

Enfin, cette étude indique qu'il est possible de limiter l'effet de LAN chez l'huitre en jouant sur sa composition spectrale et notamment en éclairant avec une lumière verte. Cependant, afin que cette stratégie d'atténuation soit un succès en zone littorale, il est nécessaire de prendre en compte la sensibilité spectrale d'un ensemble représentatif des organismes de l'écosystème côtier, ce qui est un travail colossal qui débute à peine. Ainsi, d'autres stratégies d'atténuation doivent être mise en place pour limiter l'effet de LAN sur l'ensemble de ces environnements. L'une d'elle consiste à limiter les durées d'éclairage public nocturne en le coupant pendant toute ou une partie de la nuit (Gaston et al., 2012; Longcore and Rich, 2016). Des études dans ce sens est abordé dans le chapitre suivant.

# **Chapitre VI**

## **Effets de la pollution lumineuse nocturne sur le rythme journalier de *C. gigas* en fonction de sa modalité d'exposition**

1. Préambule.....	166
2. Article: <i>Is part-night lighting a suitable mitigation strategy to limit Artificial Light at Night effects on the biological rhythm at the behavioral and molecular scales of the oyster Crassostrea gigas?</i> .....	168
3. Annexes.....	202
4. Conclusion.....	212

## 1. Préambule

La stratégie de l'éclairage nocturne partiel ou *part-night lighting* (PNL) en anglais, qui vise à atténuer les effets de LAN, consiste à couper l'éclairage nocturne en milieu de nuit, correspondant alors à la nuit naturelle la plus noire et ceci pendant plusieurs heures. C'est une politique d'éclairage public de plus en plus mise en œuvre, notamment à des fins économiques et environnementales, bien que restant limitée. En France, cette stratégie est appliquée dans moins de la moitié (40 %) des communes françaises selon un rapport de 2021 (Syndicat de l'éclairage and ADEME, 2021). Cependant, les réels avantages ou désavantages qu'elle confère à l'environnement ne sont que très peu étudiés. Récemment, une étude a mis en évidence que le PNL n'apportait pas de bénéfices aux colonies du puceron *Sitobion avenae* comparé à un éclairage nocturne continu et que cette stratégie d'atténuation avait même tendance à être plus néfaste pour ces organismes (Heinen et al., 2023). Cet exemple d'étude illustre l'importance d'évaluer l'impact positif ou négatif des stratégies PNL.

Les études précédentes ayant mis en évidence l'impact néfaste de LAN sur le rythme journalier de *C. gigas* (chapitres IV et V), l'objectif est maintenant d'évaluer les potentiels bénéfiques de la stratégie PNL sur le rythme journalier de *C. gigas* au niveau comportemental et moléculaire. Afin de se rapprocher de ce à quoi est réellement soumis l'environnement côtier, il a été choisi lors de ce travail de reproduire, comme cas d'étude concret, la politique d'éclairage d'une commune du bassin d'Arcachon, la commune de Lanton. Celle-ci était la seule commune du bassin à couper son éclairage partiellement pendant la nuit (de 23 h à 03 h, en UTC) lorsque cette étude a été réalisée (de mai à août 2022). Ainsi, dans la condition PNL, les huitres étaient exposées de 19 h à 23 h et de 03 h à 05 h à une intensité de 5 lx en lumière blanche afin de mimer une source directe de LAN. Cette intensité de 5 lx s'appuie sur la mesure nocturne faite sous la jetée d'Eyrac à Arcachon, éclairée par des lampadaires, sous l'eau à environ 2 m de profondeur. Afin d'évaluer les bénéfices de cette stratégie, ces résultats étaient comparés à ceux obtenus lorsque les huitres étaient exposées à LAN (5 lx) pendant une nuit complète (*full night lighting*, FNL).

Lors de la stratégie PNL mimée ici, les huitres sont dans le noir complet de 23 h à 03 h. Cependant, dans l'environnement, le noir complet n'existe pas du fait notamment des astres, mais surtout du *skyglow* dont l'intensité lumineuse est faible (< 1 lx) mais peut s'étendre à des centaines de km de sa source (Hänel et al., 2018; Luginbuhl et al., 2014). Par exemple, la commune de Lanton, même si elle pratique le PNL, peut être touchée par des sources

lumineuses provenant des communes voisines, dont l'éclairage public était présent tout au long de la nuit, mais aussi des grandes villes plus éloignées telles que Bordeaux, qui est seulement à 40 km de Lanton. Ainsi, afin d'être au plus proche des conditions environnementales d'exposition à LAN, une seconde condition PNL a été testée, le PNL+*skyglow* (PNL+S) lors de laquelle le *skyglow* est présent pendant toute la durée de la nuit, et est donc une source lumineuse percevable entre 23 h et 03 h, lorsque les sources directes de LAN sont coupées.

L'hypothèse émise au début de ce travail est que chaque modalité d'exposition à LAN testée aurait un effet potentiel différent sur le rythme journalier des huitres à l'échelle moléculaire et comportementale, mais que cet effet serait atténué par la stratégie PNL. Cependant, la présence de *skyglow* réduirait les avantages conférés par le PNL.

## 2. Article: Is part-night lighting a suitable mitigation strategy to limit Artificial Light at Night effects on the biological rhythm at the behavioral and molecular scales of the oyster *Crassostrea gigas*?

Science of the Total Environment 905 (2023) 167052

Contents lists available at ScienceDirect

**Science of the Total Environment**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/scitotenv](http://www.elsevier.com/locate/scitotenv)

Check for updates

### Is part-night lighting a suitable mitigation strategy to limit Artificial Light at Night effects on the biological rhythm at the behavioral and molecular scales of the oyster *Crassostrea gigas*?

Audrey Botté, Laura Payton, Elisa Lefevre, Damien Tran<sup>\*</sup>

Univ. Bordeaux, CNRS, Bordeaux INP, EPOC, UMR 5805, F-33120 Arcachon, France

---

**HIGHLIGHTS**

- Artificial Light at Night (ALAN) is a growing threat in coastal areas
- ALAN disrupts oysters' behavioral rhythm and related genes expression
- Part-Night Lighting (PNL) strategy without skyglow mitigates ALAN's effects
- In the presence of skyglow, PNL strategy is worse than full-night lighting

**GRAPHICAL ABSTRACT**

---

**ARTICLE INFO**

Editor: Yolanda Pico

**Keywords:**  
 Artificial Light at Night  
 Oysters' behavior  
 Valvometry  
 Daily rhythm  
 Skyglow  
 Part-night lighting

**ABSTRACT**

Artificial Light at Night (ALAN) is a fast-spreading threat to organisms, especially in coastal environments, where night lighting is increasing due to constant anthropization. Considering that ALAN affects a large diversity of coastal organisms, finding efficient solutions to limit these effects is of great importance but poorly investigated. The potential benefit of one strategy, in particular, should be studied since its use is growing: part-night lighting (PNL), which consists in switching off the lights for a few hours during nighttime. The aim of this study is to investigate the positive potential of the PNL strategy on the daily rhythm of the oyster *Crassostrea gigas*, a key species of coastal areas of ecological and commercial interest. Oysters were exposed to a control condition and three different ALAN modalities. A realistic PNL condition is applied, recreating a strategy of city policy in a coastal city boarding an urbanized bay (Lanton, Arcachon Bay, France). The PNL modality consists in switching off ALAN direct sources (5 h) for 4 h (23–3 h) during which oysters are in darkness. Then, a PNL + skyglow (PNL + S) modality reproduces the previous one mimicking a skyglow (0.1 lx), an indirect ALAN source, during the direct lighting switch off, to get as close as possible to realistic conditions. Finally, the third ALAN condition mimics full-night direct lighting (FNL). Results revealed that PNL reduces some adverse effects of FNL on the behavioral daily rhythm. But, counterintuitively, PNL + S appears more harmful than FNL for some parameters of the behavioral daily rhythm. PNL + S modality is also the only one that affect oysters' clock and melatonin synthesis gene expression, suggesting physiological consequences. Thus, in realistic conditions, the PNL

---

<sup>\*</sup> Corresponding author.  
 E-mail address: [damien.tran@u-bordeaux.fr](mailto:damien.tran@u-bordeaux.fr) (D. Tran).

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167052>  
 Received 2 June 2023; Received in revised form 1 September 2023; Accepted 11 September 2023  
 Available online 13 September 2023  
 0048-9697/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

Botté, A., Payton, L., Lefevre, E., Tran, D., 2023b. Is part-night lighting a suitable mitigation strategy to limit ALAN's effects on the biological rhythm at the behavioral and molecular scales of the oyster *Crassostrea gigas*? *Sci. Total Environ.* 10.1016/j.scitotenv.2023.167052

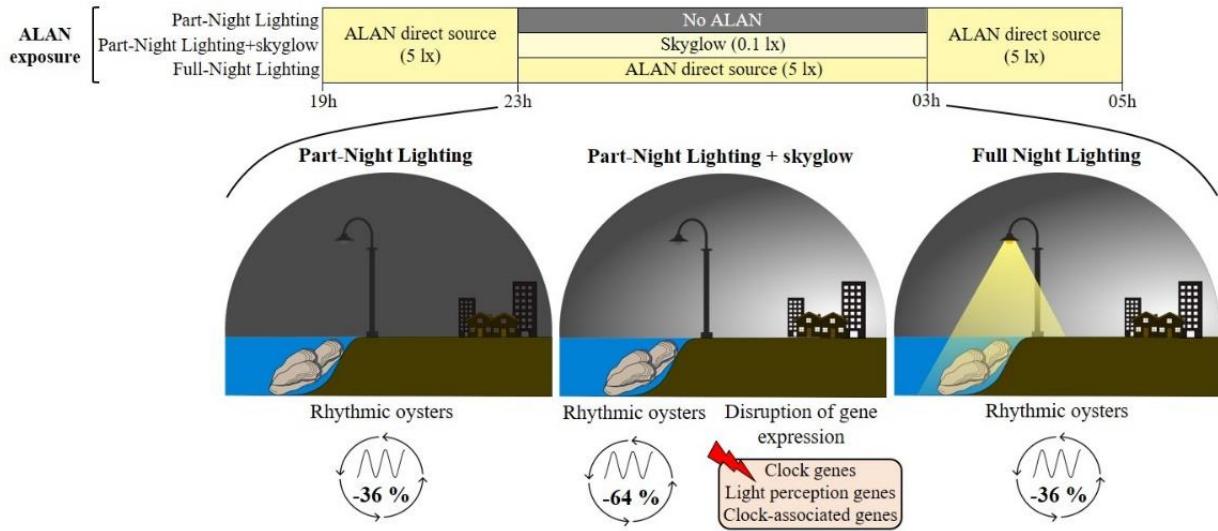


## Abstract

Artificial Light at Night (ALAN) is a fast-spreading threat to organisms, especially in coastal environments, where night lighting is increasing due to constant anthropization. Considering that ALAN affects a large diversity of coastal organisms, finding efficient solutions to limit these effects is of great importance but poorly investigated. The potential benefit of one strategy, in particular, should be studied since its use is growing: part-night lighting (PNL), which consists in switching off the lights for a few hours during nighttime. The aim of this study is to investigate the positive potential of the PNL strategy on the daily rhythm of the oyster *Crassostrea gigas*, a key species of coastal areas of ecological and commercial interest. Oysters were exposed to a control condition and three different ALAN modalities. A realistic PNL condition is applied, recreating a strategy of city policy in a coastal city bordering an urbanized bay (Lanton, Arcachon Bay, France). The PNL modality consists in switching off ALAN direct sources (5 lx) for four hours (23-3 h) during which oysters are in darkness. Then, a PNL + skyglow (PNL+S) modality reproduces the previous one mimicking a skyglow (0.1 lx), an indirect ALAN source, during the direct lighting switch off, to get as close as possible to realistic conditions. Finally, the third ALAN condition mimics full-night direct lighting (FNL). Results revealed that PNL reduces some adverse effects of FNL on the behavioral daily rhythm. But, counterintuitively, PNL+S appears more harmful than FNL for some parameters of the behavioral daily rhythm. PNL+S modality is also the only one that affects oysters' clock and melatonin synthesis gene expression, suggesting physiological consequences. Thus, in realistic conditions, the PNL mitigation strategy might not be beneficial in the presence of skyglow, seeing worse for a coastal organism such as the oysters.

Keywords: Artificial Light at Night; oysters' behavior; valvometry; daily rhythm; skyglow; part-night lighting

Graphical abstract



## 1. Introduction

Artificial Light at Night (ALAN) is a widespread pollution type, which can affect zones supposed to be preserved from human activities, such as marine or terrestrial protected areas (Davies et al., 2016; Davies and Smyth, 2018; Gaston et al., 2015b). In these areas and more globally all over the world, ALAN is a threat to a wide diversity of organisms (from nocturnal to diurnal and from terrestrial to aquatic species) and in a large range of intensities (from below 1 lx to more than 100 lx) (Brayley et al., 2022; Sanders et al., 2021). A multitude of effects on organisms caused by a disruption of natural nocturnal lighting levels have been described, such as effects on sleep, circadian rhythm, endocrinology, orientation, migration, foraging, communication, or reproduction (Brayley et al., 2022; Burt et al., 2023; Sanders and Gaston, 2018; Sanders et al., 2021; Svechkina et al., 2020). Moreover, this threat to biodiversity is spreading fast, with a 2.2 % increase in surface area and a 1.8% increase in radiance per year (Kyba et al., 2017a). Thus, according to Davies and Smyth (2018), ALAN should be one of the main focuses of the global change research of this century. However, in addition to investigating ALAN's negative effects, finding solutions to limit them is also necessary. Thus, suggestions have been made including the protection and creation of dark areas, the reduction of the trespass of lighting in areas not intended to be lit, the choice of dimmer intensities as well as narrower spectra, and the reduction of lighting duration (part-night lighting) (Gaston et al., 2012; Longcore and Rich, 2016). Part-night lighting (PNL) is an option increasingly used. It involves turning off the lights during a part of the night, returning darkness to organisms along with an economic interest. To ensure that this strategy is helpful to ecosystems, it is necessary to test its effectiveness and effects on organisms, which is currently poorly investigated. For example, Davies et al. (2017) showed that switching off ALAN at a dimmed intensity (14 lx) for 4 hours from 00 h to 04 h was more beneficial to grassland invertebrate assemblages than a full-night lighting (FNL) at the same intensity. However, in some cases, PNL can be more harmful than FNL. This is the case for the aphid *Sitobion avenae*, for which PNL induces the suppression of the colony growth whereas FNL allows a recovery of aphid number over time (Heinen et al., 2023). In addition, in the environment, during the supposed dark part of the night, organisms will certainly still be exposed to ALAN through its indirect source, the skyglow. This skyglow is created by artificial light scattered in the atmosphere leading to a brightening of the sky that can extend to hundreds of kilometers from its source at an estimated intensity ranging from 0.007 to 0.55 lx (Gaston, 2018; Hänel et al., 2018; Luginbuhl et al., 2014). Therefore, a city

applying PNL strategies could still be exposed to ALAN throughout nighttime through the skyglow emitted for instance by FNL of a distant large city.

ALAN is deeply present in coastal environments, with 1.9 million km<sup>2</sup> of the world's coastal seas exposed to biologically important ALAN at a depth of 1 m (Smyth et al., 2021). Even if the large diversity of ALAN's impacts on marine organisms begins to be understood (Davies et al., 2014; Marangoni et al., 2022), our knowledge on this topic remains poor compared to terrestrial environments, especially concerning the potential benefits of mitigation strategies. To our knowledge, the work of Bauer et al. (2022) is the only one investigating PNL (ALAN turned off during 5 h) effects on benthic invertebrates. Their results suggest a potential disruption of the feeding behavior of the sea urchin *Paracentrotus lividus* and the snail *Cerithium* spp. by ALAN (29 lx) with effects appearing weaker when PNL is applied. To contribute filling this gap in the literature, our study investigates PNL potential benefits on the oyster *Crassostrea gigas*, a key coastal species likely exposed to ALAN since it is a sessile mollusk living in intertidal or subtidal areas. *C. gigas*, native to the northwest Pacific, has been introduced as cultured and wild oysters in many coastal environments especially for economic purpose due to its great capacity for adaptation and its rapid growth (FAO, 2016; Ruesink et al., 2005). The valve behavior of this coastal species exhibits biological rhythms related to daily, tidal, lunar and seasonal environmental cycles (Mat et al., 2012; Payton et al., 2017a; Perrigault and Tran, 2017; Tran et al., 2011). Oysters' behavioral daily rhythm have been showed to be endogenously generated by a molecular clock, the functioning of which has been elucidated (Payton et al., 2017b; Perrigault and Tran, 2017; Tran et al., 2020a). This daily rhythm could be easily affected by ALAN due to its plasticity. ALAN at low and realistic intensities (0.1-25 lx) disrupts oysters' daily rhythm at the behavioral and molecular scales, suggesting consequences on physiological processes (Botté et al., 2023a). Biological rhythms are ubiquitous and found their origin in each cell with an endogenous and autonomous clock that coordinates physiological processes between them and with environmental timing using reliable cues such as natural light cycles (Bell-Pedersen et al., 2005; Partch et al., 2014). Being synchronized with natural light cycles enable physiological processes and behavior to be optimized, giving adaptive advantages to organisms (Emerson et al., 2008; Golombek and Rosenstein, 2010). Furthermore, biological rhythms contribute to maintain stable ecosystems by organizing temporally intra and interspecific interactions (Helm et al., 2017). However, by disrupting natural nocturnal light levels, ALAN can prevent clock synchronization with environmental light cycles and therefore have consequences on organisms' physiology and

behavior (Botté et al.; Botté et al., 2023a; Sanders et al., 2021). These findings highlight the importance of studying efficient mitigation strategies to limit ALAN's impacts (Gaston and Bennie, 2014; Gaston et al., 2017). In *C. gigas*, ALAN's effects on its daily rhythm have been investigated at several intensities ranging from 0.1 to 25 lx. ALAN's impacts were less important when oysters were exposed to the intensity of 0.1 lx compared to the intensity of 1 lx, indicating that ALAN's disruptive effects on oysters' daily rhythm can be reduced by decreasing its intensity ( $< 0.1$  lx). However, this low intensity does not suppress ALAN's effects on oysters behavioral daily rhythm, does not reduce impacts on their internal clock and is largely too low for public lighting (Botté et al., 2023a). ALAN's effects on oysters' daily rhythm have been investigated according to its wavelength. Behavioral and molecular results agree: the green wavelengths show the least important damages on the oysters' behavioral daily rhythm, the red wavelengths show intermediate effects, and the blue wavelengths show the most important effects (Botté et al.). Thus, the strategies consisting of decreasing ALAN intensity (0.1 lx) and changing its spectral composition (green wavelengths) do not suppress ALAN's effects, which could be further reduced by using PNL strategy.

This study investigates the potential of PNL mitigation strategy to reduce ALAN's impact on the oysters' daily rhythm. Thus, we evaluate the effects of several ALAN modalities on the valve behavior at the group and individual scales as well as on the expression of clock, light perception, and clock-associated genes of oysters. The first ALAN modality mimics PNL strategy *stricto sensu*: ALAN is switched off during 4 h in the middle of the night, during which the nocturnal intensity is considered total darkness, as it can be done in laboratory studies. Lighting off times reproduce the PNL strategy applied in Lanton (Arcachon Bay, France), a city boarding a very anthropized bay, with an important oyster farm activity. The intensity used to imitate ALAN direct sources (5 lx) was previously measured underwater, directly on the field, in the same bay. To be as close as possible to realistic conditions, the second ALAN modality also reproduces PNL strategy with in addition the presence of a skyglow light intensity (0.1 lx) throughout nighttime. Finally, the third ALAN condition mimics FNL that is still largely applied in the cities policy strategy.

ALAN in FNL has already been shown to affect the oyster diurnal behavior during daytime and nighttime at molecular and behavioral scales (Botté et al., 2023a). In the present study, we hypothesized that all tested ALAN's modalities would differently affect oysters' daily rhythm at the behavioral and molecular levels. A priori, we suggested that the use of PNL strategy would reduce negative effects of the FNL condition on the oysters' daily rhythm, although we

expected that the dispensed advantages by PNL strategies would be reduced in presence of skyglow throughout nighttime (PNL+S condition).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental protocol

The experiments were conducted in the Marine Station of Arcachon on 128 oysters ( $83.3 \pm 1.3$  mm shell length;  $38.7 \pm 0.6$  mm shell width; mean  $\pm$  SE), all of them collected in an oyster's farm of the Arcachon bay (France) before the first experiment. The experiments were realized using four tanks (L x W x H: 74.8 x 54.8 x 40.8 mm) placed in an isolated room and equipped with an antivibration bench to reduce disturbances to oysters' behavior. Each tank was continuously supplied with natural, oxygenized, and filtered ( $< 1\mu\text{m}$ ) seawater of stable composition (temperature =  $20.3 \pm 0.1$  °C, pH =  $8.0 \pm 0.1$ , salinity =  $34.9 \pm 0.1$  ‰) pumped from the Arcachon bay. For each experimental condition, 32 oysters were used: the valve behavior of 16 of them was continuously recorded and 24 oysters (including 8 of the oysters used to study valve behavior) were used for molecular analyses. Oysters were not fed during the experiments and were acclimated for 7 – 10 days before the experiment to an L:D 14:10 cycle with daytime from 5 to 19 h (all times noted in Universal Time Coordinated, UTC) (Fig. S1). Daylight intensity varied gradually with a maximum intensity of  $1388.47 \pm 260.89$  lx (also measured in irradiance: to  $2.8 \times 10^{-3}$   $\mu\text{E}/\text{cm}^2/\text{s}$ ; mean  $\pm$  SE) (Fig. S2) between 11:30 to 12:30 h to mimic the daily cycle of light using programmable white (391–720 nm, peak at 553 nm; Fig. S3A) LED light bars (MH3SP3 DSunY). Four conditions (acclimation and exposure) were tested successively from May to August 2022. These 4 conditions included one control condition and three ALAN exposure modalities (Fig. S1) lasting 10 days of exposure with previously 7-10 of acclimation to experimental design. ALAN modalities, i.e. part-night lighting (PNL), part-night lighting + skyglow (PNL+S), and full-night lighting (FNL), were performed using white (411–687 nm, peak at 563 nm; Fig. S3B-C) LED strips (MiBoxer Mi-Light WL5). For each experimental condition, underwater illuminances were measured at five positions in the tank, at oysters' level (Fig. S2A) using a handheld spectroradiometer (Blue-Wave UVN-100, StellarNet Inc.) equipped with a waterproofed probe designed for underwater measurements. This probe was linked to the spectroradiometer with an optical fiber also waterproofed. In the control condition, oysters were not exposed to nocturnal lighting. The experimental room being isolated from external light sources, and the light intensity measured being below the detection limit of the spectroradiometer ( $< 0.05$  lx), for convenience,

throughout the text, it is considered as complete darkness condition. Underwater irradiances were measured using a waterproofed handheld radiometer (MICRO Class, Profiling (in-water), E (irradiance) PAR sensor, Biospherical Instrument Inc.). PNL condition involves an ALAN exposure from 19 to 23 h, and from 3 to 5 h at an intensity of 5 lx ( $5.67 \pm 0.34$  lx;  $1.51 \times 10^{-5}$   $\mu\text{E}/\text{cm}^2/\text{s}$ ; mean  $\pm$  SE). The choice of the ALAN intensity of 5 lx (Fig. S2B) was motivated by an ad hoc measure made at 19:15 h in May (civil twilight) underwater at the lighting Eyrac Pier in Arcachon Bay, France (44.64 N, 1.16 W) at a depth of 1.5 m. Thus, this intensity best mimics ALAN direct sources. During the 4 h interruption of ALAN, the oysters were in complete darkness ( $< 0.05$  lx) (Fig. S1). PNL+S group was subject to the same ALAN exposure modality as the previous condition, except during the 4 h interruption of ALAN direct source, where oysters were exposed to the indirect source of ALAN from 23 to 3 h with an intensity of 0.1 lx ( $0.13 \pm 0.01$  lx;  $5.85 \times 10^{-7}$   $\mu\text{E}/\text{cm}^2/\text{s}$ ; mean  $\pm$  SE) to mimic the presence of the skyglow (Fig. S1; Fig. S2B). Finally, FNL condition is characterized by an exposure to direct ALAN sources (5 lx) throughout nighttime from 19 to 5 h (Fig. S1). For each experimental condition, the valve behavior of 16 oysters was continuously recorded using the High Frequency–Non Invasive (HFNI) valvometer technology (Andrade et al., 2016). On the last day of each experiment, gill tissues of 8 oysters were sampled at three sampling times for each condition. The first sampling time occurs at 12 h when the daylight intensity is at its maximum. The two remaining sampling times occur during nighttime at 22 h when oysters are exposed to ALAN direct sources in all conditions, and at 1 h when ALAN's intensity varies across experimental conditions. To avoid changes in the oyster gene expression during dissection, the sampling is done very carefully, as fast as possible and under red light (to avoid white light putative effect). Each oyster was taken out from its tank just before the dissection, which lasted less than 30 sec, and the tissue was then immediately put in the RNAlater. Gills tissues were then stored in RNAlater (Invitrogen) at  $-80$  °C for further molecular analysis.

## 2.2. *Crassostrea gigas* behavior measurements and chronobiological analyses

Measurement of oyster's valve activity is performed using a HFNI valvometer technology (see details in Andrade et al. (2016)), for which lightweight's electromagnets are glued on the oysters' valve. An electromagnetic current is generated between these two electromagnets, linked to a valvometer device by flexible wires, and allows to continuously measure oyster valve activity during the 10 days of the experiments. For each oyster, the signal is recorded every 4.8 s and data were processed using Labview 8.0 (National Instrument, Austin, TX, USA). Here we focused on the oysters' hourly Valve Opening Duration (VOD) meaning that

we established for each individual and each hour of the 10 days of exposure the percentage of time spent with valves open. For example, an individual having its valves closed during a whole hour corresponds to a VOD of 0 % while an oyster with its valves open during one hour corresponds to a VOD of 100 %. From the hourly VOD data, chronobiological analyses were performed at the group and individual scales using the software Time Series Analysis Serie Cosinor 8.0 (Expert Soft Technologies). At the population level, analyses are conducted on the mean VOD of the group (16 oysters). At the individual level, analyses are conducted on the VOD of each oyster having a significant daily rhythm (with a period ranging from 20 to 28 h). The first step of chronobiological analysis is to evaluate the data quality by using the autocorrelation diagram to control the absence of random repartition of data and to determine the absence of stationary character using the Partial Autocorrelation Function (PACF) calculation. The absence of randomness in the data suggests the presence of a real biological or physical phenomenon, and the absence of stationary character makes the study of rhythmicity complex (Gouthiere et al., 2005a; Gouthière and Mauvieux, 2003). The second step involves the Lomb and Scargle periodogram, based on the regression and the Fourier analysis, used to search for periodicities in the dataset, which are considered significant for  $p > 0.95$  (Scargle, 1982). Then, the two main rhythmicities of the dataset were modeled using the Cosinor model. This model uses a cosine function calculated by regression (Bingham et al., 1982), and for a given period, the model is written as:  $Y(t) = A \cos\left(\frac{2\pi t}{\tau} + \phi\right) + M + \varepsilon(t)$  where  $A$  is the amplitude (difference between the average level and the highest value of the rhythm),  $\tau$  the given period (interval between two identical events),  $\phi$  the acrophase (the highest value of the rhythm),  $M$  the mesor (average level of the rhythm), and  $\varepsilon(t)$  the relative error. Another chronobiometric parameter is given by the model, the percent rhythm (PR), which is the percentage of cyclic behavior explained by the model, meaning the strength of the rhythm. Therefore, this model gives chronobiological parameters characterizing the oysters' behavioral rhythm. Two tests validated the calculated model and the existence of rhythmicity: the ellipse test must be rejected, and the probability for the null amplitude hypothesis must be lower than 0.05.

### *2.3. Total RNA extraction and cDNA synthesis*

For each condition and each sampling time, the gills' tissue of 8 oysters was sampled. From these gill tissues, the total RNA was extracted using an SV Total RNA Isolation System kit (Promega). The quantity and quality of the total RNA were evaluated by spectrophotometry



(OD230, OD260, OD280). Then a RNA reverse transcription was realized using Goscript™ Reverse Transcription System kits (Promega).

#### 2.4. Real-Time PCR analyses

Real-Time qPCR was performed using GoTaq® qPCR Master Mix kit (Promega) and primers sets of eight clock (*CgClock*, *CgBmal*, *CgCry*, *CgPer*, *CgTim1*, *CgCry1*, *CgRev-erb*, *CgRor*), one light perception (*CgRhodopsin-like 1*), two clock-associated genes (*CgHiomt-like*, *CgOctβ2*), and three housekeeping genes (*CgEfl*, *Cg28S*, *CgGadph*) (Tab. S1). The expression level of clock and clock-associated genes were evaluated using the comparative Ct method  $2^{-\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001), where  $\Delta Ct = Ct_{(\text{target gene})} - Ct_{(\text{housekeeping gene})}$ . Based on stability values, gene's expression was normalized with the geometric mean of the two housekeeping genes *CgGadph* and *CgEfl* (Xie et al., 2012).

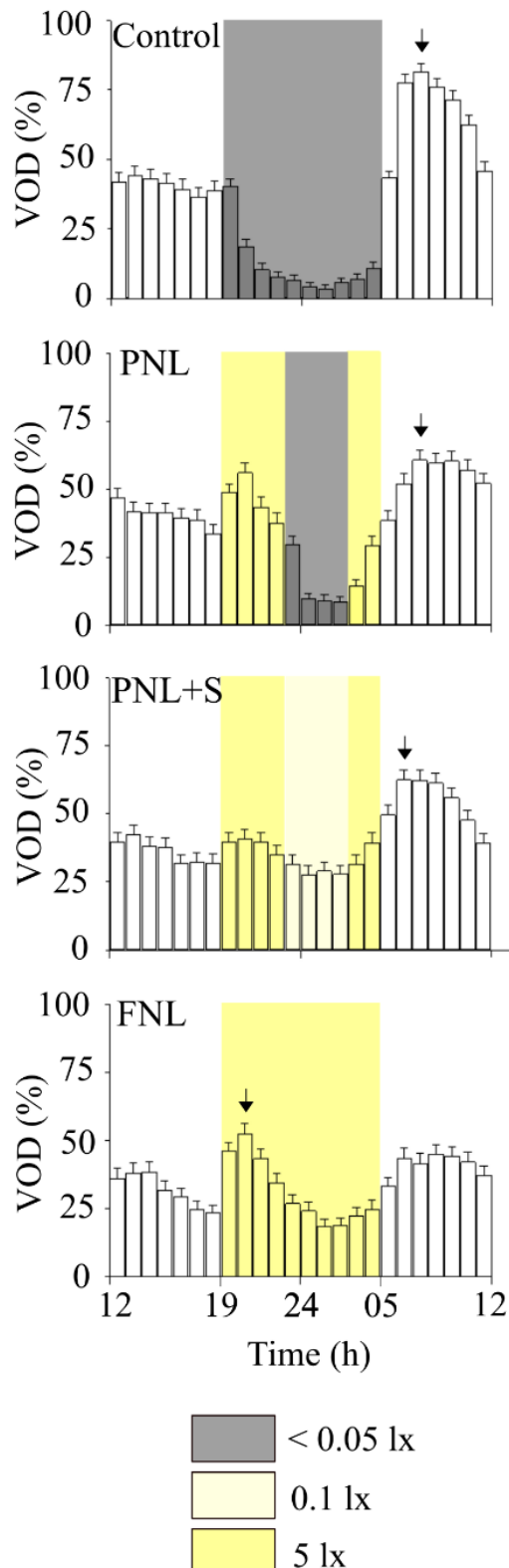
#### 2.5. Statistical analyses

The SigmaPlot software (version 13.0; Systat Software, USA) was used to perform the statistical analyses. Multiple comparisons were performed using the one-way ANOVA after checking assumptions (normality of data and equal variance), followed by the Student-Newman-Keuls test for all pairwise multiple comparisons in case of significant differences. If the assumptions weren't checked, the Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks test was performed, followed by the Student-Newman-Keuls test for all pairwise multiple comparisons in case of significant differences. Finally, on the whole molecular data, a three-way ANOVA was performed after checking assumptions (normality of data and equal variance). This ANOVA tests the effects of the experimental conditions (control, PNL, PNL+S, and FNL), sampling times (12, 22 and 1 h), and different gene expression on the overall relative mRNA levels of the eleven genes studied. In case of significant differences, a Student-Newman-Keuls test was used for all pairwise multiple comparisons. The use and results of statistical tests are detailed in the table S2. For all test results, a difference was considered significant when  $p < 0.05$ .

### 3. Results

Figure 1 shows the overall oysters' behavioral mean daily pattern for the control condition and the three ALAN conditions (PNL, PNL+S, FNL) with a black arrow indicating the maximal activity over a 24 h cycle. These descriptive results show that control oysters express a strong

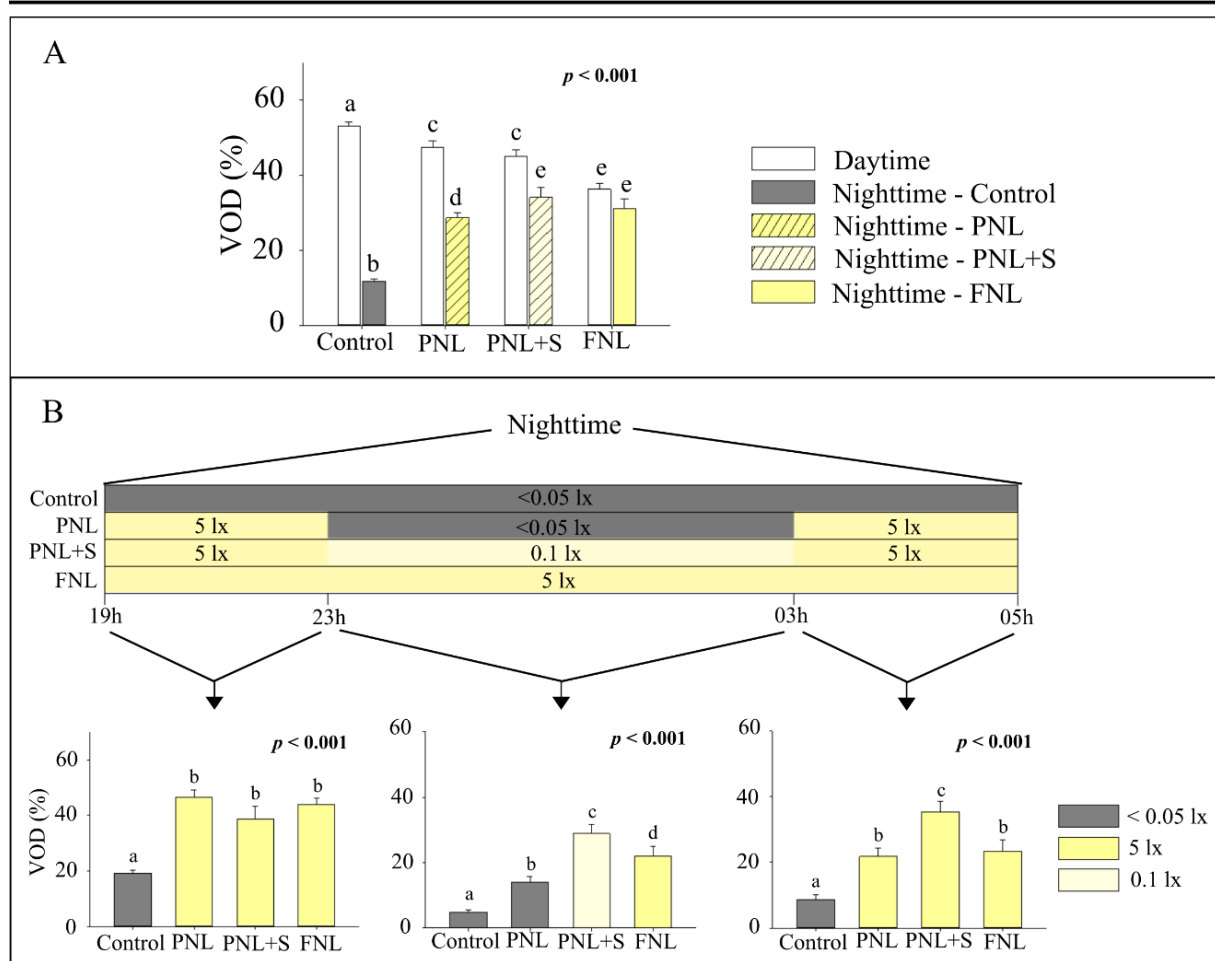
diurnal pattern with a daily VOD peak at 7–8 h. When oysters are exposed to the three tested ALAN modalities, their diurnal activity pattern is disrupted. Moreover, in FNL, the oysters' activity peak is delayed from daytime to nighttime with a 13 h shift (peak at 20–21 h). The daily VOD peak during PNL and PNL+S is still present during daytime although the mean hourly VOD increases during nighttime and decreases during daytime.



**Figure 1.** Behavioral daily valve activity of oysters in the control condition and exposed to different ALAN modalities (n = 16 oysters / condition): part-night lighting (PNL: ALAN direct source (5 lx) switched off from 19 h to 23 h), part-night lighting + skyglow (PNL+S: skyglow throughout nighttime added to PNL), and full-night lighting (FNL: ALAN direct source (5 lx) throughout nighttime). Mean hourly Valve Opening Duration (VOD, %) data are expressed as mean  $\pm$  SE (n = 10 days). White backgrounds indicate daytime while grey and yellow backgrounds indicate nighttime (grey:  $< 0.05\text{ lx}$ , dark yellow: 5 lx, pale yellow: 0.1 lx). Arrows show the peak of maximal hourly VOD.

Then, statistical analyses were performed first at the group level (Fig. 2 and 3). Figure 2A shows significant daytime / nighttime differences of the mean VOD for control oysters with an increased VOD during daytime, revealing a diurnal behavior. This significant difference tends to decrease for PNL and PNL+S conditions, caused by a decrease in the mean VOD during daytime as well as an increase during nighttime, which is significantly higher for the PNL+S condition compared to the control and PNL condition. Finally, this daytime / nighttime difference disappears during FNL, characterized by a significant decrease of the mean VOD during daytime compared to PNL and PNL+S conditions. Figure 2B focus on the mean VOD difference between conditions during different parts of the night. From 19 to 23 h, in all of the tested ALAN modalities oysters are exposed to a direct source of ALAN (5 lx) and for all of the conditions their mean VOD increases significantly compared to control oysters ( $p < 0.001$ ). From 23 to 3 h ALAN intensity varies between condition with an intensity considered as complete darkness for PNL, a skyglow intensity (0.1 lx) for PNL+S and an ALAN direct source intensity (5 lx) in FNL. During this period, oysters mean VOD remains significantly higher for all ALAN modalities compared to the control ( $p < 0.001$ ) but with weaker effects with PNL, intermediate with FNL and the most important increase for PNL+S. Finally, from 3 to 5 h, the oysters are once more exposed to ALAN direct source (5 lx) in all ALAN conditions, inducing a significant increase of their mean VOD in all ALAN modalities compared to control oysters with the least important increase for PNL and FNL and the most important for PNL+S.

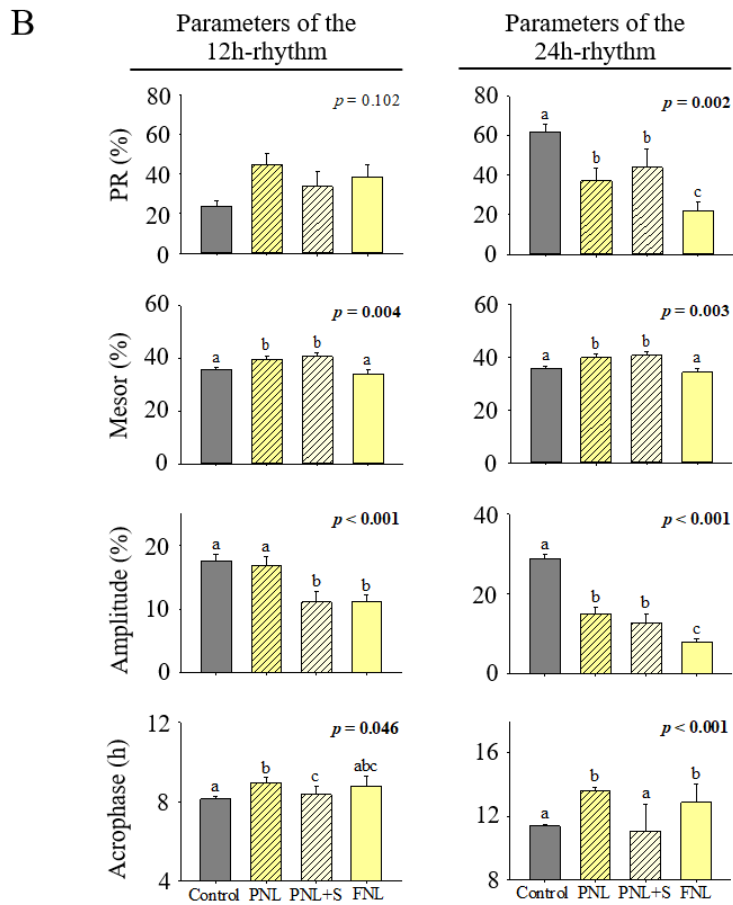
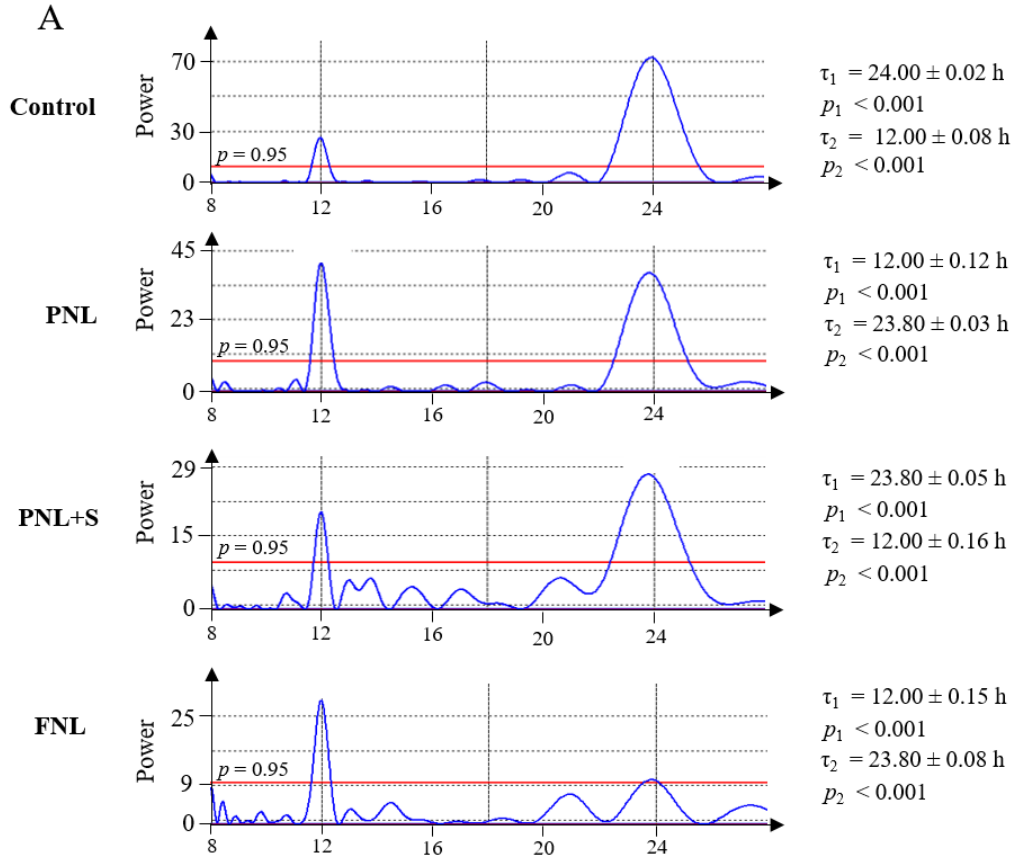
Group level



**Figure 2.** Effect of ALAN modalities (PNL, PNL+S, FNL) at the group level on (A) the mean VOD during daytime and nighttime, (B) the mean VOD during three period of nighttime: from 19 h to 21 h, when oysters are exposed to 5 lx in all ALAN conditions, from 21 h to 3 h, when oysters are exposed to darkness during PNL, to 0.1 lx during PNL+S, and to 5 lx during FNL, and from 3 h to 5 h, when oysters are exposed to 5 lx in all ALAN conditions. Data are expressed in mean  $\pm$  SE ( $n = 10$  days). Different letters indicate significant differences between conditions ( $p < 0.05$ ).

Figure 3A shows Lomb and Scargle periodograms at the group level revealing that in each experimental condition oysters' mean VOD express two significant and distinct periodicities ( $\tau_1, \tau_2$ ) of 12 h and 24 h, revealing two rhythms, validated by the Cosinor model ( $p < 0.001$ ). For each condition, these periodicities are more or less pronounced according to percent rhythm values described in the table S3. In the control condition, oysters' behavior expresses a first significant period ( $\tau_1$ ) of  $24.00 \pm 0.02$  h (mean  $\pm$  SD) and a less pronounced period ( $\tau_2$ ) of  $12.00 \pm 0.08$  h considering that the 12 h period power (Fig. 3) and percent rhythm (Tab. S3) are less important than for the 24 h period. In the PNL+S condition, VOD data also express a first

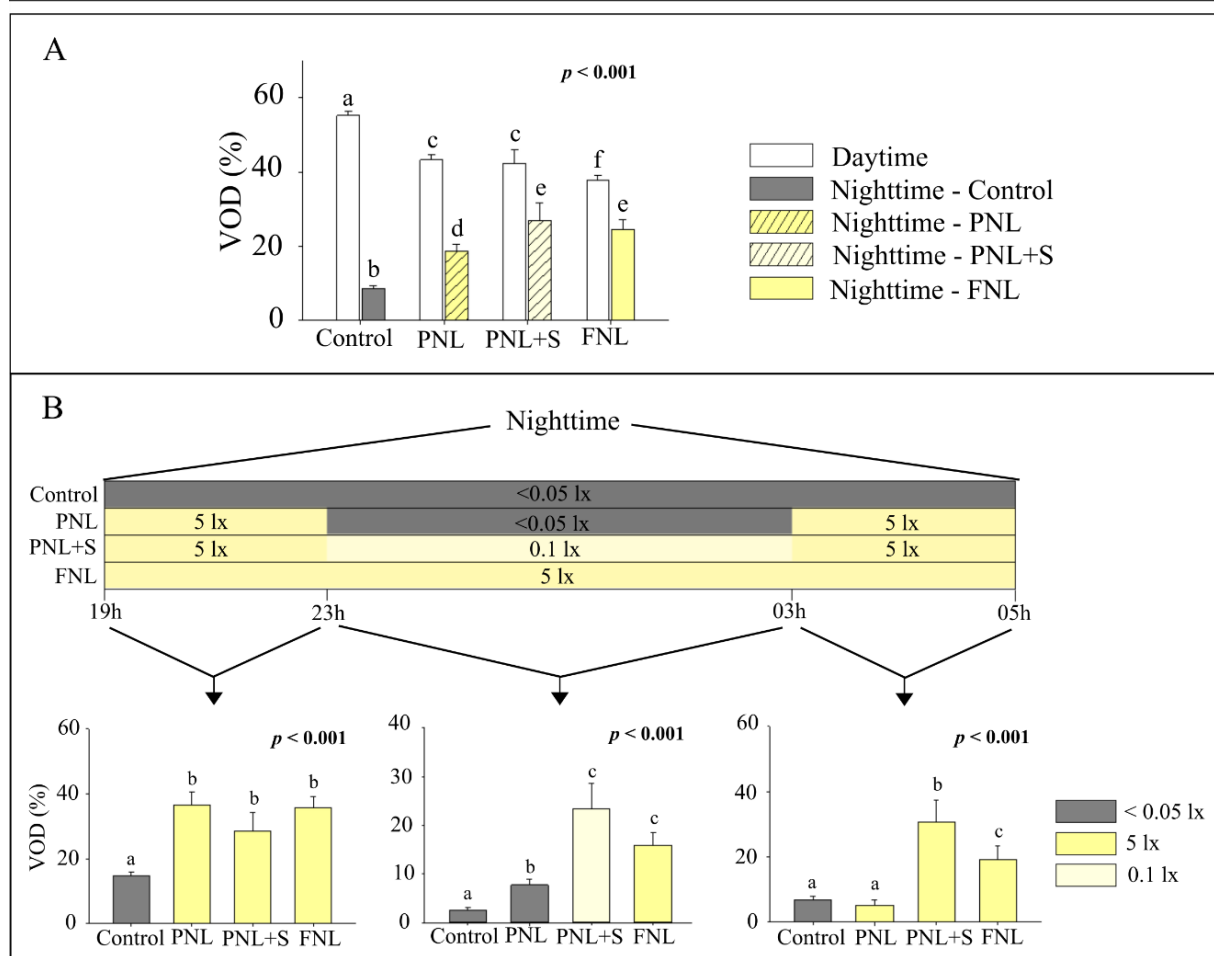
significant period ( $\tau_1$ ) of  $23.80 \pm 0.05$  h and a less pronounced period ( $\tau_2$ ) of  $12.00 \pm 0.16$  h, but with a reduced difference between the 24 h and 12 h period compared to the control condition. On the contrary, the PNL and FNL conditions show a more pronounced 12 h period ( $\tau_1$ ) ( $12.00 \pm 0.12$  h and  $12.00 \pm 0.05$  h respectively) compared to the 24 h one ( $\tau_2$ ) ( $23.80 \pm 0.03$  h and  $23.80 \pm 0.08$  h respectively), with a difference more pronounced between the two significant periods for FNL. The figure 3B shows the results of the analyses of chronobiological parameters (percent rhythm (PR), mesor, amplitude, acrophase) for each of the two main significant periodicities (12 h and 24 h) to reveal ALAN effects according to its modality on these two rhythms at the group level (results are detailed in Table S3). Concerning the 12h-rhythm, the tested ALAN modalities have no significant effect on the strength of the rhythm (PR) ( $p = 0.102$ ), while the mesor significantly increases for PNL and PNL+S but not for FNL compared to the control ( $p = 0.004$ ). The 12h-rhythm amplitude is significantly lower for PNL+S and FNL only compared to the control ( $p < 0.001$ ). Finally, the 12h-rhythm acrophase is significantly delayed ( $p = 0.046$ ) for PNL and PNL+S but not for FNL even if an increasing trend is noticeable. ALAN conditions also disrupt the 24h-rhythm parameters. All ALAN modalities induce a significant decrease of the strength of the rhythm with a significantly more important decrease in the FNL condition. The mesor of the 24h-rhythm significantly increases during PNL and PNL+S only ( $p = 0.003$ ) and its amplitude significantly decreases for all of the ALAN conditions compared to the control, with a significantly more important decrease for FNL ( $p < 0.001$ ). Finally, the 24h-rhythm shows a significantly delayed acrophase ( $p < 0.001$ ) for PNL and FNL but not for PNL+S.



**Figure 3.** Chronobiological analysis of the oysters' mean valve behavior at the group level. (A) Effects of ALAN modalities (PNL, PNL+S, FNL) on significant periodicities detected with the Lomb and Scargle periodograms (above the dotted line ( $p > 0.95$ )) and validated by the cosinor model ( $p < 0.05$ ). (B) Effect of ALAN modalities (PNL, PNL+S, FNL) on chronobiological parameters of oysters' 12h (left column) and 24h (right column) -rhythms: the percent rhythm (PR), the mesor, the amplitude, and the acrophase of the rhythm. Data are expressed in mean  $\pm$  SE with the SE showing the daily variability of the group's significant rhythm parameters ( $n = 10$  days). Different letters show significant differences between conditions ( $p < 0.05$ ).

Then, statistical analyses were conducted at the individual level on oysters keeping a significant daily rhythm (Fig. 4 and 5). The analyses on the daytime / nighttime difference of their mean daily VOD reveals that in all conditions a diurnal pattern is expressed ( $p < 0.001$ ; Fig. 4A). However, this difference is reduced for all ALAN modalities, due on one hand to a decrease of the mean VOD during daytime with a more important decrease for FNL. On the other hand, oysters' activity shows a significant increase for all ALAN modalities during nighttime compared to the control, but significantly higher for PNL+S and FNL. Then, Fig. 4B shows mean VOD of rhythmic oysters during different parts of the night. From 19 h to 23 h, when oysters in all ALAN condition are exposed to a direct ALAN source (5 lx), their mean VOD significantly increases compared to the control condition ( $p < 0.001$ ). From 23 to 3 h ALAN intensity varies between conditions with a null intensity ( $< 0.05$  lx) for PNL, a skyglow intensity (0.1 lx) for PNL+S and an ALAN direct source intensity (5 lx) for FNL. Results show that the oysters mean VOD significantly increases in presence of ALAN no matter its intensity, but with a significantly more important increase for PNL+S and FNL compared to PNL ( $p < 0.001$ ). Finally, for the last part of the nighttime (from 3 h to 5 h), oysters were once again exposed to a direct ALAN source (5 lx) in each ALAN condition. On the contrary to the first part of the night, there were no significant difference of the mean VOD between the control and PNL conditions. However, the mean VOD significantly increases during PNL+S and FNL, with a significantly more important increase for PNL+S ( $p < 0.001$ ).

Individual level

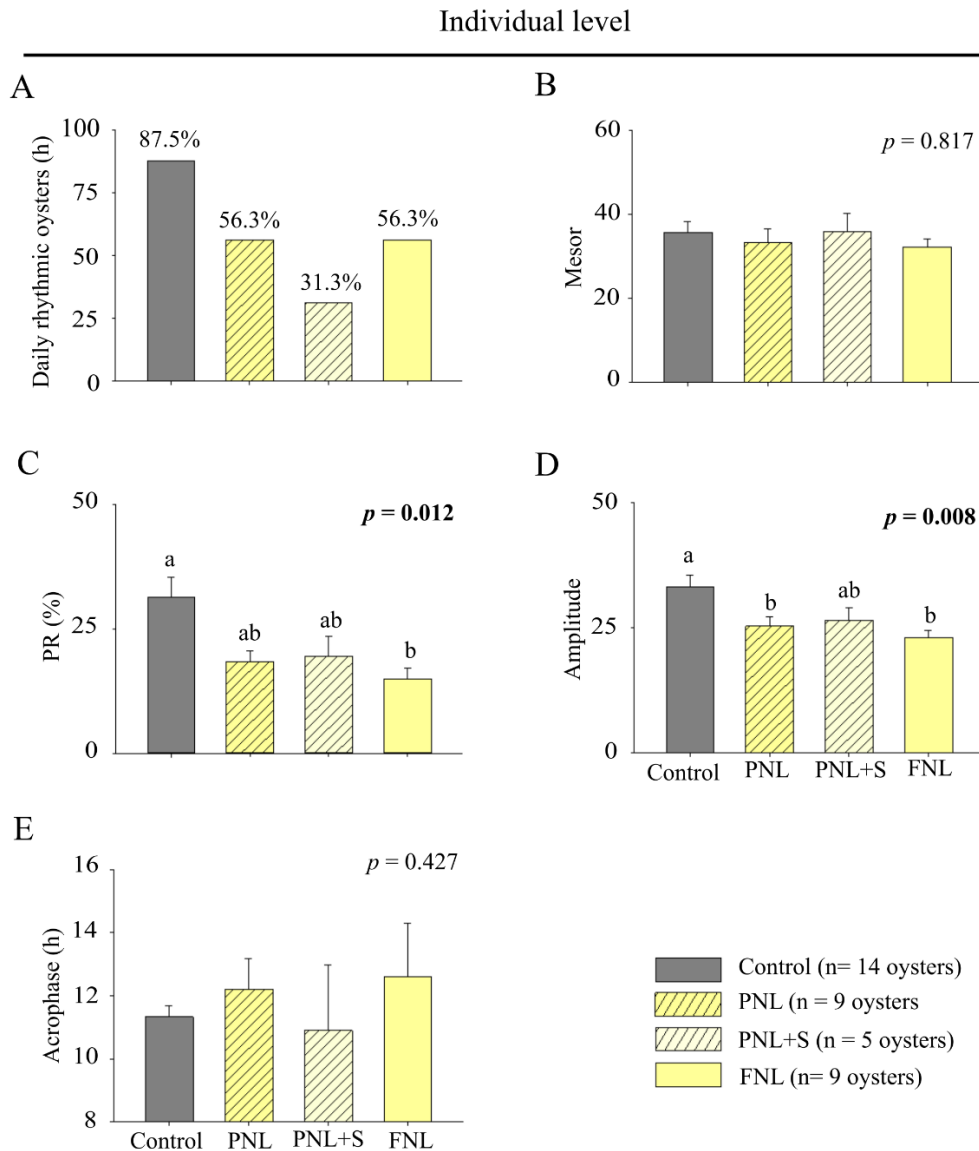


**Figure 4.** Effect of ALAN modalities (PNL, PNL+S, FNL) at the individual level on oysters that maintain a significant daily rhythm on (A) the mean VOD during daytime and nighttime, (B) the mean VOD during three period of nighttime: from 19 h to 21 h, when oysters are exposed to 5 lx in all ALAN conditions, from 21 h to 3 h, when oysters are exposed to <0.05 lx (PNL), 0.1 lx (PNL+S) or 5 lx (FNL), and from 3 h to 5 h, when oysters are exposed to 5 lx in all ALAN conditions. Data are expressed in mean ± SE (n = 5 – 14 rhythmic oysters / condition). Different letters indicate significant differences (*p* < 0.05).

Figure 5A reveals that the percentage of oysters maintaining a daily rhythm is reduced in all ALAN conditions. This percentage decreases from 87.5% in the control condition to 56.3% for PNL and FNL and to 31.3% for PNL+S, which corresponds respectively to a loss of 35.7 % and 64.2 % of individuals having a daily rhythm compared to the control. Therefore, PNL+S is the ALAN modality causing the most important loss of oysters having a daily rhythm. Then, chronobiological analyses were performed on these oysters that kept a significant daily behavioral rhythm (results are detailed in Table S4). First, ALAN modalities do not affect the

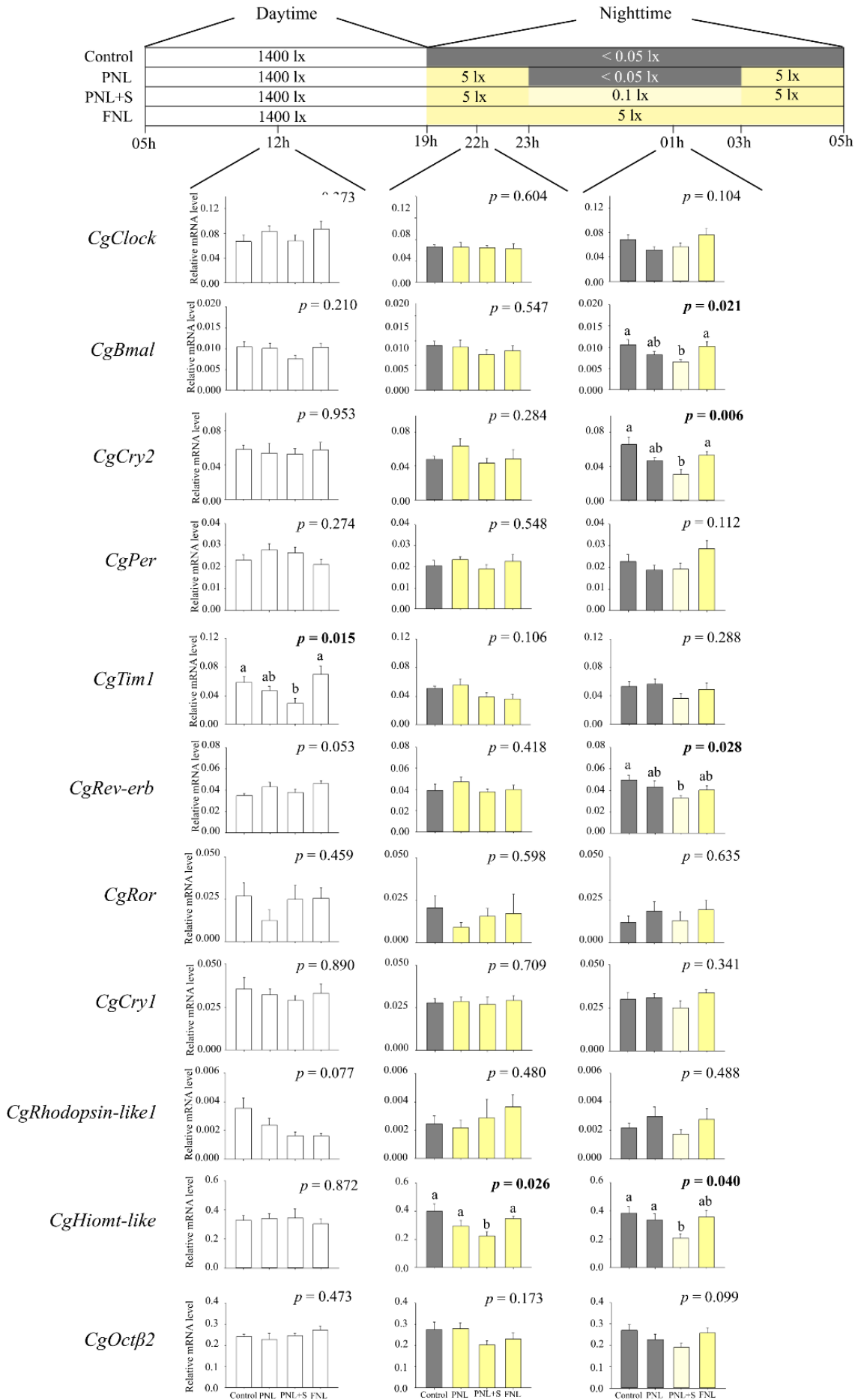


mesor of their behavioral rhythm ( $p = 0.817$ ; Fig. 5B). However, the other parameters are affected by ALAN such as the strength of the rhythms (PR), which significantly decreases for FNL but not for PNL and PNL+S even if a decreasing trend is observed ( $p = 0.012$ ; Fig. 5C). Moreover, the rhythm's amplitude is significantly lower in PNL and FNL compared to the control, with a decreasing trend for PNL+S ( $p = 0.008$ ; Fig. 5D). Finally, ALAN conditions do not significantly affect the acrophase ( $p = 0.427$ ; Fig. 5E).



**Figure 5.** Effect of ALAN modalities (PNL, PNL+S, FNL) on the chronobiological parameters of oysters' daily rhythm at the individual level: (A) the percentage of oysters having a daily rhythm (in the period range of 20–28 h), (B) the mesor, (C) the percent rhythm (PR), (D) the amplitude, and (E) the acrophase. The chronobiological parameters studied (B-E) are expressed only for oysters that maintain a significant daily rhythm. Data are expressed in mean  $\pm$  SE ( $n = 5 - 14$  rhythmic oysters / condition). Different letters show significant differences ( $p < 0.05$ ).

Finally, Figure 6 shows the effects of ALAN modalities on the expression of clock, light perception and clock-associated genes at three sampling times: one during daytime (12 h, left column), and two during nighttime (22 h and 1 h, middle and right column respectively). During daytime, ALAN shows a significant effect only on the expression of the clock gene *CgTim1* with a significant decrease for PNL+S only ( $p = 0.015$ ). Furthermore, at 12 h the expression of the light perception gene *CgRhodopsin-like1* tends to decrease along the ALAN modalities tested ( $p = 0.077$ ). The first sampling time during nighttime (22 h) corresponds to an intensity of 5 lx for all of the ALAN modalities. At this time, the results show a significant decrease in the expression of the clock-associated gene *CgHiomt-like* for PNL+S only ( $p = 0.026$ ). The expression of the other studied genes is not significantly affected at this sampling time. The last sampling time occurs at 1 h, when the ALAN intensity varies among the experimental conditions: no ALAN ( $< 0.05$  lx) for the control and PNL, a skyglow intensity (0.1 lx) for PNL+S, and a direct source of ALAN intensity (5 lx) for FNL. At this time, the expression of three clock genes (*CgBmal*, *CgCry2*, *CgRev-erb*) and one clock-associated gene (*CgHiomt-like*) significantly decreases during PNL+S only.



**Figure 6.** Effect of ALAN modalities (PNL, PNL+S, FNL) on the difference in relative mRNA level of eleven clock, light perception and clock-associated genes in oyster gills tissues between conditions during daytime at 12 h (left column), when oysters are exposed to daylight (1400 lx), during nighttime at 22 h (middle column), when ALAN intensity is of 5 lx for all conditions, and at 1 h (right column), when oysters are exposed to darkness during PNL and to ALAN at an intensity of 0.1 lx during PNL+S and of 5 lx during FNL. White bars indicate the gene level during daytime and, colored bars during nighttime. Data are expressed in mean  $\pm$  SE (n = 8 gills / condition / sampling time). Different letters indicate differences between conditions ( $p < 0.05$ ).

Finally, the table 1 shows the results of a Three-Way ANOVA, testing the effects of the experimental conditions (control, PNL, PNL+S, and FNL), sampling times (12, 22 and 1 h), and different gene expression on the overall relative mRNA levels of the eleven genes studied. This analyses reveals a significant effect of ALAN conditions on the overall gene expression ( $p < 0.001$ ). More precisely, the expression is significantly different between PNL+S and all of the other conditions, including the control. The Three-Way ANOVA also show a significant difference between the sampling times for PNL+S only ( $p = 0.001$ ).

**Table 1.** Three-Way Analysis of Variance testing the effect of the ALAN condition (control, PNL, PNL+S, FNL), sampling time, and the genes, on the relative mRNA level on gill tissues of all the studied genes: eleven clock, light perception and clock-associated genes. In bolt, significant  $p$ -values ( $p < 0.05$ ).

Sources of variation	$p$ -value	Degree of freedom
Genes	<b>&lt; 0.001</b>	10
Sampling time	0.237	2
Conditions	<b>&lt; 0.001</b>	3
Control vs PNL	0.174	
Control vs PNL+S	<b>&lt; 0.001</b>	
Control vs FNL	0.333	
PNL vs PNL+S	<b>&lt; 0.001</b>	
PNL vs FNL	0.424	
PNL+S vs FNL	<b>&lt; 0.001</b>	
Sampling time x Conditions	<b>0.024</b>	6
Sampling time within Control	0.449	
Sampling time within PNL	0.781	
Sampling time within PNL+S	<b>0.001</b>	
Sampling time within FNL	0.419	

## 4. Discussion

The objective of this study is to investigate the potential benefits of using PNL as an ALAN mitigation strategy on the daily rhythm of the oyster *C. gigas*. Results show that all of the tested ALAN modalities (PNL, PNL+S and FNL) affect oysters' behavioral daily rhythm but with reduced effects with PNL, intermediate effects with FNL, and the most important effects with PNL+S. PNL+S is also the only ALAN modality to affect the expression of genes involved in the circadian clock machinery and in the melatonin synthesis.

First, our study show that ALAN causes disruptive effects on oysters' behavioral daily rhythm at the group and individual levels no matter its modality. The valve behavior of control oysters follows a daily rhythm, characterized by a main period of 24 h, and also show a weak but significant period of 12 h. When exposed to ALAN, this 12h-rhythm is more pronounced for PNL + S and even becomes the dominant rhythm for PNL and FNL, while the 24h-rhythm is still present but less pronounced. The presence of these behavioral 12h-rhythm could suggest that the oysters' behavior follows a more or less marked bimodal pattern characterized by one peak activity during daytime and another during nighttime spaced about 12 h apart. This bimodal pattern has been already shown and discussed in *C. gigas* (Mat et al., 2014; Mat et al., 2016; Tran et al., 2011; Tran et al., 2020a) suggesting a real circadian bimodal rhythm or a unimodal circadian rhythm coupled to a circatidal rhythm in free-running. Then, whether we analyze the oysters' 12h- or 24h-rhythms, ALAN affects chronobiological parameters of both, whatever its modality, as it has been observed on their 24h-rhythm at several ALAN intensities (from 0.1 to 25 lx) (Botté et al., 2023a) and wavelengths (white, blue, green, and red lights) (Botté et al.).

Biological rhythms such as daily rhythm enable the synchronization of multiple physiological processes with the environment, such as foraging or reproduction, etc, giving adaptive advantages to organisms (Bradshaw and Holzapfel, 2010; Golombek and Rosenstein, 2010; Kaniewska et al., 2015). The diurnal behavior of *C. gigas* during spring and summer, as in this study, enables oysters to feed during daytime when the phytoplankton is the most abundant, answering the high energy needs especially due to growth and gametogenesis (Enríquez-Díaz et al., 2008; Mat et al., 2012; Payton et al., 2017a). To avoid that the fluctuation of food supply acts as a zeitgeber of daily rhythm, the oysters were not fed during the experiment. In the control condition, there were no observed modification of the oysters' valve behavior all along the experimental duration, indicating that the absence of food did not impact ALAN's effects on

oysters' daily rhythm. The disruption during PNL and PNL+S or loss during FNL of this diurnal behavior can induce a less efficient feeding, which might not answer the oysters' energy needs, and therefore induce potential physiological consequences, reducing its fitness. For instance, a reduced growth has been observed in the juvenile toad *Anaxyrus americanus* at an intensity of 15 lx (Dananay and Benard, 2018) as well as in the gammarids *Gammarus jazdzewskii* and *Dikerogammarus villosus* at an intensity of 2 lx (Czarnecka et al., 2021). Other oysters' biological rhythms might be disrupted by ALAN. ALAN intensity, ranging from 0.007 (skyglow) to more than 100 lx (direct ALAN source), very often exceeds that of moonlight, which has a maximum of 0.1 – 0.3 lx in full moon (Gaston, 2018; Hänel et al., 2018; Kyba et al., 2017b). Masking the moonlight cycle could alter its perception by oysters and thus disrupt their behavioral lunar rhythm (Payton and Tran, 2019). ALAN masking effects on the natural lunar cycle have been investigated in the corals *Acropora millepora* and *Acropora digitifera* for which ALAN induces a delay in corals' gametogenesis, having for consequence the desynchronization of their spawning (Ayalon et al., 2021). ALAN is also susceptible to alter oysters' reproduction success since their spawning synchronization mainly depends on daily, lunar, and annual cycles, as many parameters that ALAN can disrupt by altering their perception by oysters (Bernard et al., 2016; Payton et al., 2017a). Thus, the disruption of oysters' behavioral rhythms by ALAN is likely to have harmful consequences on their physiology and fitness as well as the ecosystems functioning since *C. gigas* provide important ecosystems services (van der Schatte Olivier et al., 2018).

Given the potential physiological and ecological consequences of ALAN exposure, limiting its effects is necessary to preserve ecosystems and can be done by testing and applying suggested mitigation strategies (dark protected areas, dim lighting, narrower spectrum, limit lighting duration...) (Gaston et al., 2012). Previous studies showed that dimming ALAN intensity up to 0.1 lx (Botté et al., 2023a) or restricting its spectrum to green wavelengths (Botté et al.) could reduce, but not suppress, ALAN's effects on oysters daily rhythm. This study brings new knowledge on the potential benefits of another mitigation strategy on oysters, which consist in changing ALAN timing and duration. Potential ecological advantages of PNL have been rarely studied and mainly on bats, which make this study one of the first to investigate PNL effects on coastal organisms and especially the first to investigate them on a bivalve to our knowledge (Pauwels, 2019). Our results reveal that ALAN effects on oysters' daily rhythm vary according to its modality. PNL induces the least important effects on the oysters' daily rhythm, while FNL shows intermediate effects and surprisingly, PNL+S induces the most important effects. Thus,

PNL mitigation strategy applied here limits ALAN effects on the oysters' daily rhythm (nighttime VOD increase, daytime VOD decrease, the strength and amplitude of the rhythm at the group level) but only when skyglow is not present throughout nighttime. PNL strategy advantages have already been showed in some of the few studies investigating the ecological interest of this mitigation strategy. For instance, Bauer et al. (2022) showed that the shift of feeding activity from daytime to nighttime in the sea urchins *Paracentrotus lividus* was reduced when a PNL strategy (ALAN switched off from 0 to 5 h) was applied.

However, Bauer et al. (2022), as in our PNL condition, does not take into account the skyglow that could be present throughout the nighttime. In PNL, oysters were in total darkness between 23 h and 3 h, when the direct ALAN source was switched off, which rarely occurs in anthropized environments. Indeed, the skyglow has a weaker intensity (estimated inferior to 0.55 lx) than direct ALAN sources but spreads further, until hundreds of km from its source (Gaston et al., 2017; Gaston, 2018; Hänel et al., 2018). Despite its weak intensity, the skyglow is not negligible since it can affect several biological processes, such as the diurnal locomotor activity of the fish *Lepomis macrochirus* (skyglow intensity of 0.5 lx) (Latchem et al., 2021). The skyglow (intensity of 0.2 lx) can also disrupt in situ the nocturnal migration of the amphipod *Talitrus saltator* guided by the moon by reducing the probability that the amphipod undertook them and by altering its orientation (Torres et al., 2020). In oysters, it is established that a 0.1 lx skyglow intensity affects their behavioral daily rhythm as well as the expression of clock, clock-associated, and light perception genes (Botté et al., 2023a). The town of Lanton (Arcachon bay), used here as a model to mimic PNL strategies, is only about 40 km from Bordeaux city, a community of nearly 820 000 inhabitants, which owns a multitude of direct ALAN sources generating skyglow. Furthermore, Lanton is surrounded by other towns in Arcachon bay that do not all apply PNL strategies. Therefore, to best recreate in the laboratory realistic conditions of the PNL strategy applied in Lanton, simulating skyglow when direct ALAN sources are switched off is necessary. This was the aim of PNL+S condition in which oysters were exposed to an intensity of 0.1 lx when direct ALAN sources (5 lx) were switched off. Results show that adding skyglow to PNL condition annihilates the benefits acquired by PNL for some studied parameters (mean nighttime VOD and 12h-rhythm's amplitude at the group level, mean VOD from 23 to 3 h at the individual scale). Furthermore, contrary to our a priori hypothesis, PNL+S also worsens some behavioral effects caused by FNL. The most striking result is a loss of 44.4 % of PNL+S oysters that kept a daily rhythm compared to FNL and PNL. Furthermore, at the group level, the mean VOD from 23 to 3 h is significantly higher

for PNL+S compared to FNL, although ALAN intensity during this period is higher for FNL. Moreover, the mean VOD of oysters in PNL+S is still significantly the highest from 3 to 5 h, while the intensity is the same in the three ALAN conditions. Even more surprising, PNL+S is the only tested ALAN modality to show molecular effects. In PNL+S condition, the overall expression of the eleven genes studied is significantly different from all of the other conditions (control, PNL, and FNL). Furthermore, the overall expression is significantly different according to the sampling time only in this condition. In particular, PNL+S significantly decreases the expression of clock genes during daytime (*CgTim1*) or nighttime at 1 h (*CgBmal*, *CgCry2*, *CgRev-erb*). Thus, the stronger behavioral effects caused by PNL+S might be explained by the fact that this ALAN modality could induce a clearer disruption of oysters' molecular clockwork contrary to the others. PNL+S also caused a significant decrease of the expression of the clock-associated gene *CgHiomt-like*, a homolog of the mammalian gene *Hiomt*, coding for an enzyme involved in the synthesis of melatonin (Pevet et al., 1980). Melatonin is a hormone believed to be produced exclusively during nighttime and known to be involved in diverse physiological functions (homeostasis, reproduction, immunity, antioxidant system ...) and especially to be a signal of darkness (Jones et al., 2015; Tan et al., 2010). In oysters, results suggest that PNL+S decreases melatonin synthesis during nighttime (22 h and 1 h) whatever ALAN intensity (0.1 or 5 lx), suggesting potential physiological consequences. The decrease of melatonin production by ALAN has been already observed in the fish *Rutilus rutilus* at 1 lx (Bruning et al., 2018b), but also at the lower intensities of 0.1–0.3 lx for *Salvelinus alpinus* (Liu et al., 2019) and of 0.01 lx for *Perca fluviatilis* (Kupprat et al., 2020). Two previous studies showed that ALAN affects the oyster's molecular clock, as well as light perception and clock-associated genes (especially the gene *CgHiomt-like*) no matter its intensity (from 0.1 lx to 25 lx) (Botté et al., 2023a) or its wavelength (blue, green, red or white lights) (Botté et al.). Here, ALAN molecular effects have not been observed for the studied light perception genes. Moreover, ALAN affects clock and clock-associated genes expression in PNL+S only and not in FNL, which is the modality approaching most the ALAN conditions used in previous studies. One explanation can be the sampling times, which might not occur at the most appropriate hours to detect significant differences between conditions. Another explanation can be due to the fact that the two changes in ALAN intensity occurring in the PNL+S condition can be perceptible by organisms and therefore more harmful than a constant intensity throughout nighttime (FNL). Nevertheless, behavioral and molecular results, in particular the loss of oysters having a daily rhythm, might suggest that PNL mitigation strategies would be harmful to oysters in the current environmental context, partly because of the skyglow. However, studies are needed to confirm



or disconfirm this hypothesis in focusing on specific physiological consequences such as the growth rate, the microbiote, etc.

A few in situ studies have investigated the effects of PNL mostly on bats. Hooker et al. (2022) tested the impacts of FNL and two PNL strategies, where ALAN, starting from the sunset, was switched off after 2 or 4 h, on the feeding activity of bats in situ. Results show that FNL induced a significant decrease of the feeding activity of the bats *Pipistrellus pygmaeus* and *Myotis* spp.. Both PNL strategies abolished FNL effects on the feeding activity of *Pipistrellus pygmaeus*, while it is the case only for the 2h-PNL strategy for *Myotis* spp.. In the third studied bat species *Pipistrellus pipistrellus*, the 2h-PNL strategy is the only condition to affect significantly its feeding activity (Hooker et al., 2022). Thus, these results highlight the species-dependent positive or negative effects of PNL strategy. Azam et al. (2015) also shows the species-dependent effects of PNL strategies on the activity of bats in situ. In *Plecotus* sp., PNL strategy had a more harmful effect on its activity than FNL, while in *Pipistrellus pipistrellus* PNL annihilated FNL effects. Finally, in most of the studied species (*Pipistrellus kuhlii*, *Pipistrellus nathusius*, *Nyctalus leislerii*, *Myotis* spp) PNL affected their activity as did FNL. Bats are nocturnal organisms but with species specific activity ranges, coinciding or not with the dark part of PNL, which might explain the difference in responses to PNL between species (Azam et al., 2015). Day et al. (2015) also highlighted the importance of timing in the implementation of PNL strategies. They tested the effect of 8 scenarios of PNL on the activity of the bat *Rhinolophus ferrumequinum* by shifting the switch-off hours by one hour from 22 to 5 h. They found that the sooner the lights are switched off, the less ALAN disrupts bat activity. Although PNL strategies usually implemented allow hours of darkness at night, the lighting switches off after midnight, which limits their benefits for this bat species (Day et al., 2015). More globally, current PNL schemes do not usually coincide with periods of high nocturnal biological activity, which are mostly around dusk and dawn (Gaston et al., 2012). In oysters, the masking of dusk and dawn by ALAN could disrupt their perception of the day length as well as the photoperiod increase or decrease, which can be used by oysters to synchronize their valve behavior at an annual scale (Payton et al., 2017a). Therefore, implementing a PNL strategy should require studying the benefits of the chosen duration and timing of lighting shutdowns in local communities.

## 5. Conclusion

With the fast increase of ALAN extent in coastal environments, the studies on this thematic are increasing, mainly focusing on the characterization on its effects on coastal organisms, but mostly forgetting to investigate the potential benefits of mitigation strategies, such as PNL. This study contributes to fill this gap by investigating the effects of PNL strategy on the oyster daily rhythm at the behavioral and molecular scales by recreating a realistic context in the laboratory. Results show that the use of PNL strategies could in theory reduce the oysters' daily rhythm disruption by ALAN. However, when adding the skyglow throughout nighttime mimicking real conditions in anthropized environments (PNL+S), many PNL strategy benefits are annihilating and can even be worsened compared to FNL effects on the oyster behavioral daily rhythm and on the molecular clock functioning. Molecular results also suggest a disruption of the melatonin synthesis in PNL+S, which might result in physiological consequences. Thus, the use of PNL as a mitigation strategy might be not suitable to limit ALAN's effects on oysters' daily rhythm and can even be more harmful than FNL. However, other studies are needed to confirm these effects in situ on oysters and to evaluate PNL effects at a community level. Indeed, studying the potential benefits of PNL strategies on diverse organisms are essential to fill a gap in the literature and to understand how to best preserve ecosystems from the growing threat that ALAN represents.

**Ethics:** All experiments complied with the laws in effect in France and they conformed to international ethical standards.

**Data accessibility:** The data underlying this study are available on Supplementary data.

### **CRedit authorship contribution statement**

**Audrey Botté:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Visualization. **Laura Payton:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - Review & Editing, Visualization. **Elisa Lefevre:** Formal analysis, Investigation. **Damien Tran:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - Review & Editing, Visualization, Funding acquisition.

All authors contributed critically to the drafts, and gave final approval for publication.

### **Competing interests**

We have no competing interests.

## Funding

This work was supported by the financial support of the French Nation Research Agency (ANR), LUCIOLE project, PRC (2022-2026) and a Bordeaux University PhD scholarship for A. Botté.

## Acknowledgments

We kindly thank Pierre Ciret, Yannick Geerebaert, Christian Portier, Thierry Garnier, and Christelle Teillet for their help during the setup of the experiments.

## References

- Andrade, H., Massabuau, J.-C., Cochrane, S., Ciret, P., Tran, D., Sow, M., Camus, L., 2016. High Frequency Non-invasive (HFNI) Bio-Sensors As a Potential Tool for Marine Monitoring and Assessments. *Front. Mar. Sci.* 3. 10.3389/fmars.2016.00187
- Ayalon, I., Rosenberg, Y., Benichou, J.I.C., Campos, C.L.D., Sayco, S.L.G., Nada, M.A.L., Baquiran, J.I.P., Ligson, C.A., Avisar, D., Conaco, C., Kuechly, H.U., Kyba, C.C.M., Cabaitan, P.C., Levy, O., 2021. Coral Gametogenesis Collapse under Artificial Light Pollution. *Curr. Biol.* 31(2), 413-419 e413. 10.1016/j.cub.2020.10.039
- Azam, C., Kerbirou, C., Vernet, A., Julien, J.F., Bas, Y., Plichard, L., Maratrat, J., Le Viol, I., 2015. Is part-night lighting an effective measure to limit the impacts of artificial lighting on bats? *Glob. Chang. Biol.* 21(12), 4333-4341. 10.1111/gcb.13036
- Bauer, F., Ritter, M., Siljeg, A., Gretschel, G., Lenz, M., 2022. Effects of artificial light at night on the feeding behaviour of three marine benthic grazers from the Adriatic Sea are species-specific and mostly short-lived. *Mar. Pollut. Bull.* 185(Pt B), 114303. 10.1016/j.marpolbul.2022.114303
- Bell-Pedersen, D., Cassone, V.M., Earnest, D.J., Golden, S.S., Hardin, P.E., Thomas, T.L., Zoran, M.J., 2005. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat. Rev. Genet.* 6(7), 544-556. 10.1038/nrg1633
- Bernard, I., Massabuau, J.C., Ciret, P., Sow, M., Sottolichio, A., Pouvreau, S., Tran, D., 2016. In situ spawning in a marine broadcast spawner, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Timing and environmental triggers. *Limnol. Oceanogr.* 61(2), 635-647. 10.1002/lno.10240
- Bingham, C., Arbogast, B., Guillaume, G.C., Lee, J.K., Halberg, F., 1982. Inferential statistical methods for estimating and comparing cosinor parameters. *Chronobiologia* 9, 397-439.

- Botté, A., Payton, L., Tran, D., 2023. Artificial light at night at environmental intensities disrupts daily rhythm of the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Pollut. Bull.* 191. 10.1016/j.marpolbul.2023.114850
- Botté, A., Payton, L., Tran, D., Unpublished results. The effects of Artificial Light at Night on behavioral rhythm and related gene expression are wavelength dependent in the oyster *Crassostrea gigas*.
- Bradshaw, W.E., Holzapfel, C.M., 2010. Light, time, and the physiology of biotic response to rapid climate change in animals. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 147-166. 10.1146/annurev-physiol-021909-135837
- Brayley, O., How, D.M., Wakefield, D.A., 2022. Biological Effects of Light Pollution on Terrestrial and Marine Organisms. *Int. J. Sustain. Light.* 24(1), 13-38. 10.26607/ijsl.v24i1.121
- Bruning, A., Holker, F., Franke, S., Kleiner, W., Kloas, W., 2018. Influence of light intensity and spectral composition of artificial light at night on melatonin rhythm and mRNA expression of gonadotropins in roach *Rutilus rutilus*. *Fish. Physiol. Biochem.* 44(1), 1-12. 10.1007/s10695-017-0408-6
- Burt, C.S., Kelly, J.F., Trankina, G.E., Silva, C.L., Khalighifar, A., Jenkins-Smith, H.C., Fox, A.S., Fristrup, K.M., Horton, K.G., 2023. The effects of light pollution on migratory animal behavior. *Trends Ecol. Evol.* 38(4), 355-368. 10.1016/j.tree.2022.12.006
- Czarnecka, M., Kobak, J., Grubisic, M., Kakareko, T., 2021. Disruptive effect of artificial light at night on leaf litter consumption, growth and activity of freshwater shredders. *Sci. Total. Environ.* 786, 147407. 10.1016/j.scitotenv.2021.147407
- Dananay, K.L., Benard, M.F., 2018. Artificial light at night decreases metamorphic duration and juvenile growth in a widespread amphibian. *Proc. Biol. Sci.* 285(1882). 10.1098/rspb.2018.0367
- Davies, T.W., Duffy, J.P., Bennie, J., Gaston, K.J., 2014. The nature, extent, and ecological implications of marine light pollution. *Front. Ecol. Environ.* 12(6), 347-355. 10.1890/130281
- Davies, T.W., Duffy, J.P., Bennie, J., Gaston, K.J., 2016. Stemming the Tide of Light Pollution Encroaching into Marine Protected Areas. *Conserv. Lett.* 9(3), 164-171. 10.1111/conl.12191
- Davies, T.W., Bennie, J., Cruse, D., Blumgart, D., Inger, R., Gaston, K.J., 2017. Multiple night-time light-emitting diode lighting strategies impact grassland invertebrate assemblages. *Glob. Chang. Biol.* 23(7), 2641-2648. 10.1111/gcb.13615

- Davies, T.W., Smyth, T., 2018. Why artificial light at night should be a focus for global change research in the 21st century. *Glob. Chang. Biol.* 24(3), 872-882. 10.1111/gcb.13927
- Day, J., Baker, J., Schofield, H., Mathews, F., Gaston, K.J., 2015. Part-night lighting: implications for bat conservation. *Anim. Conserv.* 18(6), 512-516. 10.1111/acv.12200
- Emerson, K.J., Bradshaw, W.E., Holzapfel, C.M., 2008. Concordance of the circadian clock with the environment is necessary to maximize fitness in natural populations. *Evolution* 62(4), 979-983. 10.1111/j.1558-5646.2008.00324.x
- Enríquez-Díaz, M., Pouvreau, S., Chávez-Villalba, J., Le Pennec, M., 2008. Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquac. Int.* 17(5), 491-506. 10.1007/s10499-008-9219-1
- FAO. 2016. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Cultured Aquatic Species Information Programme *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793).
- Gaston, K.J., Davies, T.W., Bennie, J., Hopkins, J., 2012. Reducing the ecological consequences of night-time light pollution: options and developments. *J. Appl. Ecol.* 49(6), 1256-1266. 10.1111/j.1365-2664.2012.02212.x
- Gaston, K.J., Bennie, J., 2014. Demographic effects of artificial nighttime lighting on animal populations. *Environ. Rev.* 22(4), 323-330. 10.1139/er-2014-0005
- Gaston, K.J., Duffy, J.P., Bennie, J., 2015. Quantifying the erosion of natural darkness in the global protected area system. *Conserv. Biol.* 29(4), 1132-1141. 10.1111/cobi.12462
- Gaston, K.J., Davies, T.W., Nedelec, S.L., Holt, L.A., 2017. Impacts of Artificial Light at Night on Biological Timings. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 48(1), 49-68. 10.1146/annurev-ecolsys-110316-022745
- Gaston, K.J., 2018. Lighting up the nighttime. *Science* 362(6416), 744-746. 10.1126/science.aau8226
- Golombek, D.A., Rosenstein, R.E., 2010. Physiology of circadian entrainment. *Physiol. Rev.* 90(3), 1063-1102. 10.1152/physrev.00009.2009
- Gouthiere, L., Mauvieux, B., Davenne, D., Waterhouse, J., 2005. Complementary methodology in the analysis of rhythmic data, using examples from a complex situation, the rhythmicity of temperature in night shift workers. *Biological Rhythm Research* 36(3), 177-193. 10.1080/09291010400026298
- Gouthière, L., Mauvieux, B., 2003. Etapes essentielles dans l'analyse des rythmes: qualité des données expérimentales, recherche de périodes par analyses spectrales de principes divers,

- modélisation. XXXVème Congrès Société Francoph Chronobiol, Université de Saint-Etienne.
- Hänel, A., Posch, T., Ribas, S.J., Aubé, M., Duriscoe, D., Jechow, A., Kollath, Z., Lolkema, D.E., Moore, C., Schmidt, N., Spoelstra, H., Wuchterl, G., Kyba, C.C.M., 2018. Measuring night sky brightness: methods and challenges. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 205, 278-290. 10.1016/j.jqsrt.2017.09.008
- Heinen, R., Sanchez-Mahecha, O., Bezemer, T.M., Dominoni, D.M., Knappe, C., Kollmann, J., Kopatsch, A., Pfeiffer, Z.A., Schloter, M., Sturm, S., Schnitzler, J.-P., Vlot, A.C., Weisser, W.W., 2023. Part-night exposure to artificial light at night has more detrimental effects on aphid colonies than fully lit nights. *bioRxiv*. 10.1101/2022.10.24.513514
- Helm, B., Visser, M.E., Schwartz, W., Kronfeld-Schor, N., Gerkema, M., Piersma, T., Bloch, G., 2017. Two sides of a coin: ecological and chronobiological perspectives of timing in the wild. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B., Biol. Sci.* 372(1734). 10.1098/rstb.2016.0246
- Hooker, J., Lintott, P., Stone, E., 2022. Lighting up our waterways: Impacts of a current mitigation strategy on riparian bats. *Environ. Pollut.* 307, 119552. 10.1016/j.envpol.2022.119552
- Jones, T.M., Durrant, J., Michaelides, E.B., Green, M.P., 2015. Melatonin: a possible link between the presence of artificial light at night and reductions in biological fitness. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B., Biol. Sci.* 370(1667). 10.1098/rstb.2014.0122
- Kaniewska, P., Alon, S., Karako-Lampert, S., Hoegh-Guldberg, O., Levy, O., 2015. Signaling cascades and the importance of moonlight in coral broadcast mass spawning. *Elife* 4. 10.7554/eLife.09991
- Kupprat, F., Holker, F., Kloas, W., 2020. Can skyglow reduce nocturnal melatonin concentrations in Eurasian perch? *Environ. Pollut.* 262, 114324. 10.1016/j.envpol.2020.114324
- Kyba, C.C.M., Mohar, Posch, 2017a. How bright is moonlight? *Astron. Geophys.* 58(1), 1.31-31.32. 10.1093/astrogeo/atx025
- Kyba, C.C.M., Kuester, T., Sanchez de Miguel, A., Baugh, K., Jechow, A., Holker, F., Bennie, J., Elvidge, C.D., Gaston, K.J., Guanter, L., 2017b. Artificially lit surface of Earth at night increasing in radiance and extent. *Sci. Adv.* 3(11), e1701528. 10.1126/sciadv.1701528
- Latchem, E., Madliger, C.L., Abrams, A.E.I., Cooke, S.J., 2021. Does Artificial Light at Night Alter the Subsequent Diurnal Behavior of a Teleost Fish? *Wat. Air and Soil Poll.* 232(2). 10.1007/s11270-021-05023-4

- Liu, Q., Manning, A.J., Duston, J., 2019. Light intensity and suppression of nocturnal plasma melatonin in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 228, 103-106. 10.1016/j.cbpa.2018.11.012
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4), 402-408. 10.1006/meth.2001.1262
- Longcore, T., Rich, C., 2016. Artificial night lighting and protected lands: Ecological effects and management approaches. Natural Resource Report NPS/NRSS/NSNS/NRR—2016/1213. National Park Service, F.C., Colorado.
- Luginbuhl, C.B., Boley, P.A., Davis, D.R., 2014. The impact of light source spectral power distribution on sky glow. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 139, 21-26. 10.1016/j.jqsrt.2013.12.004
- Marangoni, L.F.B., Davies, T., Smyth, T., Rodriguez, A., Hamann, M., Duarte, C., Pendoley, K., Berge, J., Maggi, E., Levy, O., 2022. Impacts of artificial light at night in marine ecosystems-A review. *Glob Chang Biol.* 10.1111/gcb.16264
- Mat, A.M., Massabuau, J.C., Ciret, P., Tran, D., 2012. Evidence for a plastic dual circadian rhythm in the oyster *Crassostrea gigas*. *Chronobiol. Int.* 29(7), 857-867. 10.3109/07420528.2012.699126
- Mat, A.M., Massabuau, J.-C., Ciret, P., Tran, D., 2014. Looking for the clock mechanism responsible for circatidal behavior in the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 161(1), 89-99. 10.1007/s00227-013-2317-2
- Mat, A.M., Perrigault, M., Massabuau, J.C., Tran, D., 2016. Role and expression of cry1 in the adductor muscle of the oyster *Crassostrea gigas* during daily and tidal valve activity rhythms. *Chronobiol. Int.* 33(8), 949-963. 10.1080/07420528.2016.1181645
- Partch, C.L., Green, C.B., Takahashi, J.S., 2014. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell. Biol.* 24(2), 90-99. 10.1016/j.tcb.2013.07.002
- Pauwels, J., 2019. Light pollution & biodiversity: What are the levers of action to limit the impact of artificial lighting on nocturnal fauna? Museum national d'histoire naturelle. Paris.
- Payton, L., Perrigault, M., Hoede, C., Massabuau, J.C., Sow, M., Huvet, A., Boullot, F., Fabioux, C., Hegaret, H., Tran, D., 2017a. Remodeling of the cycling transcriptome of the oyster *Crassostrea gigas* by the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Sci. Rep.* 7(1), 3480. 10.1038/s41598-017-03797-4

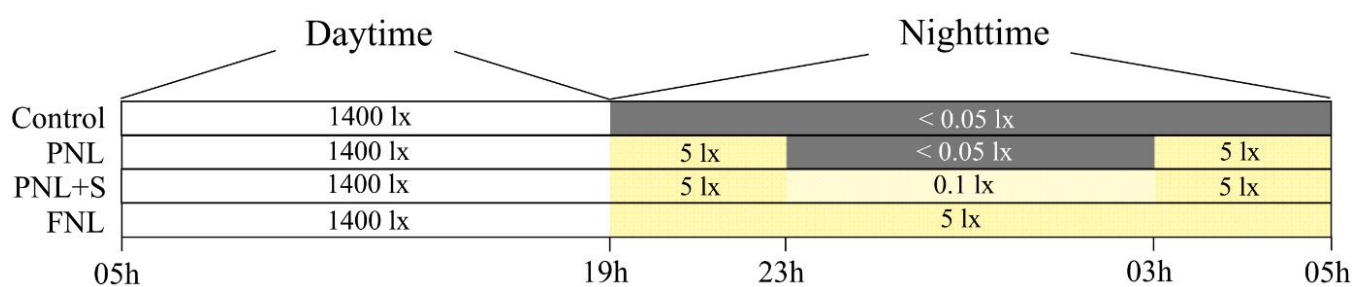
- Payton, L., Sow, M., Massabuau, J.C., Ciret, P., Tran, D., 2017b. How annual course of photoperiod shapes seasonal behavior of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. PLoS One 12(10), e0185918. 10.1371/journal.pone.0185918
- Payton, L., Tran, D., 2019. Moonlight cycles synchronize oyster behaviour. Biol. Lett. 15(1), 20180299. 10.1098/rsbl.2018.0299
- Perrigault, M., Tran, D., 2017. Identification of the Molecular Clockwork of the Oyster *Crassostrea gigas*. PLoS One 12(1), e0169790. 10.1371/journal.pone.0169790
- Pevet, P., Balemans, M.G., Legerstee, W.C., Vivien-Roels, B., 1980. Circadian rhythmicity of the activity of hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the formation of melatonin and 5-methoxytryptophol in the pineal, retina, and harderian gland of the golden hamster. J. Neural. Transm. 49(4), 229-245. 10.1007/BF01252128
- Ruesink, J.L., Lenihan, H.S., Trimble, A.C., Heiman, K.W., Micheli, F., Byers, J.E., Kay, M.C., 2005. Introduction of Non-Native Oysters: Ecosystem Effects and Restoration Implications. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 36(1), 643-689. 10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152638
- Sanders, D., Gaston, K.J., 2018. How ecological communities respond to artificial light at night. J. Exp. Zool. A. Ecol. Integr. Physiol. 329(8-9), 394-400. 10.1002/jez.2157
- Sanders, D., Frago, E., Kehoe, R., Patterson, C., Gaston, K.J., 2021. A meta-analysis of biological impacts of artificial light at night. Nat. Ecol. Evol. 5(1), 74-81. 10.1038/s41559-020-01322-x
- Scargle, J.D., 1982. Studies in astronomical time series analysis. II - Statistical aspects of spectral analysis of unevenly spaced data. Astrophys. J. 263. 10.1086/160554
- Smyth, T.J., Wright, A.E., McKee, D., Tidau, S., Tamir, R., Dubinsky, Z., Iluz, D., Davies, T.W., 2021. A global atlas of artificial light at night under the sea. Elementa: Science of the Anthropocene. 9(1). 10.1525/elementa.2021.00049
- Svechkina, A., Portnov, B.A., Trop, T., 2020. The impact of artificial light at night on human and ecosystem health: a systematic literature review. Landsc. Ecol. 35(8), 1725-1742. 10.1007/s10980-020-01053-1
- Tan, D.X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Paredes, S.D., Korkmaz, A., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Fuentes-Broto, L., Reiter, R.J., 2010. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. Biol Rev Camb Philos Soc 85(3), 607-623. 10.1111/j.1469-185X.2009.00118.x
- Torres, D., Tidau, S., Jenkins, S., Davies, T., 2020. Artificial skyglow disrupts celestial migration at night. Curr Biol 30(12), R696-R697. 10.1016/j.cub.2020.05.002



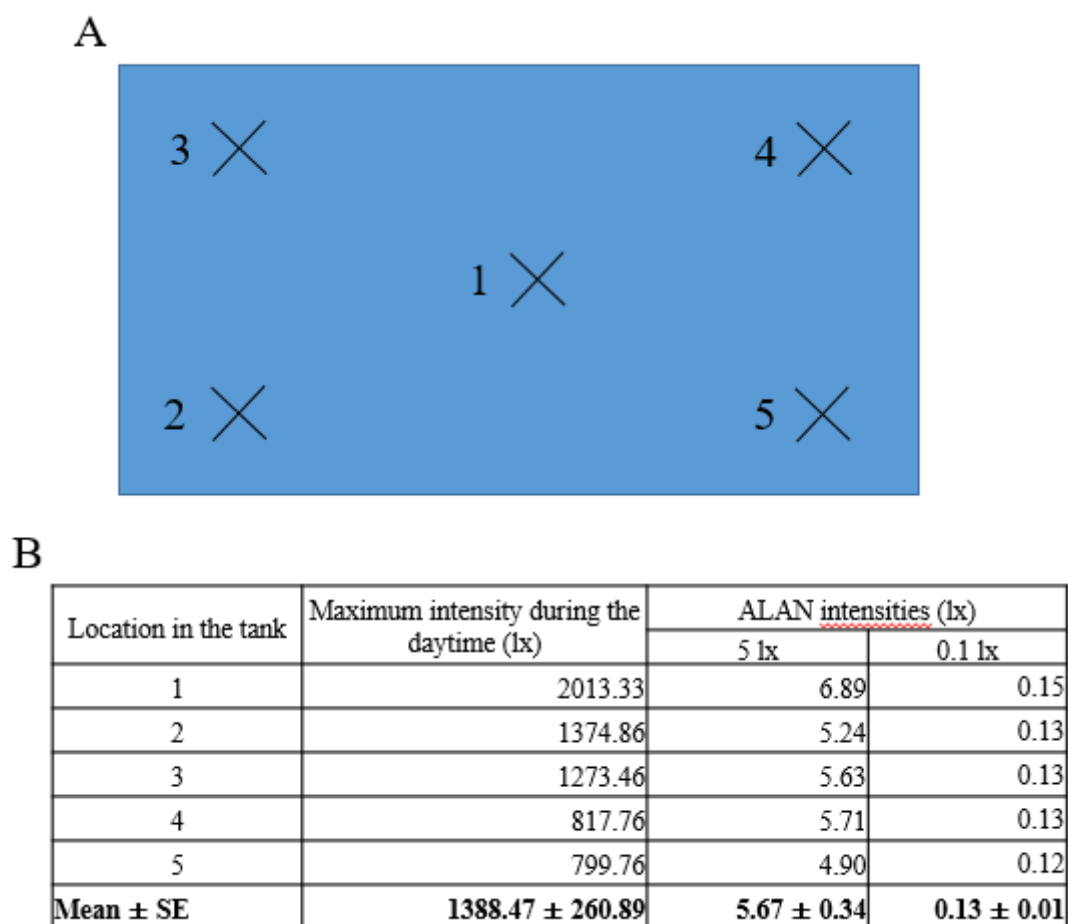
- Tran, D., Nadau, A., Durrieu, G., Ciret, P., Parisot, J.P., Massabuau, J.C., 2011. Field chronobiology of a molluscan bivalve: how the moon and sun cycles interact to drive oyster activity rhythms. *Chronobiol. Int.* 28(4), 307-317. 10.3109/07420528.2011.565897
- Tran, D., Perrigault, M., Ciret, P., Payton, L., 2020. Bivalve mollusc circadian clock genes can run at tidal frequency. *Proc. Biol. Sci.* 287(1918), 20192440. 10.1098/rspb.2019.2440
- van der Schatte Olivier, A., Jones, L., Vay, L.L., Christie, M., Wilson, J., Malham, S.K., 2018. A global review of the ecosystem services provided by bivalve aquaculture. *Rev. Aquac.* 12(1), 3-25. 10.1111/raq.12301
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., Zhang, B., 2012. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant. Mol. Biol.* 10.1007/s11103-012-9885-2

### 3. Annexes

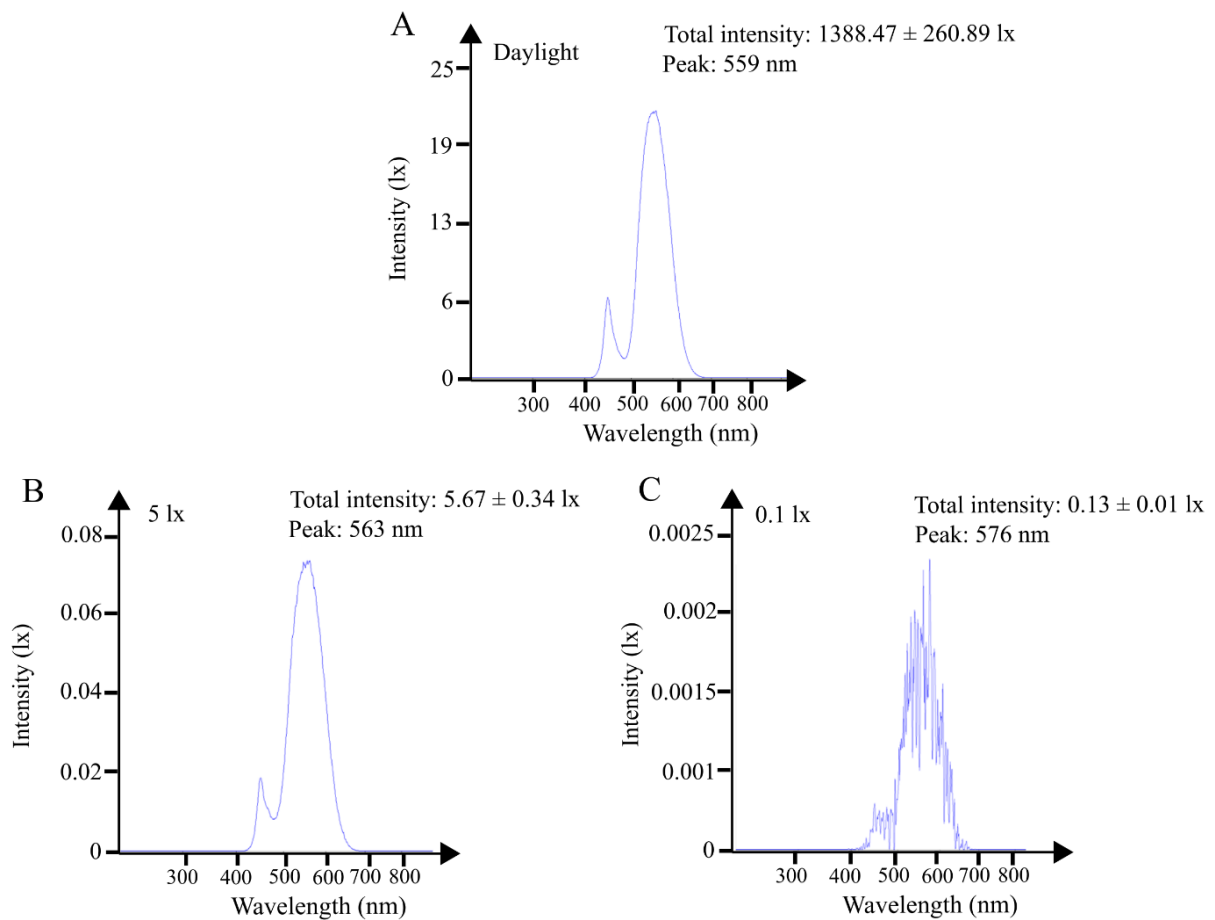
**Supplementary material:** Botté, A., Payton, L., Lefeuvre, E., Tran, D., 2023b. Is part-night lighting a suitable mitigation strategy to limit ALAN's effects on the biological rhythm at the behavioral and molecular scales of the oyster *Crassostrea gigas*? *Sci. Total Environ.* 10.1016/j.scitotenv.2023.167052



**Figure S1.** Daily light during the 10 days of exposure to the control condition and the ALAN treatments (PNL, PNL+S, FNL).



**Figure S2.** Measurements of underwater intensities and spectra during daytime and in all ALAN conditions. (A) Five locations in the experimental tank (L x W x H: 74.8 x 54.8 x 40.8 mm) used for underwater intensity and spectral measurements. The depth of the measure is done at the oyster level. (B) Values of underwater measurements of the maximum light intensity during the daytime and ALAN intensities for each position in the tank, and the mean  $\pm$  SE.



**Figure 3.** Spectrum of the maximum light intensity during daytime (A), and light spectra of the two main ALAN intensities used measured underwater near the oysters: 5 lx (B) and 0.1 lx (C).

**Table S1.** Forward, reverse primers sequences used for Real-Time PCR analysis in *Crassostrea gigas*.

GeneBank access	Gene name	Forward primer	Reverse primer
<i>Crassostrea gigas</i> core clock genes			
KX371073	<i>CgClock (Clock)</i>	5'-TGGGAATGATGTCCAACAGAG-3'	5'-GGTCCATCAATGACAGGAAGT-3'
KX371075	<i>CgBmal (Bmal)</i>	5'-CACAAGTTCAGGTCAGAGTGTAG-3'	5'-TCACCTGAGGTAGACTGGTTAT-3'
KX371074	<i>CgCryptochrome 2 (Cry2)</i>	5'-AACCTTACAGCAAGCACGAA-3'	5'-TGACATCTGGCTGTGGTTTC-3'
KX371076	<i>CgPeriod (Per)</i>	5'-CCGATGACAGAAATCCCAGTAG-3'	5'-CCATCCTATTCTCCTGCTCTTG-3'
KX371077	<i>CgTimless 1 (Tim1)</i>	5'-AAAGATCCCGGACACAGTATG-3'	5'-TGGAACTCGTTCCTGACTTG-3'
KT991835	<i>CgCryptochrome 1 (Cry1)</i>	5'-TCATGAAGCAGCTCAGATACG-3'	5'-ACCTCCCAGTTCAACCAAAG-3'
KJ188106	<i>CgRev-erb (Rev-erb)</i>	5'-GACTTTGCTGATCGCTTCAAC-3'	5'-CTTCCAAGTCTCCACATTTTC-3'
EKC18621	<i>CgRor (Ror)</i>	5'-CTACGTGAGCAGGTGTTTGA-3'	5'-CGTCCGCTATGTCCTTCAAT-3'
<i>Crassostrea gigas</i> clock-controlled genes			
EKC41768	<i>CgHiomt-like</i>	5'-CGGGTGGATCAGTGTTAGTAATG-3'	5'-TCTCTTGGCCCTGTGATAGA-3'
XM_011433587	<i>CgRhodopsin-like 1</i>	5'-TAGTTGGCGTCGGAATTTATC-3'	5'-CTGTTCGAATCTCTGCTCTCAC-3'
XM_011427386	<i>CgOctβ2</i>	5'-AATCCAGCACACTCCATAG-3'	5'-TCTGAGTCTCATCTGCGTTTG-3'
<i>Crassostrea gigas</i> housekeeping genes			
AB122066	<i>CgElongation Factor 1 (Ef1)</i>	5'-ACCACCCTGGTGAGATCAAG-3'	5'-ACGACGATCGCATTCTCTT-3'
CAD67717	<i>CgGadph</i>	5'-CGTACCAGTTCAGATGTTTCC-3'	5'-GCCTTGATGGCTGCCTTAATA-3'
Z29546	<i>Cg28S</i>	5'-AAACACGGACCAAGGAGTCT-3'	5'-AGGCTGCCTTCACTTTCATT-3'

<b>Behavioral Analyses</b>	<b>Test</b>	<b>Degree of freedom</b>	<b>p-value</b>	<b>Figure</b>
VOD during daytime and nighttime at the group level	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	7	< 0.001	2A
VOD from 19 to 23 h at the group level	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	< 0.001	2B
VOD from 23 to 03 h at the group level	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	< 0.001	2B
VOD from 03 to 05 h at the group level	One-Way ANOVA	3	< 0.001	2B
Percent Rhythm of the 12h-rhythm at the group level	One-Way ANOVA	3	0.102	3
Percent Rhythm of the 24h-rhythm at the group level	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	0.002	3
Mesor of the 12h-rhythm at the group level	One-Way ANOVA	3	0.004	3
Mesor of the 24h-rhythm at the group level	One-Way ANOVA	3	0.003	3
Amplitude of the 12h-rhythm at the group level	One-Way ANOVA	3	<0.001	3
Amplitude of the 24h-rhythm at the group level	One-Way ANOVA	3	<0.001	3
Acrophase of the 12h-rhythm at the group level	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	0.046	3
Acrophase of the 24h-rhythm at the group level	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	0.003	3
VOD during daytime and nighttime at the individual level	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	7	< 0.001	4A
VOD from 19 to 23 h at the individual level	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	< 0.001	4B
VOD from 23 to 03 h at the individual level	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	< 0.001	4B
VOD from 03 to 05 h at the individual level	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	< 0.001	4B
Mesor at the individual level	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	0.817	5B
Percent Rhythm at the individual level	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	0.012	5C
Amplitude at the individual level	One-Way ANOVA	3	0.008	5D
Acrophase at the individual level	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	0.427	5E

**Table S2a.** Description of statistical tests results for molecular analysis

Molecular Analyses for each gene	Test	Degree of freedom	p-value	Figure
CgClock expression at 14 h	One-Way ANOVA	3	0.373	6
CgClock expression at 22 h	One-Way ANOVA	3	0.604	6
CgClock expression at 01 h	One-Way ANOVA	3	0.104	6
CgBmal expression at 14 h	One-Way ANOVA	3	0.21	6
CgBmal expression at 22 h	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	0.547	6
CgBmal expression at 01 h	One-Way ANOVA	3	0.021	6
CgCry2 expression at 14 h	One-Way ANOVA	3	0.953	6
CgCry2 expression at 22 h	One-Way ANOVA	3	0.284	6
CgCry2 expression at 01 h	One-Way ANOVA	3	0.006	6
CgPer expression at 14 h	One-Way ANOVA	3	0.274	6
CgPer expression at 22 h	One-Way ANOVA	3	0.548	6
CgPer expression at 01 h	One-Way ANOVA	3	0.112	6
CgTim1 expression at 14 h	One-Way ANOVA	3	0.015	6
CgTim1 expression at 22 h	One-Way ANOVA	3	0.106	6
CgTim1 expression at 01 h	One-Way ANOVA	3	0.288	6
CgRev-erb expression at 14 h	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	0.053	6
CgRev-erb expression at 22 h	One-Way ANOVA	3	0.418	6
CgRev-erb expression at 01 h	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	0.028	6
CgRor expression at 14 h	One-Way ANOVA	3	0.459	6
CgRor expression at 22 h	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	0.598	6
CgRor expression at 01 h	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	0.635	6
CgCry1 expression at 14 h	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	0.89	6
CgCry1 expression at 22 h	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	0.709	6
CgCry1 expression at 01 h	One-Way ANOVA	3	0.341	6
CgRhodopsin-like1 expression at 14 h	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	0.077	6
CgRhodopsin-like1 expression at 22 h	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	0.48	6
CgRhodopsin-like1 expression at 01 h	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	0.488	6
CgHiomt-like expression at 14 h	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	0.872	6
CgHiomt-like expression at 22 h	Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks	3	0.026	6
CgHiomt-like expression at 01 h	One-Way ANOVA	3	0.04	6
CgOctβ2 expression at 14 h	One-Way ANOVA	3	0.473	6
CgOctβ2 expression at 22 h	One-Way ANOVA	3	0.173	6
CgOctβ2 expression at 01 h	One-Way ANOVA	3	0.099	6

**Table S2b.** Description of statistical tests results



<b>Molecular Analyses - Three Way ANOVA</b>		
<b>Source of variation</b>	<b>Degree of freedom</b>	<b>p-value</b>
Genes	10	< 0.001
Sampling time	2	0.237
Conditions	3	< 0.001
Sampling time x Conditions	6	0.024

**Table S2c.** Description of statistical tests results

**Table S3.** Results of chronobiological analysis for the control condition and ALAN treatments at the group level. Rhythmic parameters are expressed as mean  $\pm$  standard error, where the standard error shows the daily variability (n = 10 days).

	Control	PNL	PNL+S	FNL
First period (h)	24.00 $\pm$ 0.02	12.00 $\pm$ 0.02	23.80 $\pm$ 0.05	12.00 $\pm$ 0.15
Percent Rhythm (%)	61.92 $\pm$ 3.57	44.55 $\pm$ 5.61	43.78 $\pm$ 9.32	38.59 $\pm$ 6.12
Amplitude (%)	28.71 $\pm$ 1.23	16.77 $\pm$ 1.40	12.75 $\pm$ 2.14	11.11 $\pm$ 1.13
Acrophase (h)	11.39 $\pm$ 0.11	17.89 $\pm$ 0.54	11.16 $\pm$ 1.68	17.59 $\pm$ 1.02
Second period (h)	12.00 $\pm$ 0.08	23.80 $\pm$ 0.03	12.00 $\pm$ 0.16	23.80 $\pm$ 0.08
Percent Rhythm (%)	23.82 $\pm$ 2.86	37.06 $\pm$ 6.25	33.69 $\pm$ 7.83	22.19 $\pm$ 4.23
Amplitude (%)	17.52 $\pm$ 1.09	15.04 $\pm$ 1.49	11.11 $\pm$ 1.65	7.88 $\pm$ 0.87

ALAN modality																			
Control					PNL					PNL+S					FNL				
Period (h)	Mesor (%)	PR (%)	Amplitude (%)	Acrophase (h)	Period (h)	Mesor (%)	PR (%)	Amplitude (%)	Acrophase (h)	Period (h)	Mesor (%)	PR (%)	Amplitude (%)	Acrophase (h)	Period (h)	Mesor (%)	PR (%)	Amplitude (%)	Acrophase (h)
23.8	43.7	11.95	21.8	12.27	26.5	29.3	15.93	24.3	7.67	24.2	35.5	29.19	33.7	8.60	20.5	25.7	12.29	20.2	3.95
24.0	29.0	32.00	33.8	11.13	24.0	33.9	16.90	24.9	13.47	23.9	35.0	18.13	27.2	8.40	24.2	29.4	10.46	19.2	16.67
24.1	53.4	62.23	52.2	12.33	24.3	24.1	16.73	23	11.07	23.7	24.7	28.68	30.1	11.60	24.1	23.1	16.11	22.7	8.00
24.1	52.6	21.61	30.4	10.53	24.1	57.8	30.10	34.9	12.67	21.2	51.3	8.99	19.6	21.27	24.0	36.0	15.09	24.3	16.00
23.8	28.2	16.09	23.3	11.13	23.6	33.6	27.06	32.3	14.07	24.6	33.0	12.39	22.4	7.00	24.0	33.3	18.58	26.9	9.07
24.0	38.8	47.56	44.6	11.47	24.1	34.7	9.05	19.1	9.13	11.2	–	–	–	–	23.7	29.3	29.65	32.6	11.73
24.0	24.3	28.53	29.5	8.53	23.6	26.6	21.37	26.7	15.60	15.4	–	–	–	–	26.8	34.0	11.51	20.5	13.2
24.0	41.1	30.10	35.1	11.53	23.8	34.0	16.87	25.2	16.80	15.6	–	–	–	–	23.7	37.5	10.28	19.8	13.73
24.0	33.1	13.47	21.9	12.27	24.3	24.5	11.99	18.6	8.93	12.8	–	–	–	–	23.7	41.7	11.15	21.8	20.40
23.7	35.2	23.52	29.9	12.53	12.8	–	–	–	–	12.1	–	–	–	–	17.5	–	–	–	–
24.2	23.2	28.16	29	8.67	12.0	–	–	–	–	13.5	–	–	–	–	17.3	–	–	–	–
24.0	33.2	34.76	35	11.13	12.1	–	–	–	–	12.1	–	–	–	–	8.5	–	–	–	–
24.0	35.7	56.65	44.3	13.20	7.98	–	–	–	–	n.s.	–	–	–	–	17.9	–	–	–	–
23.8	28.5	32.01	33.8	12.20	15.3	–	–	–	–	n.s.	–	–	–	–	12.0	–	–	–	–
12.0	–	–	–	–	11.9	–	–	–	–	n.s.	–	–	–	–	9.9	–	–	–	–
17.0	–	–	–	–	n.s.	–	–	–	–	n.s.	–	–	–	–	16.6	–	–	–	–

**Table S4.** Results of chronobiological analysis for the control condition and ALAN treatments at the individual level (n = 16 oysters / condition). The table indicates for the control condition and ALAN conditions: the period of rhythmic individuals (the periods out of the daily range of 24 – 28 h are in italic), the mesor, the percent rhythm (PR, %), rhythm's amplitude and acrophase of oysters having a significant daily rhythm ( $p < 0.05$ ). No significant rhythms are indicated by “n.s.”.

## 4. Conclusion

Ce travail a pour but d'évaluer les potentiels bénéfiques d'une stratégie d'atténuation de LAN qui consiste à couper l'éclairage nocturne en milieu de nuit (PNL). Bien que cette stratégie soit largement appliquée aujourd'hui (près de 40 % des communes française en 2021, Syndicat de l'éclairage and ADEME (2021)), cette étude est seulement la deuxième à évaluer les potentiels avantages de cette stratégie d'atténuation PNL sur un organisme côtier, après celle de Bauer et al. (2022) faite sur deux espèces d'oursins, *Arbacia lixula* et *Paracentrotus lividus*, et sur les gastéropodes du genre *Cerithium* spp. Les résultats ont permis de montrer que toutes les modalités d'exposition à LAN testées impactent différemment le comportement journalier de l'huître. Les effets délétères sont bien limités par l'application de la stratégie PNL *stricto sensu*, c'est-à-dire avec une obscurité totale en milieu de nuit. Cependant, dans des conditions de PNL plus réalistes, c'est-à-dire en présence de *skyglow* pendant toute la durée de la nuit (qui selon l'étude de Cox et al. (2022) couvrirait 46.9 % des terres émergées contre 26.5 % pour les sources directes de LAN), les bénéfices de cette stratégie s'en trouve pour la plupart réduits, voir cette stratégie engendre des effets plus néfastes que la condition FNL. Plus surprenant encore, la condition PNL+S est la seule à avoir impacté l'expression des gènes de l'horloge moléculaire de *C. gigas*, et donc potentiellement son fonctionnement. De plus, cette modalité d'exposition est la seule à perturber l'expression d'un gène impliqué dans la synthèse de la mélatonine, suggérant des conséquences physiologiques. Ces résultats indiquent donc qu'appliquer une stratégie PNL dans les conditions environnementales actuelles (présence de *skyglow* pendant toute la nuit) pourrait être plus délétère qu'un éclairage nocturne continue chez l'huître. Afin de confirmer ce postulat, des études sur le terrain et sur du long terme sont bien sûr nécessaires.

Cette étude ainsi que les deux précédentes (chapitre IV et V) ont mis en évidence que LAN a un effet sur le rythme journalier de l'huître au niveau comportemental et moléculaire. Ce rythme journalier et plus globalement les rythmes biologiques permettent la synchronisation de multiples processus physiologiques des organismes avec leur environnement (recherche de nourriture, reproduction, communication, migration, ...) (Golombek and Rosenstein, 2010; Helm et al., 2017). La perturbation de cette organisation temporelle des organismes peut avoir d'importantes conséquences sur leur fitness et sur l'ensemble des fonctions physiologiques. C'est pourquoi dans le chapitre suivant j'ai testé l'effet de LAN, via la perturbation des rythmes biologiques, sur deux fonctions physiologiques majeures différentes : la croissance coquillière et le microbiote branchial.

# **Chapitre VII**

## **Conséquences physiologiques de la lumière artificielle nocturne chez *Crassostrea gigas* : Etude de la relation entre perturbation du rythme journalier, microbiote et croissance**

1. Préambule.....	214
2. Article: <i>Link between the robustness of diurnal behavior and disruption of the gills microbiota and the shell growth of the oyster Crassostrea gigas exposed to artificial light at night</i> .....	215
3. Annexes.....	251
4. Conclusion.....	273

## 1. Préambule

Les travaux précédents ont permis de mettre en évidence les effets de LAN sur le rythme journalier de *C. gigas* en fonction de son intensité (chapitre IV), de sa composition spectrale (chapitre V) et de sa modalité d'exposition (chapitre VI). Sachant que les rythmes biologiques tels que le rythme journalier permettent l'organisation temporelle des processus physiologiques, essentielle à la survie et à la fitness des organismes (Golombek and Rosenstein, 2010; Partch et al., 2014), l'hypothèse de travail testée dans cette étude était d'établir un lien entre la perturbation du rythme journalier par LAN et la perturbation de processus physiologiques.

Pour tester mon hypothèse, j'ai étudié l'effet de LAN sur deux fonctions physiologiques que sont la croissance coquillère de l'huitre et son microbiote branchial. Le lien de ces fonctions physiologiques avec l'horloge interne a préalablement été montré chez les bivalves pour la croissance coquillère par des analyses de sclérochronologie (Louis et al., 2022); ainsi que chez la souris pour le microbiote (Liang et al., 2015; Louis et al., 2022; Voigt et al., 2016). L'effet de LAN à faible intensité (1 lx) sur le rythme journalier de *C. gigas* au niveau comportemental et sur les gènes de l'horloge circadienne, ainsi que sur la croissance coquillère et le microbiote ont été évalué sur une durée de 28 jours, une durée d'exposition plus longue que dans les précédentes études, nécessaire pour observer des effets physiologiques plus marqués.

**2. Article: Link between the robustness of diurnal behavior, disruption of the gills microbiota, and the shell growth of the oyster *Crassostrea gigas* exposed to artificial light at night**

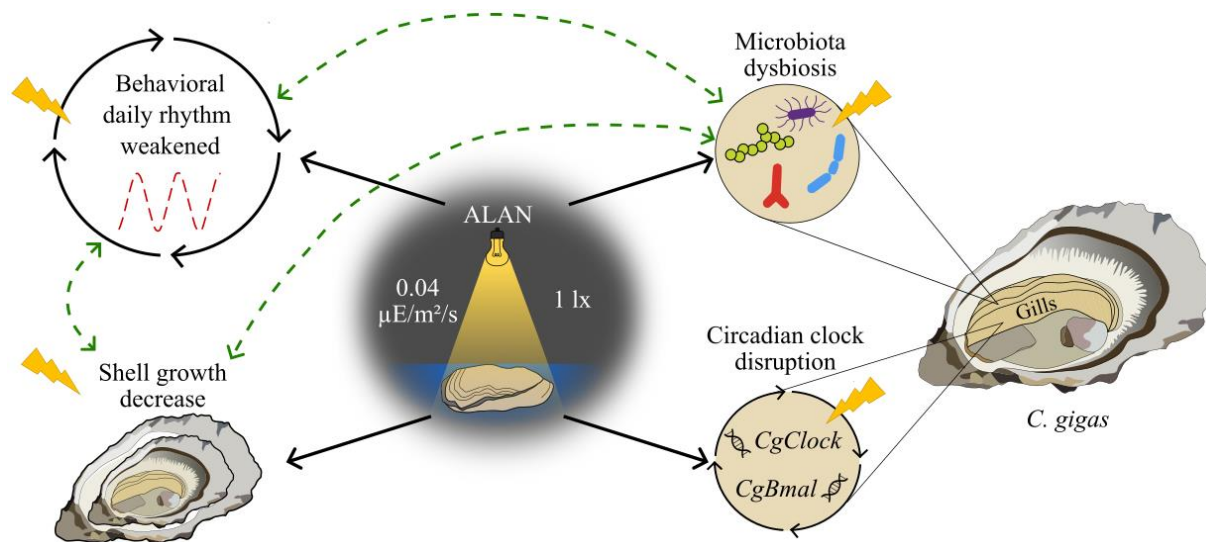
Botté, A., Bellec, L., Payton, L., Tran, D.. Link between the robustness of diurnal behavior, disruption of the gills microbiota, and the shell growth of the oyster *Crassostrea gigas* exposed to artificial light at night. (Soumis au journal *Sci. Total Environ.*)

## Abstract

By altering natural light cycles and being widespread in coastal environments, ALAN constitutes a growing threat to these ecosystems by disrupting organisms' behavior and physiology. This study evaluates over 28 days the effects of ALAN on the daily rhythm of the oyster *Crassostrea gigas*, on its shell growth, and on gills microbiota, at a low and realistic intensity (1 lx). Results reveal that ALAN strongly decreases the oysters' daily behavioral rhythm robustness and disrupts clock genes expression, correlated with a decrease in their daily shell growth rate and the disruption of their gills microbiota. We hypothesize that the disruption of the physiological temporal organization of oysters by ALAN is harmful and could lead to physiological impairments such as shell growth or gills microbiota. Thus, our work highlights ALAN's ability to affect physiological processes in a coastal keystone species, suggesting deep impacts on coastal ecosystems.

Keywords: Artificial Light at Night; *Crassostrea gigas*; valvometry; daily rhythm; gills microbiota; shell growth

## Graphical abstract





## 1. Introduction

Artificial Light at Night (ALAN) disfigures the nocturnal landscape across almost the whole world and can alter the perception of natural light/dark cycles by organisms (Falchi et al., 2016; Gaston and Bennie, 2014). The alternation between the daylight and the darkness of the night is of great importance in all ecosystems, since it is used by the endogenous molecular clock to synchronize and coordinate biological processes with the environment (Partch et al., 2014). This synchronization allows physiological processes and behavior to be organized according to environmental periodic changes, conferring adaptive advantages to organisms (Gaston et al., 2017; Golombek and Rosenstein, 2010). Thus, the presence of ALAN in the nocturnal landscape can disrupt the synchronization of the circadian clock with the light environment and alter the temporal organization of a large diversity of biological processes from the individual to the community scale (sleep, foraging, reproduction, orientation, communication, prey/predator interactions...) (Brayley et al., 2022; Sanders and Gaston, 2018; Svechkina et al., 2020). The study area of ALAN's ecological and physiological effects has greatly grown during the last decades and should be one of the main focuses of the global change research in the 21<sup>st</sup> century, considering particularly its fast expansion (2.2 % increase of lit area per year) (Davies and Smyth, 2018; Kyba et al., 2017a). This is especially true for coastal environments, in which the human population is predicted to grow suggesting a faster increase of ALAN, already present in 1.6 million km<sup>2</sup> of coastal seas at a depth of 10 m (Kummu et al., 2016; Smyth et al., 2021). Despite the growing threat that constitutes ALAN to coastal ecosystems, studies of its impacts remain scarce.

As a keystone species of coastal environments likely exposed to ALAN, the oyster *Crassostrea gigas* is a relevant biological model to investigate potential ALAN's effects on benthic ecosystems. This oyster species is a sessile mollusk endemic to Japan, introduced and cultivated in many regions of the world, especially in regions exposed to ALAN (Falchi et al., 2016; FAO, 2016; Miossec et al., 2009). Previous studies showed that the oyster behavioral daily rhythm, largely studied, is disrupted by ALAN, as well as the expression of its clock, light perception, and clock-associated genes, starting from the low intensity of 0.1 lx (Botté et al., 2023a; Mat et al., 2012; Payton et al., 2017b; Perrigault and Tran, 2017). These effects have been also shown to be wavelength dependent and worsen when applying the part-night lighting mitigation strategy in realistic conditions (part-night lighting combined with skyglow throughout nighttime) (Botté et al.; Botté et al., 2023b). Given that biological rhythms regulate the temporal organization of a multitude of physiological processes (immunity, reproduction, metabolism

...), rhythms' disruption in oysters by ALAN could have harmful consequences on this organism (Amaral et al., 2014; Helm et al., 2017; Martinez-Bakker and Helm, 2015).

Among the multitude of physiological functions that ALAN could impair acting through their temporal disorganization, we chose to study two major ones. One process that could be affected is the shell growth. Indeed, bivalve shell increment has been shown to be driven by daily light-dark cycles or the annual photoperiodism, which might not be perceived by oysters in the presence of ALAN (de Winter et al., 2023; Gaston et al., 2017; Louis et al., 2022; Payton et al., 2017a). The second studied physiological parameter that could be affected by the oysters' daily rhythm disruption is the microbiota of gills, an organ directly involved in the respiration and nutrition (Jorgensen, 1990). Microbiota (i.e. all microorganisms living in a given tissue) is known to fulfill crucial functions (nutrition, immunity, development ...) in organisms and to be linked with its host's daily rhythm. Indeed, it has been established in mice that intestinal microbiota composition oscillates on a daily basis, with oscillations being shaped by the host clock (Hou et al., 2022; Liang et al., 2015; McFall-Ngai et al., 2013; Voigt et al., 2016). Therefore, by disrupting the oyster clock, ALAN might affect its gills' microbiota. Furthermore, bivalves' microbiota taxonomic composition is depending on host (species, genotypes, tissues...) and environmental (pollution, temperature...) factors, also leading us to believe that ALAN as an environmental pressure could induce changes in gills microbiota (Auguste et al., 2020; Lokmer and Wegner, 2015; Vezzulli et al., 2018; Wegner et al., 2013).

Thus, our study investigates ALAN effects at a realistic and low intensity (1 lx) on the oyster's daily rhythm at the behavioral and molecular levels, and the consequences on two physiological parameters, the shell growth rate and the gills microbiota, during 28 days. We hypothesized that ALAN would disrupt oysters' valve behavior and daily rhythm. Moreover, we hypothesized that the circadian clock could be disrupted through the modification of gene expression involved in the clock. We also expected the oysters' shell growth rate to be modified in the presence of ALAN and the gills' microbiota structure and taxonomic composition to be disrupted.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Experimental protocol and sampling*

This experiment was conducted from February to March 2022 in the Arcachon Marine Station on 64 oysters ( $86.9 \pm 1.9$  mm shell length;  $40.0 \pm 0.7$  mm shell width; mean  $\pm$  SE) coming from

an oyster's farm of the Arcachon bay (France). Two groups of 32 oysters were established and placed in two tanks (L x W x H: 74.8 x 54.8 x 40.8 mm) continuously supplied with filtered (< 5  $\mu\text{m}$ ) and oxygenized seawater of stable composition (temperature =  $16.1 \pm 0.1$  °C, pH =  $8.0 \pm 0.1$ , salinity =  $32.2 \pm 0.1$  ‰) coming from the Arcachon bay. To limit any vibration that may disrupt oysters' behavior, the tanks were placed on an antivibrating bench in isolated room. The oysters were fed during the whole experiment with the microalgae *Chaetoceros calcitrans* (continuously supplied with algae at a flow rate of 100 mL/min, with a mean concentration of  $784.2 \pm 53.6$  and  $845.7 \pm 53.6$  cell/mL measured in the control and ALAN tanks respectively throughout the experiment (mean  $\pm$  SE).

Each group of 32 oysters was acclimated for 7 days to a Light:Dark 10:14 cycle. Daytime was from 7 to 17 h (all times noted in local time, UTC+1) with an intensity varying gradually until it reaches the maximal illuminance intensity of  $1423.89 \pm 219.88$  lx and the maximal irradiance of  $28.99$   $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  between 11:30 h and 12:30 h (Supplementary Fig. 6; Supplementary Tab. 1). This Light:Dark cycle mimics the natural daily cycle of light thanks to programmable white (397–715 nm, peak at 553 nm; Supplementary Fig. 7A) LED light bars (MH3SP3 DSunY). After acclimation, 32 oysters were exposed to a control condition, while the 32 remaining oysters were exposed during nighttime to ALAN in white light (418–684 nm, peak at 551 nm; Supplementary Fig. 7B) at an illuminance intensity of  $1.27 \pm 0.06$  lx and an irradiance intensity of  $0.04$   $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  (Supplementary Tab. 1) from 17 h to 7 h (Supplementary Fig. 6) using LED strips (MiBoxer Mi-Light WL5) for 29 days during which the valve behavior of the 32 oysters was continuously measured. All underwater illuminances were measured at the oysters' level at five positions in the tank (Supplementary Fig. 8) using a handheld spectroradiometer (Blue-Wave UVN-100, StellarNet Inc.). Underwater irradiances were measured using a handheld MPE-PAR (MICRO Class, Profiling (in-water), E (irradiance) PAR sensor, Biospherical Instrument Inc.). In the control condition, oysters were in total darkness during nighttime, corresponding to an intensity measured below 0.05 lx, the detection limit of the spectroradiometer.

## 2.2. *Crassostrea gigas* behavior and growth rate measurements

Oysters' valve behavior was continuously measured on 16 oysters per condition, for 28 days using the High-Frequency Non-Invasive (HFNI) valvometry (Andrade et al., 2016; Tran et al., 2020a). For this, two lightweight electromagnets are glued on each oyster valve and between which an electromagnetic current is generated. These electromagnets are linked to a valvometer device by flexible wires. For each oyster, these biosensors allow to continuously measure oyster

valve activity with the signal recorded every 4.8 s. Then, data are processed using Labview 8.0 (National Instrument, Austin, TX, USA) and we focus on the oysters' hourly Valve Opening Duration (VOD), which is defined as the percentage of time that an oyster spends with its valve open each hour. When the oyster valves are closed for one hour, the VOD is of 0 %. On contrary, when its valves are opened all the hour, the VOD is of 100 %. The HFNI valvometry also allows us to measure the oyster daily shell growth rate of each individual (Payton et al., 2017a; Tran et al., 2020b). Shell growth in bivalves takes place in the mantle cavity by calcification over the shell's internal surface, resulting in an increase in the minimal distance between the two electromagnets when the oyster's valves are closed. Therefore, for each individual, the shell growth rate was calculated first by isolating the minimum distance between electromagnets each day and by using the shell length measures made at the beginning and the end of the experiment. Finally, to calculate the shell growth rate, the following formula was used:  $GR = \frac{e_{d[1-28]} - e_{d1} * (\Delta L_{d28} - L_{d0})}{e_{d28} - e_{d1} L_{d0}}$  with GR the growth rate, e the minimum distance between electromagnets, d the days, and L the shell growth length.

### 2.3. Chronobiological analyses

VOD data were used for chronobiological analysis at the group and individual scales, performed using the software Time Series Analysis Serie Cosinor 8.0 (Expert Soft Technologies). First, the data quality was checked, controlling the absence of random repartition of data using the autocorrelation diagram, and determining the absence of stationary character using the Partial Autocorrelation Function (PACF) calculation (Gouthière and Mauvieux, 2003). Then, significant periodicities ( $p > 0.95$ ) were searched in the dataset using the Lomb and Scargle periodogram, and the data rhythmicity was modeled using the Cosinor model, which uses a cosine function calculated by regression (Bingham et al., 1982; Scargle, 1982). For a given period, the Cosinor model is written as:  $Y(t) = A \cos\left(\frac{2\pi t}{\tau} + \phi\right) + M + \varepsilon(t)$  with A the amplitude (the difference between the highest value of the rhythm and its average level),  $\tau$  the given period (the interval between two identical events),  $\phi$  the acrophase (peak value), M the mesor (the average level of the rhythm), and  $\varepsilon(t)$  the relative error. In order to validate the model and the existence of rhythmicity, two tests are used: the ellipse test, which must be rejected, and the probability for the null amplitude hypothesis, which have to be lower than 0.05. This model gives us another chronobiological parameter, the Percent Rhythm (PR), representing the percentage of cyclic behavior explained by the model, corresponding to the strength (or robustness) of the rhythm. These chronobiological analysis were performed at two levels: the

group and individual scales, which are two complementary approaches. Cosinor analyses are conducted at the individual level, thus, they are performed on the VOD of each oyster having a significant daily rhythm (with a period ranging from 20 to 28 h).

#### 2.4. Gene expression by RT-qPCR

On the 29<sup>th</sup> day of experiment, in each condition, the gills of 8 oysters were sampled during daytime at 12 h and during nighttime at 24 h and stored in RNAlater (Invitrogen) at –80 °C for further molecular analyses. From these gills samples, total RNA was extracted using an SV Total RNA Isolation System kit (Promega). Total RNA quantity and quality were assessed by spectrophotometry (OD230, OD260, OD280). Then, RNA reverse transcription was realized using Goscript<sup>TM</sup> Reverse Transcription System kits (Promega). Real-Time qPCR was realized using PowerUp<sup>TM</sup> SYBR<sup>TM</sup> Green Master Mix kit (Fisher Scientific). Primers sets of the two clock genes *CgClock* and *CgBmal* and the three housekeeping genes (*CgEfl*, *Cg28S*, *CgGadph*) are listed in the supplementary table 2. The determination of the relative transcript level of clock genes was done by using the comparative Ct method  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , where  $\Delta Ct = Ct_{(target\ gene)} - Ct_{(housekeeping\ gene)}$  (Livak and Schmittgen, 2001). After checking stability values, we choose to normalize the gene's expression only with the housekeeping gene *CgEfl*, since its expression was the most stable even considering geometric means of several housekeeping gene (Xie et al., 2012).

#### 2.5. Gills and water sampling and 16S rRNA bacterial diversity analyses by Illumina MiSeq

On the 29<sup>th</sup> day of the experiment, in each condition, the gills of 8 oysters used for the record of valve behavior, were sampled using sterile Eppendorf tubes (2 mL) during daytime at 12 h (maximum daytime intensity) and during nighttime at 22 h in each condition. At the same sampling times, seawater samples were collected in each tank using 1-L sterile jars and were filtered immediately after sampling on 0.22 µm sterile membranes in triplicate using a sterile filtration unit connected to a manual pump. The 32 gills samples and the 9 seawater filters samples were frozen and kept at –80 °C until DNA extraction. Total DNA was extracted from each gills samples (around 250 mg) using the QIAmp<sup>®</sup> PowerFecal<sup>®</sup> Pro DNA Kit and from the water samples using the DNeasy<sup>®</sup> PowerWater<sup>®</sup> Kit following the manufacturer's instructions. DNA from each sample (gills and water) as well as negative controls (2 extraction kit blanks and 2 PCR blanks) and a positive control (Mock) were used for amplification of prokaryotic diversity based on the 16S rRNA gene and sent to the Bordeaux Transcriptome Genome Platform ([www.pgtb.cgfb.u-bordeaux.fr](http://www.pgtb.cgfb.u-bordeaux.fr); Cestas, France). Sequencing was performed

on a 450 bp fragment of the 16S rRNA gene (V3-V4 variable region) frequently used to analyze the microbial diversity on the Illumina MiSeq platform, using 2 x 250 bp chemistry (Fadrosh et al., 2014; Klindworth et al., 2013).

### 2.6. Bioinformatics data processing

Prokaryotic 16S rRNA paired-end reads were depleted from their primers with Cutadapt version 2.10. All individual fastq files forward and reverse were processed using the DADA2 version 1.22 pipeline, describing microbial communities using Amplicon Sequence Variants (ASVs) (Callahan et al., 2016). In brief, reads were filtered and trimmed with the filterAndTrim function based on sequence quality profiles, so that Q-scores remains above 30, (truncLen = c(230, 220), maxEE = c(2,2), maxN = 0, and truncQ at 2). The error model was calculated for forward and reverse reads with learnErrors function, then filtered reads were dereplicated with default parameters and merged with a minimum overlap of 20 nucleotides, allowing no mismatches. The amplicons were then filtered by size (390 – 435 bp). Chimeras were removed with removeBimeraDenovo function and ASVs were taxonomically assigned with IdTaxa function using the Genome Taxonomy Database SilvaSSURef v138.1 (Quast et al., 2013). Filtrations were performed on BLASTn taxonomic affiliation, for which only affiliations with a minimum coverage of 99% and a minimum identity of 97% between the sample sequence and the reference sequence.

### 2.7. Statistics and reproducibility

The oysters' valve activity was measured on 16 oysters (biological replicates) for both conditions and the shell growth rate measurements were conducted on 15 and 13 oysters for control and ALAN conditions respectively. Statistical analysis performed on oysters' valve activity, chronobiological parameters, shell growth rate and variability indexes were performed using the SigmaPlot software (version 13.0; Systat Software, USA). T-tests were performed for two groups' comparisons after checking assumptions (normality of data and equal variance). If these assumptions were not validated, the non-parametric Mann-Whitney rank sum test was conducted. One-Way ANOVA were used for multiple comparisons after checking assumptions and when they were not validated, the non-parametric Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks test was performed. In case of significant differences, a Student-Newman-Keuls test was performed for all pairwise multiple comparisons. For all test results, a difference was considered significant when  $p < 0.05$ . On the behavioral and shell growth data, the Individual variability (Iv) was measured by using the formula:  $Iv = \frac{\sigma}{m}$  with  $\sigma$  the standard deviation and

m the mean of data for each individual. From the mean of individual variabilities, an Individual variability Index (IvI) was calculated as follow:  $IvI = \frac{m_{Iv_{ALAN}}}{m_{Iv_{Control}}}$ .

Microbiota analysis were conducted on 7 or 8 replicates for oysters' gills and on 2 or 3 replicates for water samples. All statistical analyses and data visualizations were carried out using R studio (R version 4.1.0). The alpha diversity was computed using the Phyloseq v1.38.0 and Vegan package v2.6-4 (McMurdie and Holmes, 2013; Oksanen et al., 2008). Differences in the alpha diversity indexes (number of ASVs and Shannon index) among conditions were tested using Kruska-Wallis One-Way ANOVA on ranks test followed, in case of significant differences by pairwise Wilcoxon tests. Beta diversity analysis were performed on Weigh Unifrac distances on a rarefied dataset and visualized using non-metric multidimensional scaling (NMDS). Sample groups were compared by a permutational multivariable analyses of variance (PERMANOVA, 999 permutation) with the Adonis function of the Vegan package (Martinez Arbizu, 2017). A difference was considered significant when  $p < 0.05$ . Differences in taxon abundances associated with each tissue and treatment were studied using a model based on negative binomial distribution, as implemented by the DESeq function in the DESeq2 package v 1.34.0. The log2 fold change is the effect size estimate: log2 fold change  $> 0$  indicates how much the relative abundance of a given ASV is higher in the ALAN condition compared to the control condition. An adjusted  $p < 0.05$  was considered significant. Boxplots and barplots, and bubbleplots were produced with ggplot2 version 3.4.2. Venn diagrams, displaying the number of ASVs shared between the conditions were generated using the ggvenn v0.1.10 package, where ASVs relative abundance were compared with only ASVs with a relative abundance superior to 0.1 % of total reads.

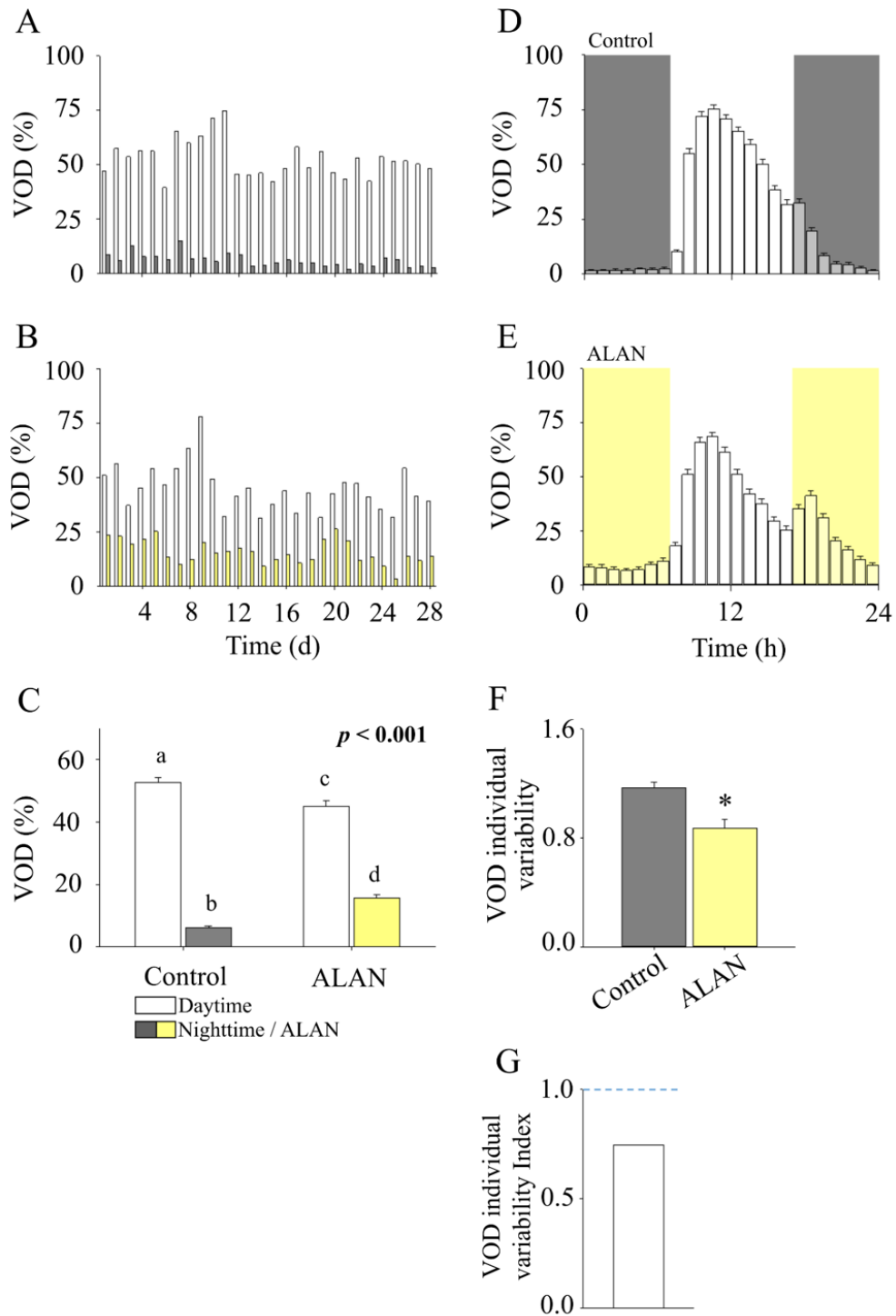
### 3. Results

The Valve Opening Duration (VOD) during daytime and nighttime for each of the 28 days of the experiment is shown in the figure 1A for control oysters and in the figure 1B for oysters exposed to ALAN at 1 lx intensity. Results reveal a daytime / nighttime VOD difference throughout the experiment for control oysters and oysters exposed to ALAN, indicating a diurnal behavior in the absence or presence of ALAN. No clear trend of evolution of daytime / nighttime VOD is observed between the beginning and the end of the experiment for both conditions. However, the figure 1C shows that this difference is significantly reduced in the presence of ALAN ( $p < 0.001$ ) due to a decrease in the daytime VOD (- 7.8 %) and an increase

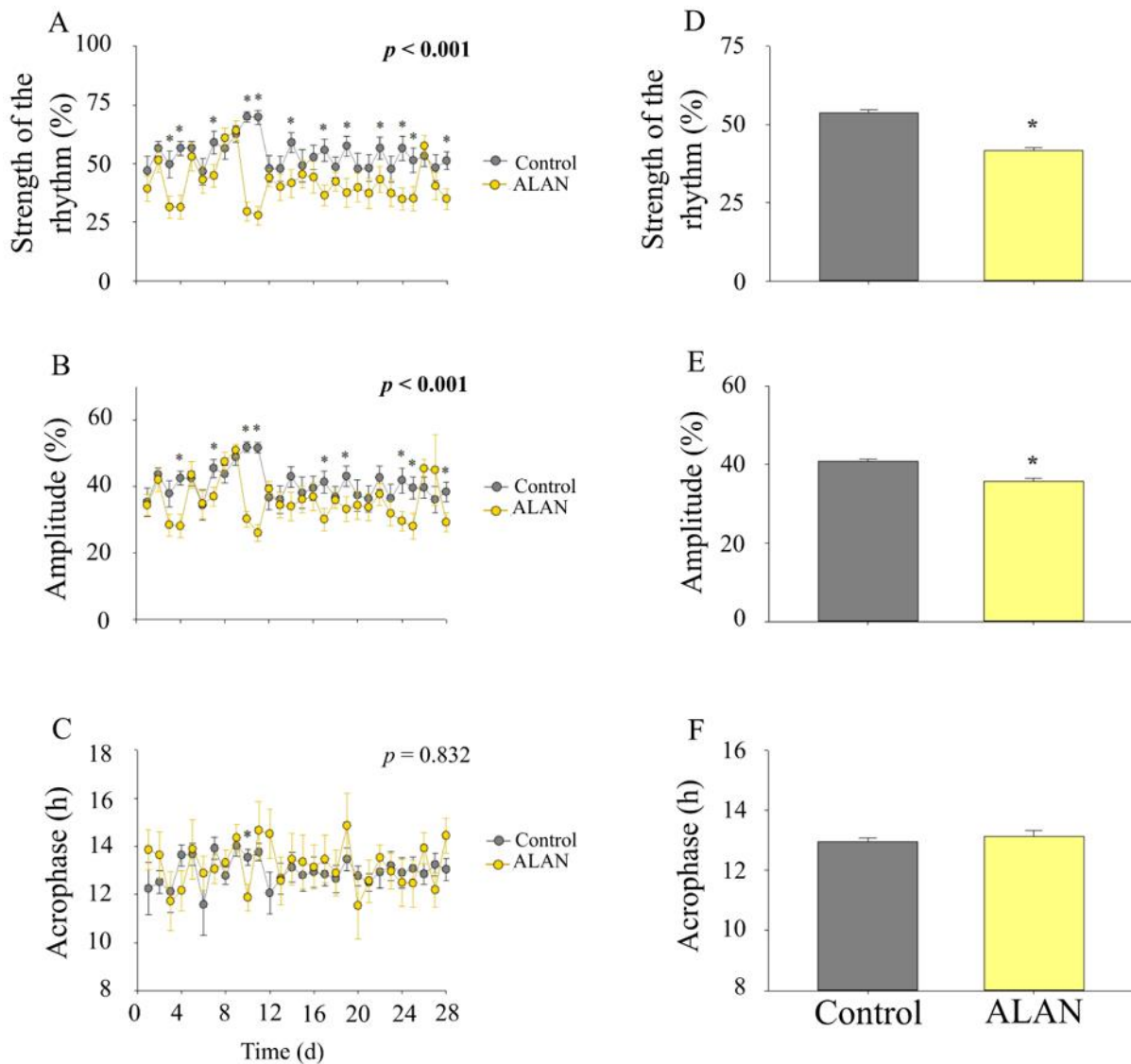
in the nighttime VOD (+ 9.6 %). Figures 1D and 1E focus on the oysters' behavioral mean daily pattern for the control and ALAN conditions respectively. The control oysters and oysters exposed to ALAN show a diurnal valve behavior characterized by a daily VOD peak at 10-11 h. In oysters exposed to ALAN, the baseline of VOD during nighttime is higher than in control oysters, and a second peak appeared 2 h after the beginning of the nighttime at 18–19 h. The figure 1F shows the individual variability of the VOD data and reveals a significant decrease of this individual variability in the ALAN condition compared to the control one ( $p < 0.001$ ), leading to an individual variability index inferior to 1 (Fig. 1G).

The figure 2 shows the results of chronobiological analyses of oysters' behavioral daily rhythm parameters: strength of the rhythm, amplitude and acrophase. The first column of graphs (Fig. 2A, 2B, 2C) shows the values (mean  $\pm$  SE, with SE indicating the individual variability,  $n = 16$  oysters) of these parameters for each day of the experiments. The second column (Fig. 2D, 2E, 2F) reveals its effects on the overall 28 days (mean  $\pm$  SE, with SE indicating the daily variability,  $n = 28$  days). The results are detailed in Supplementary Data 1. The strength of the oysters' daily rhythm significantly decreases on 12 of the 28 days of the experiment when oysters are exposed to ALAN compared to the control condition ( $p < 0.05$ ; Fig. 2A). These 12 days were spread throughout of the experiment duration. Moreover, the overall strength of the oysters' daily rhythm also shows a significant decrease when oysters are exposed to ALAN ( $p < 0.001$ ; Fig. 2D). Concerning the rhythm's amplitude, it significantly decreases in the presence of ALAN on the days 4, 7, 10, 11, 17, 19, 24, 25, and 28 (Fig. 2B), leading to an overall significant decrease of the amplitude when oysters are exposed to ALAN ( $p < 0.001$ ; Fig. 2E). Finally, the rhythm's acrophase is significantly delayed in oysters exposed to ALAN only for the 8<sup>th</sup> day of the experiment (Fig. 2C). Finally, the acrophase is not significantly affected by ALAN presence on the overall 28 days of experiment ( $p = 0.832$ ; Fig. 2F).



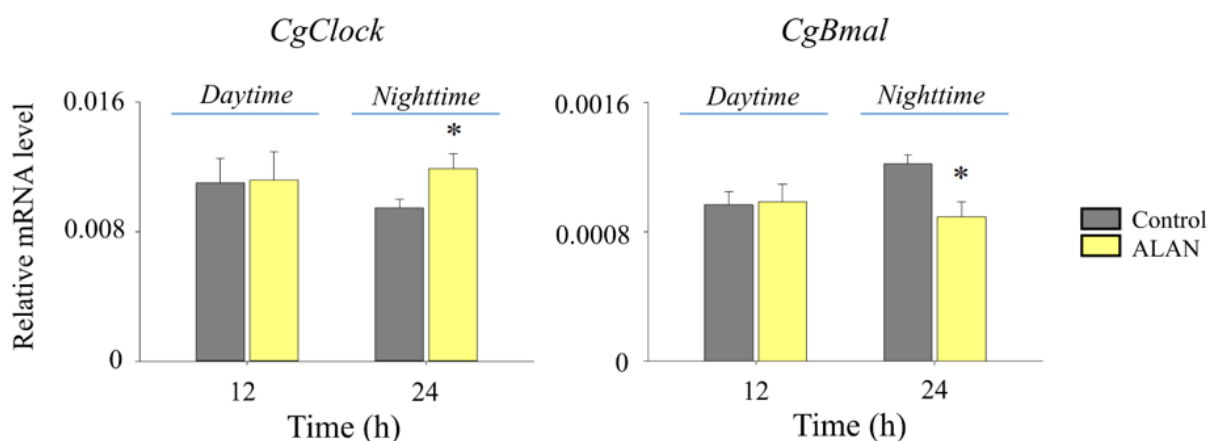


**Figure 1.** Effect of ALAN on oyster Valve Opening Duration (VOD). Mean daily VOD ( $n = 16$  oysters) during daytime (white bars), nighttime (grey bars) and ALAN (yellow bars) in the (A) control and (B) ALAN conditions. (C) Mean VOD during daytime and nighttime in the control and ALAN conditions. The mean hourly VOD data are shown as mean  $\pm$  SE ( $n = 28$  days). The behavioral daily pattern of oysters ( $n = 16$  oysters) in the (D) control and (E) ALAN conditions, with white backgrounds showing daytime, and yellow and black backgrounds indicating nighttime. Mean Valve Opening Duration (VOD) individual variability in the control and ALAN conditions ( $n = 16$  oysters) (F) and the (G) VOD IvI (individual variability index). Asterisks and different letters indicate significant differences between conditions ( $p < 0.05$ ).



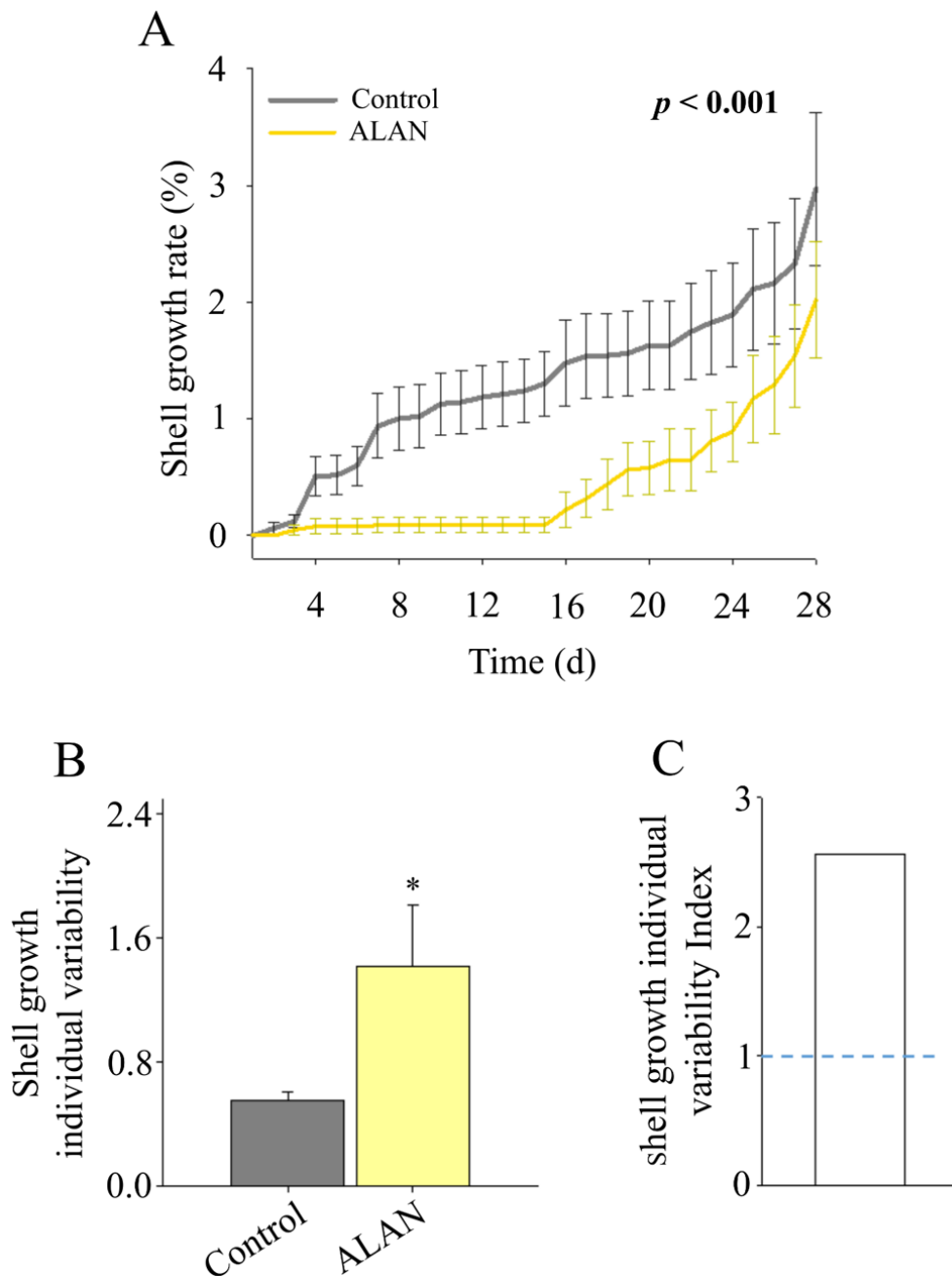
**Figure 2.** Effect of ALAN on chronobiological parameters of oysters' daily rhythm. Each day, for both conditions (black circle: control; yellow circle: ALAN), the strength (A), the amplitude (B), and the acrophase (C) of the rhythm, are expressed as mean  $\pm$  SE (n = 16 oysters). On the overall 28 days of experiment, the strength (D), the amplitude (E), and the acrophase (F) of the rhythm, are expressed as mean  $\pm$  SE (n = 28 days). For the first column of graphs (Fig. 2A-C), asterisks indicate significant differences between the two conditions on each day of the experiment. For the second column of graphs (Fig. 2D-F), asterisks indicate significant differences between the two conditions. Significant difference for a  $p$ -value = 0.05. Asterisks indicate significant differences between conditions ( $p < 0.05$ ).

The figure 3 shows the relative mRNA level of two core clock genes (*CgClock* and *CgBmal*) in the control and ALAN exposure condition during daytime (12 h) and nighttime (24 h). For both genes, results reveal no significant difference of expression between conditions at 12 h, while significant differences are observed at 24 h. During nighttime, the relative expression of *CgClock* is significantly higher when oysters are exposed to ALAN ( $p = 0.037$ ), while the expression of *CgBmal* is significantly lower ( $p = 0.009$ ).



**Figure 3.** Effect of ALAN on the difference in relative mRNA level (mean  $\pm$  SE,  $n = 8$ ) on oyster gills tissues sampled at 12 h and 24 h of two clock genes: (A) *Cgclock* and (B) *CgBmal*. Dark bars indicate the gene expression level of control oysters and yellow bars of oysters exposed to ALAN. Asterisks indicate significant differences between conditions ( $p < 0.05$ ).

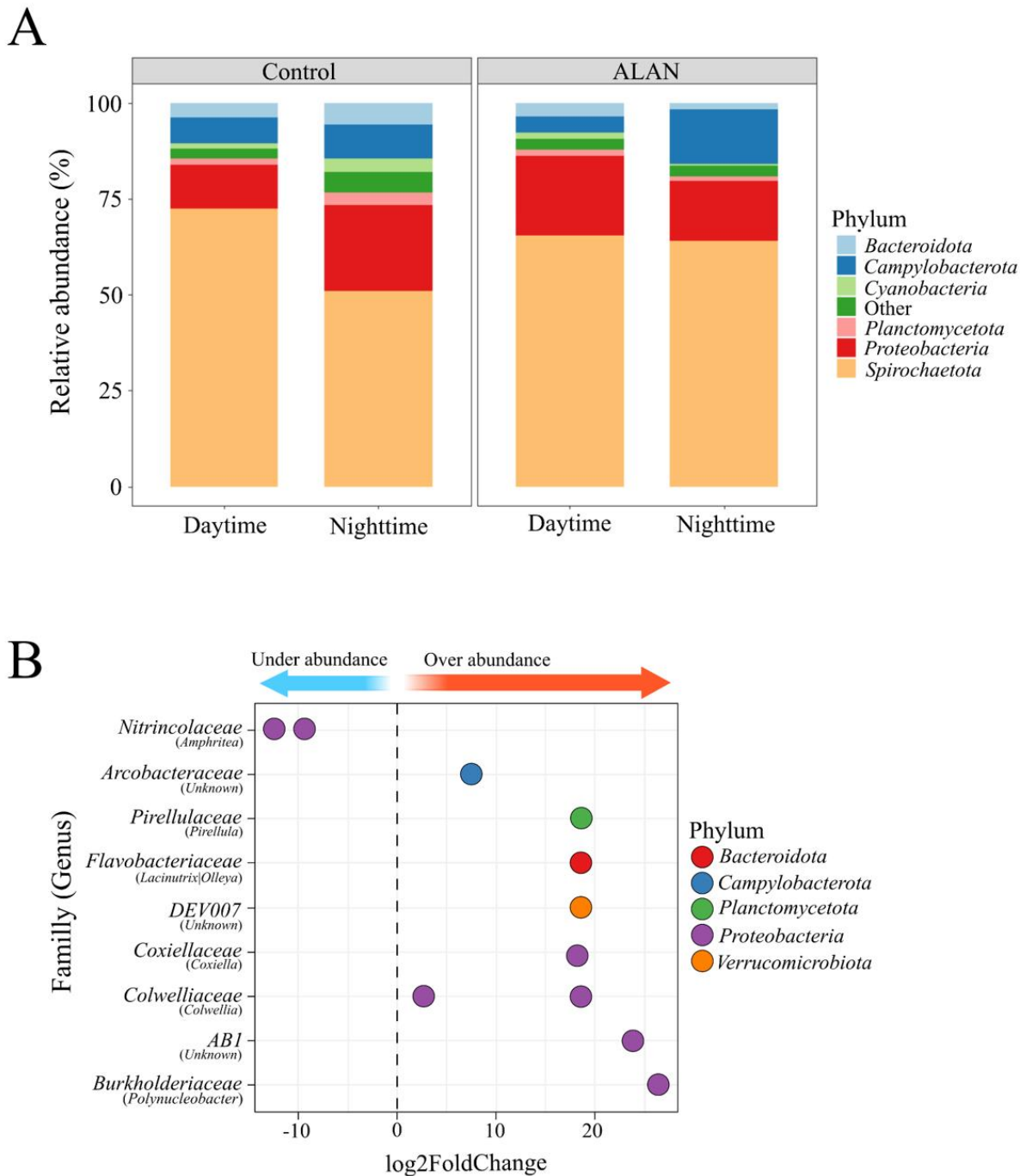
The figure 4A shows the daily growth rate of the shell of oysters during the 28 days of the experiment. Results reveal an overall significant decrease in the shell growth rate in oysters exposed to ALAN compared to the control condition ( $p < 0.001$ ,  $n = 15$  and 13 oysters for control and ALAN conditions respectively). The growth rate difference between the control and ALAN conditions is the most pronounced between days 3 and 15, period during which the shell growth rate in the ALAN condition is almost null, while the control oysters' shell growth rate increases continuously during the whole experiment. Then, after the 15<sup>th</sup> day of exposure, the shell growth rate of ALAN increases. Finally, at the end of exposure, there is a 32 % difference between the two shell growth rates in favor of control oysters. The figure 4B shows the individual variability of the oysters' shell growth rate. This individual variability increases significantly when oysters are exposed to ALAN ( $p = 0.032$ ; Fig. 4B), leading to an individual variability index superior to 1 (Fig. 4C).



**Figure 4.** Effects of ALAN on the oysters' shell growth rate. (A) Daily shell growth rate of control oysters (grey line) and oysters exposed to ALAN (yellow line). Data are expressed as mean  $\pm$  SE ( $n = 15$  and  $13$  oysters for control and ALAN conditions respectively). (B) Mean shell growth individual variability in the control and ALAN conditions ( $n = 15$  and  $13$  oysters for control and ALAN conditions respectively) and the (C) shell growth IvI (individual variability index). Asterisks indicate significant differences between conditions. Significant difference for a  $p$ -value =  $0.05$ .

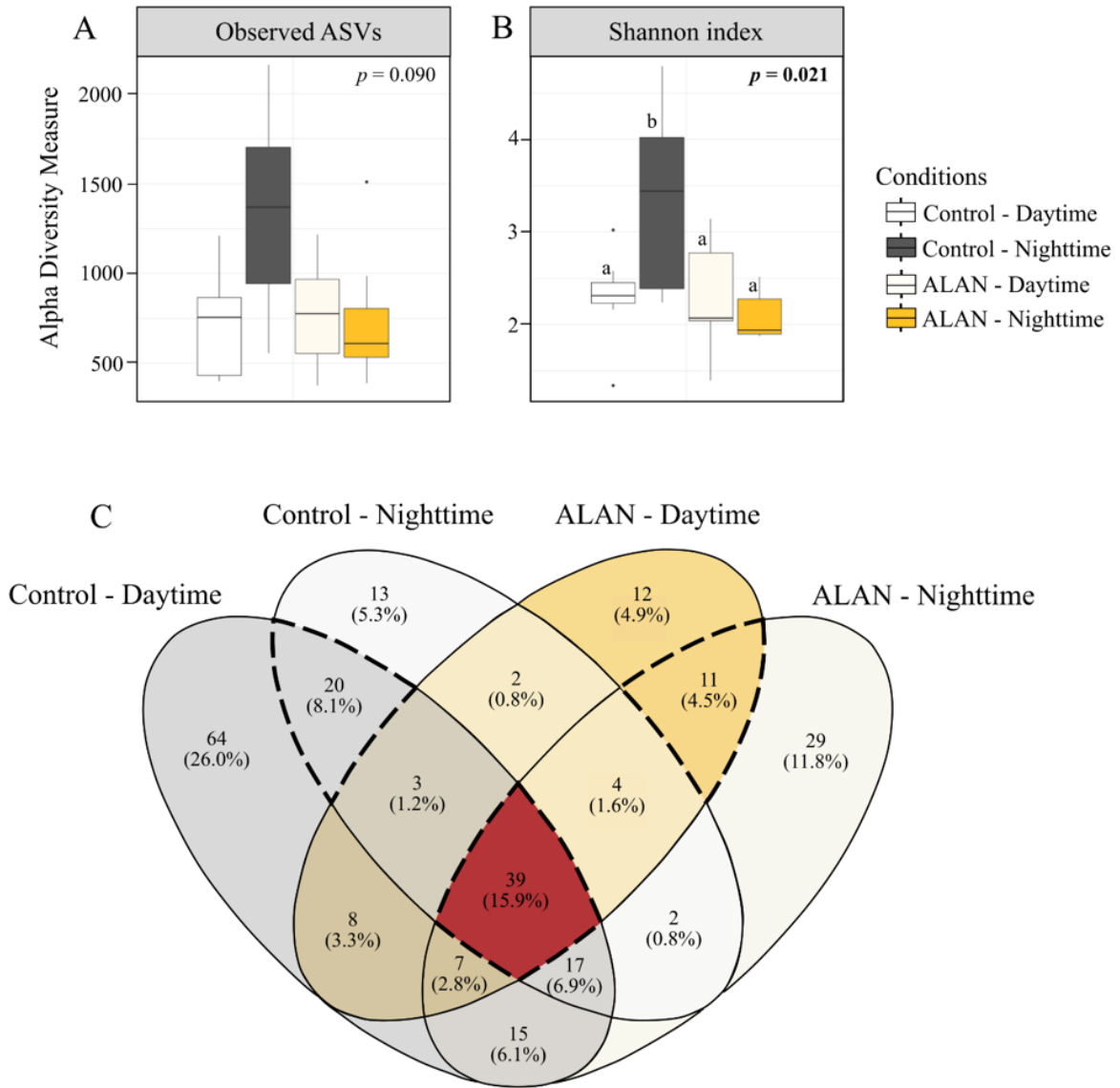
The figure 5A shows the bacterial community composition at the phylum level in the gills tissues of oysters during nighttime and daytime for each experimental conditions (control and ALAN). In control oysters, the bacterial community composition in gills shows changes between daytime and nighttime especially with a decrease of *Spirochaetota* from 72 % to 51

%, while in the ALAN condition, these relative abundances were similar (65 % and 64 %). On the contrary, the relative abundance of the *Proteobacteria* phylum increases in the control condition from daytime (11 %) to nighttime (23 %), while in the ALAN condition, it decreases (from 21 % to 16 %). The third most abundant phylum, the *Campylobacterota*, increases from daytime (6 %) to nighttime (8 %) in the control condition. This increase also occurs in the ALAN condition but in a more important matter (from 4 % to 14 %). Focusing on daytime, results reveal a slight decrease in *Spirochaetota* relative abundance from 72 % to 65 % in the presence of ALAN, as well as an increase of *Proteobacteria* relative abundance from 11 % to 21 % and a decrease of *Campylobacterota* relative abundance from 6 % to 4 %. On the other hand, during nighttime, the relative abundance of *Spirochaetota* increases from 51 % to 64 % in the presence of ALAN, while the relative abundance of *Proteobacteria* decreases from 23 % to 16 % and the *Campylobacterota* relative abundance increases from 8 % to 14 % (Fig. 5 and Supplementary Fig. 1). A differential abundance analysis of gills' microbiota between the control and ALAN conditions at the family level shows that 11 ASVs were significantly differentially abundant (Fig. 5B; Supplementary Data 5). In the ALAN condition, 9 ASVs belonging to 8 different families (*Arcobacteraceae*, *Pirellulaceae*, *Flavobacteriaceae*, *DEV007*, *Coxiellaceae*, *Colwelliaceae*, *ABI*, *Burkholderiaceae*) are over-abundant in gills, while 2 ASVs belonging to the *Nitrincolaceae* family are under abundant. The supplementary figure 2 shows the bacterial community composition of each oysters' gills and water samples and reveals an important diversity of bacterial community composition between samples at the phylum level, especially in gills. Furthermore, there is an important difference in taxonomic composition and phylum relative abundance between the two environments: oysters' gills were dominated by *Spirochaetota*, *Proteobacteria* and *Campylobacterota*, while water samples were dominated by *Proteobacteria*, *Bacteroidota* and *Planctomycetota*. (Supplementary Fig. 2, Supplementary Fig. 3). Finally, the supplementary figure 4 focuses on the relative abundance of the genus *Pseudoalteromonas*, revealing that it significantly decreases in the ALAN condition compared to the control condition during nighttime ( $p = 0.034$ ). ALAN does not significantly affect *Pseudoalteromonas* relative abundance during daytime (Supplementary Fig. 4).



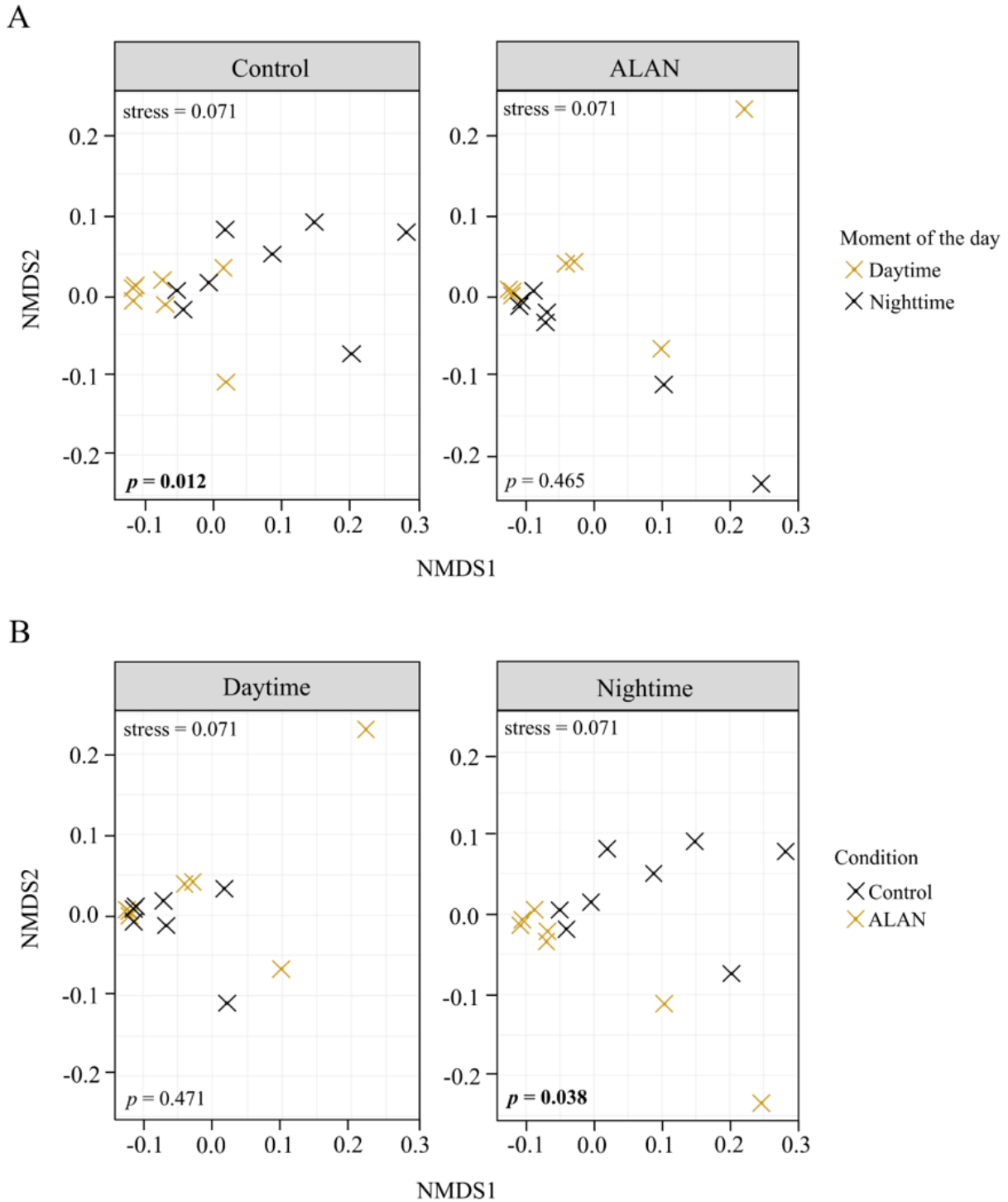
The figure 6 shows the comparison of the two alpha diversity indexes (number of ASVs and Shannon index) between the conditions for each moment of the day (control daytime, control nighttime, ALAN daytime, ALAN nighttime). Comparison of the alpha diversity index number of ASVs shows no significant difference ( $p = 0.090$ ; Fig. 6A; Supplementary Data 2) between the control condition during daytime ( $707.7 \pm 115.0$ ; mean  $\pm$  SE) and nighttime ( $1321.4 \pm 205.1$ ) and the ALAN exposure condition during daytime ( $772.6 \pm 124.7$ ) and nighttime ( $740.1 \pm 145.9$ ). Although, the comparison of the Shannon index value reveals a significantly higher alpha diversity in the control condition during nighttime ( $3.4 \pm 0.3$ ;  $p = 0.021$ ; Fig. 6B; Supplementary Data 2) compared to the control condition during daytime ( $2.3 \pm 0.2$ ), and the ALAN exposure condition during daytime ( $2.3 \pm 0.2$ ) and nighttime ( $2.1 \pm 0.1$ ). This result highlights a daytime / nighttime difference of alpha diversity in control oysters that disappears in ALAN condition. In the Supplementary figure 5 and Supplementary Data 2 is shown the alpha diversity indexes (number of ASVs and Shannon index) comparisons between the control and ALAN conditions that reveal for the Shannon index a diversity significantly lower ( $p = 0.023$ ) in the ALAN condition ( $2.2 \pm 0.5$ ; mean  $\pm$  SD) compared to the control condition ( $2.9 \pm 0.9$ ). On the contrary, no significant differences ( $p = 0.119$ ) are observed for the number of ASVs ( $1035.0 \pm 555.2$  for the control condition;  $756.4 \pm 345.4$  for the ALAN condition). The figure 6C shows a Venn diagram displaying the number of ASVs shared among the four conditions (control daytime, control nighttime, ALAN daytime, ALAN nighttime). It reveals that 39 ASVs belong to the core microbiota (ASVs shared by all conditions) of oysters gills, as well as 20 ASVs are specific to the control condition and 11 ASVs are specific to the ALAN condition. The taxonomic composition at the phylum, family, and genus levels of the core microbiota and the ASVs specific to the control and ALAN conditions are shown in the Supplementary Data 3.

To better understand relationships between bacterial communities, structure analyses were performed using beta diversity indexes. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA), illustrated by NMDS plots, show significant differences between daytime and nighttime in the control condition ( $p = 0.012$ ; Fig. 7A) and between control and ALAN during nighttime ( $p = 0.038$ ; Fig. 7B). No significant differences are found in the ALAN condition between daytime and nighttime ( $p = 0.465$ ; Fig. 7A) and during the daytime between the control and ALAN conditions ( $p = 0.471$ ; Fig. 7B). Results of PERMANOVA are detailed in the Supplementary Data 4.



**Figure 6.** Alpha diversity measures of (A) ASVs number (richness, number of observed ASVs) and (B) Shannon index (evenness of the ASVs abundance distribution), and (C) a Venn diagram between the moment of the day of each treatment in oysters with only ASVs > 0.1 % relative abundance of total reads were used. The Venn diagram especially reveals the core microbiota (39 ASVs), the microbiota specific to control oysters (20 ASVs) and to oysters exposed to ALAN (11 ASVs). Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ; Tab. S3).

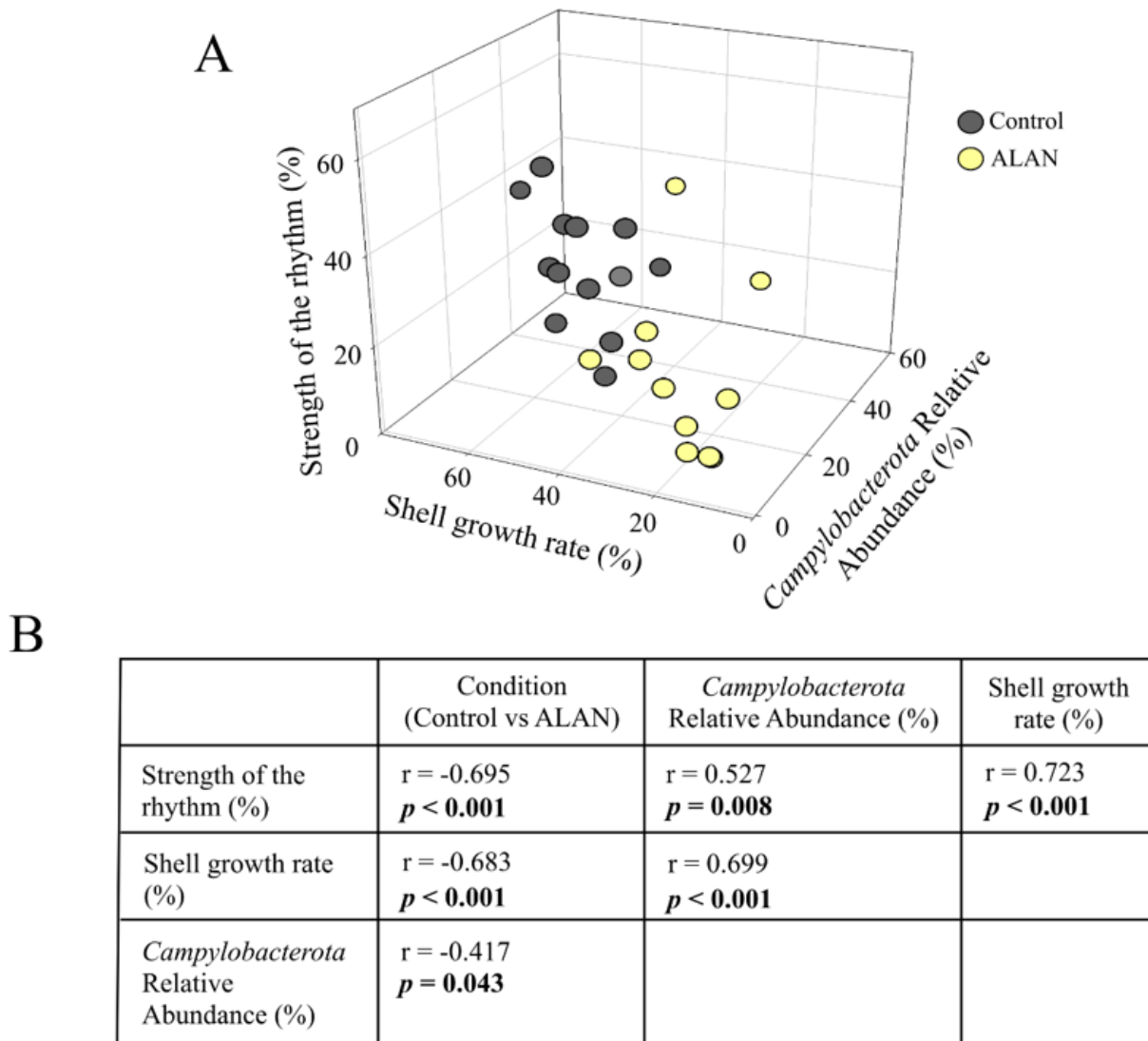




**Figure 7.** NMDS ordination plots using the weight UniFrac distance (stress = 0.071) in the control and ALAN conditions with color coding indicating the moment of the day (A) and for the daytime and nighttime with color coding indicating the treatment (B). *p*-values show the results of beta-diversity analyses and when in bold they indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) (Tab. S5).

The figure 8A is a 3D-scatter plot showing the distribution of individuals ( $n = 13$  and  $11$  individuals for control and ALAN conditions respectively) along three measured parameters:

the strength of the rhythm (i.e. the robustness of the rhythm), the shell growth rate, and the *Campylobacterota* phylum relative abundance in the gills microbiota. On this 3D-scatter plot, a clear separation appears between the oysters exposed to the control or ALAN conditions, according to the growth shell rate, the strength of the rhythm, and the *Campylobacterota* relative abundance (Fig. 8A). In addition, the figure 8B shows a table of the spearman correlation coefficients. This table shows first significant negative relationships between the conditions (control versus ALAN) and the three other parameters, showing that, in the same individual, ALAN negatively affects the growth shell rate, the robustness of the rhythm and the *Campylobacterota* relative abundance in gills microbiota. The spearman correlation coefficient also shows a significant positive relationship between the strength of the rhythm and the shell growth rate as well as between the strength of the rhythm and the *Campylobacterota* relative abundance, revealing that the decrease in the robustness of the oysters' behavioral daily rhythm is linked with the decrease in their shell growth and the *Campylobacterota* relative abundance.



**Figure 8.** (A) 3D scatter plot for the strength of the rhythm, the shell growth rate, and the *Campylobacterota* relative abundance in gills microbiota. Grey circles: control individuals; yellow circles: ALAN individuals. (B) Spearman correlation coefficient ( $r$ ) and levels of significance ( $p$ ) of the relationships between the strength of oysters' rhythm, their shell growth rate, the *Campylobacterota* relative abundance in gills microbiota, and the treatment (control or ALAN). Significant difference for a  $p$ -value = 0.05.

#### 4. Discussion

Our study reveals that a low level of ALAN (1 lx) affects clock genes' expression during nighttime, decreases the robustness of oysters' behavioral daily rhythm as well as their shell growth and disrupts the gills' bacterial community composition and diversity. Importantly, we showed at the individual level that the evolution of these three physiological functions are

significantly correlated when the oyster is exposed to ALAN. The more the rhythm robustness decreases, the more the gills microbiota dysbiosis is observed and the shell growth decreases.

First, our study shows that when oysters are exposed to a low ALAN intensity (1 lx), corresponding to a deep twilight light intensity, it significantly affects their diurnal valve activity, decreasing the daytime / nighttime difference of activity. Moreover, we show that ALAN even if it does not erase the behavioral daily rhythm, it significantly decreases its robustness, making it more weak and labile. Despite the fact that ALAN is an anthropogenic pressure essentially acting during nighttime, it can have a lag effect as it was already shown in multiple diurnal species. Several studies showed effects of ALAN observed during daytime (Sanders et al., 2021). For instance, ALAN at an intensity of 0.5 or 9 lx decreases the locomotor activity of the diurnal fish *Lepomis macrochirus* during daytime (Latchem et al., 2021). On the contrary, ALAN's effects can also appear only during the nighttime. For example, in the nocturnal crayfish *Pacifastacus leniusculus*, ALAN (12 lx) induces a decrease of activity during nighttime, unlike the increased nocturnal activity observed here in *C. gigas* (Thomas et al., 2016). Moreover, ALAN (70 lx) affects the daily behavioral pattern of the marine fish *Girella laevis* by increasing its activity (number of pass across refuge) during nighttime (Pulgar et al., 2019). Our results also show that ALAN induces a decrease in the individual variability of the valve activity, confirming that ALAN reduces the difference of oysters' activity over 24 h. On bivalves, studies about ALAN's impacts remain scarce. To our knowledge, except for our previous studies (Botté et al.; Botté et al., 2023a; Botté et al., 2023b), only a recent one has been done on ALAN effect on bivalves' behavior. Indeed, in this study, ALAN's effects have been studied on the valve behavior of the mussel *Mytilus edulis* at a higher intensity (19.86 lx) than in this study on *C. gigas*. Their results revealed that ALAN in white light induces a decrease of the open/close frequency valve events of the mussel (Christoforou et al., 2023). Unfortunately, no chronobiological analyses were performed on behavioral data, limiting further comparisons with our study and deeper analysis. In our work, chronobiological analyses show that ALAN exposure leads to a disruption of oysters' behavioral daily rhythm, characterized by a significant decrease in the rhythm's robustness and its amplitude. While previous studies demonstrated ALAN's effects on the oysters' daily rhythm over shorter exposure times (7 to 10 days), the present study reveals that they persist throughout at least 28 days of exposure (Botté et al.; Botté et al., 2023b; Botté et al., 2023a). Moreover, results reveal that the expression of two oysters' clock genes (*CgClock* and *CgBmal*) is disrupted in presence of ALAN during nighttime. Both genes are involved in the positive feedback core loop of the

circadian clock, and thus play a crucial role in the clock (Bell-Pedersen et al., 2005). This disruption of core clock genes expression could indicate a disruption of the clock functioning, which could then be the cause of the observed disruption of the oysters' rhythmic behavior, a hypothesis that has previously been stated in *C. gigas* (Botté et al., 2023a). The proper functioning of the clock molecular mechanism is essential to that of organisms since it is known to regulate the expression of genes involved in biological processes such as reproduction or immunity (Brzezinski et al., 2021; Curtis et al., 2014). Furthermore, the oysters' valve activity being closely related to crucial functions (respiration, feeding, growth, reproduction ...), its temporal organization along the days, months or years is fundamental for organisms' survival and fitness (García-March et al., 2007; Jou et al., 2013). Therefore, by disrupting oyster daily rhythm at the molecular and behavioral levels, ALAN may have harmful consequences on their physiology as it has been shown in the corals *Acropora millepora* and *Acropora digitifera*, for which ALAN is suspected to mask natural lunar cycles, inducing a delay in gametogenesis and a spawning desynchronization (Ayalon et al., 2021).

In this study, we have chosen to focus on a putative link between the impact of ALAN on daily rhythm robustness, through its disruption of the light signal that synchronizes the daily rhythm, and the consequences on two important physiological functions, which are the shell growth and the microbiota. Concerning the oysters' shell growth, results reveal that ALAN induces a significant decrease (-32 %) in this shell growth rate over the 28 days of exposure. Moreover, our experiment shows that the presence of ALAN exacerbates the individual variability of the oyster shell growth, which might suggest some diversity on individual physiological responses to ALAN. The shell growth in the control and ALAN conditions was measured during winter (17/02 – 16/03 2022), known to be a season where oysters have a very low shell growth compared to the spring, where they reach their maximum shell growth rate (Payton et al., 2017a). The acceleration of shell growth during the spring could potentialize the effect of ALAN and lead to an increase in the difference in growth. A future annual experiment covering the four seasons would help to better understand and quantify how ALAN affects oysters' shell growth. However, this kind of long-term experiment remains difficult to achieve correctly in the laboratory and deserves to be realized in the field in real conditions. Finally, we show that the shell growth rate is positively correlated with the robustness of the daily rhythm. These results bring a clue to the hypothesis that bivalves biomineralization follows an endogenous daily rhythm controlled by biological clocks (de Winter et al., 2023; Louis et al., 2022). Furthermore, by analogy, this finding could be compared to the role of the circadian rhythm in

humans, through the robustness of the sleep/wake cycle, acting in favor of the growth of children (Kim et al., 2015). The observed decrease in the shell growth rate could be a consequence of the disruption of oysters' behavioral daily rhythm, disrupting its feeding rhythm (Liu et al., 2021; Morton, 1971). In the nocturnal amphipod *Orchestroidea tuberculata*, ALAN also induces the disruption of daily activity rhythm and foraging behavior, resulting in decreased consumption and growth rate (Luarte et al., 2016). ALAN reducing growth rate has also been demonstrated in the freshwater gammaridae *Gammarus jazdzewskii* exposed to white LED at an intensity of 2 lx (Czarnecka et al., 2021). A 15 % reduction of the growth in the juvenile toads *Anaxyrus americanus* was also observed when exposed to white LED at an intensity of 16.9 lx (Dananay and Benard, 2018). On the contrary, ALAN is also able to accelerate growth such as for the larvae of the marine fish *Acanthurus triostegus* (O'Connor et al., 2019). Finally, the lag in oysters' shell growth caused by ALAN can affect their fitness. It could also be a commercial issue since oyster farms are subject to the surrounding ALAN and especially the habit of oyster farmers to light their oyster beds at night, mostly to avoid thefts. However, as suggested by this study, this custom could also be harmful to their production and therefore deeply impact a worldwide economic industry (FAO, 2016).

Another important physiological function can be affected by ALAN and the daily rhythm disruption: the oysters' microbiota. Indeed, its taxonomic composition is believed to be linked to its hosts' clock (Wang et al., 2022). Thus, we investigate the evolution of the oysters' microbiota composition when they are exposed to a low ALAN intensity. Here we choose to study the gills' microbiota of the oyster, knowing that this tissue is specifically involved in feeding and respiration, and that the gills filtration is directly dependent on the valve opening behavior and its daily rhythm (Payton et al., 2017a; Tran et al., 2004; Tran et al., 2011; Tran et al., 2015). We show that the presence of ALAN modifies the gills' microbiota structure, diversity and taxonomic composition. In our study, the most abundant phylum of bacteria in gills' microbiota is the *Spirochaetota* phylum, also belonging to the core microbiota (i.e. present in both conditions), which is a group of ASVs found across samples (Risely, 2020; Shade and Handelsman, 2012). This phylum has already been observed in *C. gigas* gills, where it was also over-represented (King et al., 2020). Our results show that oysters' gills core microbiota also includes the phyla *Proteobacteria* and *Campylobacterota*, which are respectively the second and third phyla the most represented in our gills tissues. The *Proteobacteria* phylum is known to be largely represented in *C. gigas* gills, while the *Campylobacterota* phylum has been observed in the gills of other bivalves, such as the deep-sea mussel *Gigantidas platifrons* and

the scallop *Argopecten purpuratus* (Gonzalez et al., 2022; King et al., 2020; Pathirana et al., 2019; Sun et al., 2022). Even if the functions of *C. gigas* gills' microbiota are not currently well-known, oysters' microbiota is believed to have a role in health. For example, it was shown that one step of the Pacific Oyster Mortality Syndrome (POMS) is the destabilization of microbiota, whose structure and taxonomic composition can predict oyster mortality (Clerissi et al., 2020; de Lorgeril et al., 2018; Paillard et al., 2022). Thus, ALAN by inducing changes in the gills' microbiota taxonomic composition of oysters, could affect their health. A first clue supporting this hypothesis ALAN's effects on the *Campylobacterota* phylum: one ASV belonging to the *Arcobacteraceae* family is significantly overabundant in the gills' microbiota of oysters exposed to ALAN. Previously, it has been suggested that species of the genus *Arcobacter*, also belonging to the *Arcobacteraceae* family, might be opportunistic pathogens when highly present in the mussel *Mytilus coruscus* gut microbiota (Li et al., 2018). Thus, ALAN might have created appropriate conditions for the development of pathogens in oysters' gills. Another important ALAN's impact on the taxonomic composition of gills' microbiota concerns the genus *Pseudoalteromonas*, which is subject to a significant decrease in its relative abundance during nighttime in the presence of ALAN. Moreover, this genus is revealed to be specific to the control condition but not the ALAN condition. This genus was already observed in bivalves, and especially in the hemolymph and the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* and *C. gigas* (Vezzulli et al., 2018). It was previously analyzed that 39 % of *Pseudoalteromonas* species produce antimicrobial metabolites and especially species associated with marine macroorganisms since this genus can help them in the defense against pathogens (Offret et al., 2016). Thus, the use of *Pseudoalteromonas* as a probiotic in aquaculture begins to be studied, such as in the European abalone *Haliotis tuberculata*, which suffers from mass mortality events caused by the bacterial pathogen *Vibrio harveyi*. A particular strain of *Pseudoalteromonas* can reduce the mortality rate of *V. harveyi*-challenged abalones and therefore is believed to have a protective effect against the *V. harveyi* infection (Offret et al., 2019). Furthermore, a strain of *Pseudoalteromonas* also showed a protective effect against pathogen-challenges in the larval rearing of the two bivalves *Pecten maximus* and *C. gigas* (Kesarcodi-Watson et al., 2012). Thus, given the potential protective effect of the genus *Pseudoalteromonas* in mollusks, the decrease of its relative abundance during ALAN nighttime condition shown in our study might induce harmful consequences in oysters. For instance, it could allow an easier contamination by pathogens such as the OsVH-1 in the POMS.

In addition to the disruption of these phyla, our results show that ALAN affects the microbial diversity of oysters' gills: the beta diversity observed in the control condition is abolished by

ALAN and this disruption of diversity appears to occur during nighttime. More precisely, the alpha diversity measurements (Shannon index) reveal that control oysters' gills microbiota diversity would follow a daily pattern with a lower diversity during daytime compared to nighttime. Daily rhythmicity of microbiota diversity has been observed in the worm *Macrostomum lignano* or the cnidarian *Nematostella vectensis* (Leach et al., 2019; Ma et al., 2023). This microbiota daily rhythmicity is believed to be linked to the host's clock (Leone et al., 2015; Liang and FitzGerald, 2017; Wang et al., 2022). In mice, the taxonomic composition of the gut or fecal microbiota follows diurnal oscillations, which are abolished by the absence of one core circadian clock gene (*Per1/2* or *Bmal1*) (Liang et al., 2015; Thaiss et al., 2014). Thus, the observed abolition of this Shannon index daily pattern and of the daytime / nighttime difference of beta diversity in presence of ALAN could be due to the disruption of the oysters' daily rhythm by ALAN. Our results agree with this hypothesis since they reveal a significant link between the dysbiosis of the oysters' gills' microbiota (taxonomic composition) and the disruption of the oyster daily rhythm by ALAN. One explanation can be that the disruption of the oysters' behavioral daily rhythm could modify the gills filtration of particles (food, bacteria), leading to a modification of the structure and composition of the gills microbiota in addition to a decrease in shell growth. Indeed, we found that the *Campylobacterota* relative abundance, the third phylum present in terms of abundance in the gills microbiota, is positively correlated to the strength of the daily rhythm robustness. This disruption of the microbiota daily rhythmicity can have harmful consequences since it is believed to be involved in the host's physiology and metabolism, especially in mammals (Leone et al., 2015; Liang and FitzGerald, 2017; Wang et al., 2022). More globally, a disrupted microbiota (dysbiosis) is a sign of a disrupted health. Microbiota dysbiosis has been identified as associated with the development of diseases, such as cancer, diabetes, brain disorders as well as respiratory, kidney and liver diseases (Hou et al., 2022; Nobs et al., 2019). This leads us to believe that the observed dysbiosis of the oyster gill's microbiota can have harmful consequences on their integrity, especially since this organ is used for nutrition and respiration. For instance, it has been showed in *C. gigas* that a low microbiota diversity could be a good indicator of declining health. Indeed, the death of oysters infected with a virulent *Vibrio* sp. strain and exposed to high temperature was preceded by a decrease of their hemolymph microbiota diversity and the proliferation of pathogens (Lokmer and Wegner, 2015). Another example concerns *Mytilus coruscus*, in which elevated temperatures cause a decrease of the microbiota diversity, which is suggested to be a contributing factor to the observed mussels' mortality (Li et al., 2018).



Here, we show that in addition to be correlated to the decrease of the daily rhythm robustness, the disruption of the *Campylobacterota* relative abundance by ALAN is also correlated to the shell growth rate. Thus, we show here a link between a dysbiosis and a physiological impairment.

## 5. Conclusion

To conclude, our results reveal that ALAN significantly disrupts the robustness of the behavioral daily rhythm as well as core clock genes expression, and at the same time, it leads to a decrease in growth rate and disrupts the gills microbiota. For the first time in marine invertebrates, we show a direct correlation between a loss of daily rhythm robustness and impairment of major physiological functions such as shell growth or microbiota. Therefore, our work highlights the importance of biological rhythms and the harmful physiological consequences and their disruption caused by ALAN, even at low intensity (1 lx). Finally, our findings allow to better understand ALAN's physiological consequences on a keystone species of coastal ecosystems and therefore highlight the importance of limiting ALAN in these environments. However, other studies, especially *in situ*, are needed to evaluate ALAN's consequences on other physiological parameters in oysters and more widely in coastal organisms that are still under-represented in the literature about ALAN's impacts.

**Ethics:** All experiments complied with the laws in effect in France and they conformed to international ethical standards.

**Data accessibility:** The behavioral data underlying this study are available on Supplementary data.

### **CRedit authorship contribution statement**

**Audrey Botté:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Visualization, Investigation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing. **Laura Payton:** Conceptualization, Methodology, Visualization, Investigation, Writing - Review & Editing. **Laure Bellec:** Conceptualization, Methodology, Visualization, Investigation, Writing - Review & Editing. **Damien Tran:** Conceptualization, Methodology, Visualization, Investigation, Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision

All authors contributed critically to the drafts, and gave final approval for publication.

### **Competing interests**

We have no competing interests.

### **Funding**

This work was supported by the financial support of the French Nation Research Agency (ANR), LUCIOLE project, PRC (2022-2026) and a Bordeaux University PhD scholarship for A. Botté.

### **Acknowledgments**

We kindly thank Yannick Geerebaert, Christian Portier, Thierry Garnier, and Christelle Teillet for their help during the setup and the proceeding of the experiments.

### **References**

- Amaral, F.G., Castrucci, A.M., Cipolla-Neto, J., Poletini, M.O., Mendez, N., Richter, H.G., Sellix, M.T., 2014. Environmental control of biological rhythms: effects on development, fertility and metabolism. *J Neuroendocrinol* 26(9), 603-612. 10.1111/jne.12144
- Andrade, H., Massabuau, J.-C., Cochrane, S., Ciret, P., Tran, D., Sow, M., Camus, L., 2016. High Frequency Non-invasive (HFNI) Bio-Sensors As a Potential Tool for Marine Monitoring and Assessments. *Front. Mar. Sci.* 3. 10.3389/fmars.2016.00187
- Auguste, M., Lasa, A., Balbi, T., Pallavicini, A., Vezzulli, L., Canesi, L., 2020. Impact of nanoplastics on hemolymph immune parameters and microbiota composition in *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Environ Res* 159, 105017. 10.1016/j.marenvres.2020.105017
- Ayalon, I., Rosenberg, Y., Benichou, J.I.C., Campos, C.L.D., Sayco, S.L.G., Nada, M.A.L., Baquiran, J.I.P., Ligson, C.A., Avisar, D., Conaco, C., Kuechly, H.U., Kyba, C.C.M., Cabaitan, P.C., Levy, O., 2021. Coral Gametogenesis Collapse under Artificial Light Pollution. *Curr. Biol.* 31(2), 413-419 e413. 10.1016/j.cub.2020.10.039
- Bell-Pedersen, D., Cassone, V.M., Earnest, D.J., Golden, S.S., Hardin, P.E., Thomas, T.L., Zoran, M.J., 2005. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat. Rev. Genet.* 6(7), 544-556. 10.1038/nrg1633
- Bingham, C., Arbogast, B., Guillaume, G.C., Lee, J.K., Halberg, F., 1982. Inferential statistical methods for estimating and comparing cosinor parameters. *Chronobiologia* 9, 397-439.

- Botté, A., Payton, L., Tran, D., 2023. Artificial light at night at environmental intensities disrupts daily rhythm of the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Pollut. Bull.* 191. 10.1016/j.marpolbul.2023.114850
- Botté, A., Payton, L., Tran, D., Unpublished results. The effects of Artificial Light at Night on behavioral rhythm and related gene expression are wavelength dependent in the oyster *Crassostrea gigas*.
- Botté, A., Payton, L., Lefeuvre, E., Tran, D., 2023. Is part-night lighting a suitable mitigation strategy to limit ALAN's effects on the biological rhythm at the behavioral and molecular scales of the oyster *Crassostrea gigas*? *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167052>
- Brayley, O., How, D.M., Wakefield, D.A., 2022. Biological Effects of Light Pollution on Terrestrial and Marine Organisms. *Int. J. Sustain. Light.* 24(1), 13-38. 10.26607/ijsl.v24i1.121
- Brzezinski, A., Rai, S., Purohit, A., Pandi-Perumal, S.R., 2021. Melatonin, Clock Genes, and Mammalian Reproduction: What Is the Link? *Int J Mol Sci* 22(24). 10.3390/ijms222413240
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13(7), 581-583. 10.1038/nmeth.3869
- Christoforou, E., Dominoni, D., Lindström, J., Diamantopoulou, C., Czyzewski, J., Mirzai, N., Spatharis, S., 2023. The effects of artificial light at night (ALAN) on the gaping activity and feeding of mussels. 10.1101/2023.03.10.532051
- Clerissi, C., de Lorgeril, J., Petton, B., Lucasson, A., Escoubas, J.M., Gueguen, Y., Degremont, L., Mitta, G., Toulza, E., 2020. Microbiota Composition and Evenness Predict Survival Rate of Oysters Confronted to Pacific Oyster Mortality Syndrome. *Front Microbiol* 11, 311. 10.3389/fmicb.2020.00311
- Curtis, A.M., Bellet, M.M., Sassone-Corsi, P., O'Neill, L.A., 2014. Circadian clock proteins and immunity. *Immunity* 40(2), 178-186. 10.1016/j.immuni.2014.02.002
- Czarnecka, M., Kobak, J., Grubisic, M., Kakareko, T., 2021. Disruptive effect of artificial light at night on leaf litter consumption, growth and activity of freshwater shredders. *Sci. Total Environ.* 786, 147407. 10.1016/j.scitotenv.2021.147407
- Dananay, K.L., Benard, M.F., 2018. Artificial light at night decreases metamorphic duration and juvenile growth in a widespread amphibian. *Proc. Biol. Sci.* 285(1882). 10.1098/rspb.2018.0367

- Davies, T.W., Smyth, T., 2018. Why artificial light at night should be a focus for global change research in the 21st century. *Glob. Chang. Biol.* 24(3), 872-882. 10.1111/gcb.13927
- de Lorgeril, J., Lucasson, A., Petton, B., Toulza, E., Montagnani, C., Clerissi, C., Vidal-Dupiol, J., Chaparro, C., Galinier, R., Escoubas, J.M., Haffner, P., Degremont, L., Charriere, G.M., Lafont, M., Delort, A., Vergnes, A., Chiarello, M., Faury, N., Rubio, T., Leroy, M.A., Perignon, A., Regler, D., Morga, B., Alunno-Bruscia, M., Boudry, P., Le Roux, F., Destoumieux-Garzomicronn, D., Gueguen, Y., Mitta, G., 2018. Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. *Nat Commun* 9(1), 4215. 10.1038/s41467-018-06659-3
- de Winter, N.J., Killam, D., Fröhlich, L., de Nooijer, L., Boer, W., Schöne, B.R., Thébault, J., Reichart, G.-J., 2023. Ultradian rhythms in shell composition of photosymbiotic and non-photosymbiotic mollusks. *Biogeosciences* 20(14), 3027-3052. 10.5194/bg-20-3027-2023
- Fadrosh, D.W., Ma, B., Gajer, P., Sengamalay, N., Ott, S., Brotman, R.M., Ravel, J., 2014. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome* 2(1), 6. 10.1186/2049-2618-2-6
- Falchi, F., Cinzano, P., Duriscoe, D., Kyba, C.C., Elvidge, C.D., Baugh, K., Portnov, B.A., Rybnikova, N.A., Furgoni, R., 2016. The new world atlas of artificial night sky brightness. *Sci Adv* 2(6), e1600377. 10.1126/sciadv.1600377
- FAO. 2016. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Cultured Aquatic Species Information Programme *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793).
- García-March, J.R., Sanchís Solsona, M.Á., García-Carrascosa, A.M., 2007. Shell gaping behaviour of *Pinna nobilis* L., 1758: circadian and circalunar rhythms revealed by in situ monitoring. *Marine Biology* 153(4), 689-698. 10.1007/s00227-007-0842-6
- Gaston, K.J., Bennie, J., 2014. Demographic effects of artificial nighttime lighting on animal populations. *Environ. Rev.* 22(4), 323-330. 10.1139/er-2014-0005
- Gaston, K.J., Davies, T.W., Nedelec, S.L., Holt, L.A., 2017. Impacts of Artificial Light at Night on Biological Timings. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 48(1), 49-68. 10.1146/annurev-ecolsys-110316-022745
- Golombek, D.A., Rosenstein, R.E., 2010. Physiology of circadian entrainment. *Physiol. Rev.* 90(3), 1063-1102. 10.1152/physrev.00009.2009
- Gonzalez, R., Henriquez-Castillo, C., Lohrmann, K.B., Romero, M.S., Ramajo, L., Schmitt, P., Brokordt, K., 2022. The Gill Microbiota of *Argopecten purpuratus* Scallop Is Dominated by Symbiotic *Campylobacterota* and Upwelling Intensification Differentially Affects Their Abundance. *Microorganisms* 10(12). 10.3390/microorganisms10122330

- Gouthière, L., Mauvieux, B., 2003. Etapes essentielles dans l'analyse des rythmes: qualité des données expérimentales, recherche de périodes par analyses spectrales de principes divers, modélisation. XXXVème Congrès Société Francoph Chronobiol, Université de Saint-Etienne.
- Helm, B., Visser, M.E., Schwartz, W., Kronfeld-Schor, N., Gerkema, M., Piersma, T., Bloch, G., 2017. Two sides of a coin: ecological and chronobiological perspectives of timing in the wild. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B., Biol. Sci.* 372(1734). 10.1098/rstb.2016.0246
- Hou, K., Wu, Z.X., Chen, X.Y., Wang, J.Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J.B., Wei, L., Li, J., Chen, Z.S., 2022. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther* 7(1), 135. 10.1038/s41392-022-00974-4
- Jørgensen, C.B., 1990. Bivalve Filter Feeding: Hydrodynamics, Bioenergetics, Physiology and Ecology. Olsen & Olsen.
- Jou, L.-J., Lin, S.-C., Chen, B.-C., Chen, W.-Y., Liao, C.-M., 2013. Synthesis and measurement of valve activities by an improved online clam-based behavioral monitoring system. *Computers and Electronics in Agriculture* 90, 106-118. 10.1016/j.compag.2012.09.008
- Kesarcodi-Watson, A., Miner, P., Nicolas, J.-L., Robert, R., 2012. Protective effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*). *Aquaculture* 344-349, 29-34. 10.1016/j.aquaculture.2012.02.029
- Kim, T.W., Jeong, J.H., Hong, S.C., 2015. The impact of sleep and circadian disturbance on hormones and metabolism. *Int J Endocrinol* 2015, 591729. 10.1155/2015/591729
- King, W.L., Siboni, N., Kahlke, T., Dove, M., O'Connor, W., Mahbub, K.R., Jenkins, C., Seymour, J.R., Labbate, M., 2020. Regional and oyster microenvironmental scale heterogeneity in the Pacific oyster bacterial community. *FEMS Microbiol Ecol* 96(5). 10.1093/femsec/fiaa054
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glockner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 41(1), e1. 10.1093/nar/gks808
- Kummu, M., de Moel, H., Salvucci, G., Viviroli, D., Ward, P.J., Varis, O., 2016. Over the hills and further away from coast: global geospatial patterns of human and environment over the 20th–21st centuries. *Environ. Res. Lett.* 11(3). 10.1088/1748-9326/11/3/034010

- Kyba, C.C.M., Kuester, T., Sanchez de Miguel, A., Baugh, K., Jechow, A., Holker, F., Bennie, J., Elvidge, C.D., Gaston, K.J., Guanter, L., 2017. Artificially lit surface of Earth at night increasing in radiance and extent. *Sci. Adv.* 3(11), e1701528. 10.1126/sciadv.1701528
- Latchem, E., Madliger, C.L., Abrams, A.E.I., Cooke, S.J., 2021. Does Artificial Light at Night Alter the Subsequent Diurnal Behavior of a Teleost Fish? *Wat. Air and Soil Poll.* 232(2). 10.1007/s11270-021-05023-4
- Leach, W.B., Carrier, T.J., Reitzel, A.M., 2019. Diel patterning in the bacterial community associated with the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Ecol Evol* 9(17), 9935-9947. 10.1002/ece3.5534
- Leone, V., Gibbons, S.M., Martinez, K., Hutchison, A.L., Huang, E.Y., Cham, C.M., Pierre, J.F., Heneghan, A.F., Nadimpalli, A., Hubert, N., Zale, E., Wang, Y., Huang, Y., Theriault, B., Dinner, A.R., Musch, M.W., Kudsk, K.A., Prendergast, B.J., Gilbert, J.A., Chang, E.B., 2015. Effects of diurnal variation of gut microbes and high-fat feeding on host circadian clock function and metabolism. *Cell Host Microbe* 17(5), 681-689. 10.1016/j.chom.2015.03.006
- Li, Y.F., Yang, N., Liang, X., Yoshida, A., Osatomi, K., Power, D., Batista, F.M., Yang, J.L., 2018. Elevated Seawater Temperatures Decrease Microbial Diversity in the Gut of *Mytilus coruscus*. *Front Physiol* 9, 839. 10.3389/fphys.2018.00839
- Liang, X., Bushman, F.D., FitzGerald, G.A., 2015. Rhythmicity of the intestinal microbiota is regulated by gender and the host circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(33), 10479-10484. 10.1073/pnas.1501305112
- Liang, X., FitzGerald, G.A., 2017. Timing the Microbes: The Circadian Rhythm of the Gut Microbiome. *J Biol Rhythms* 32(6), 505-515. 10.1177/0748730417729066
- Liu, Y., Yao, H., Zhou, T., Lin, Z., Dong, Y., 2021. The Discovery of Circadian Rhythm of Feeding Time on Digestive Enzymes Activity and Their Gene Expression in *Sinonovacula constricta* Within a Light/Dark Cycle. *Frontiers in Marine Science* 8. 10.3389/fmars.2021.744212
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4), 402-408. 10.1006/meth.2001.1262
- Lokmer, A., Wegner, M.K., 2015. Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *ISME J* 9(3), 670-682. 10.1038/ismej.2014.160

- Louis, V., Besseau, L., Lartaud, F., 2022. Step in Time: Biomineralisation of Bivalve's Shell. *Frontiers in Marine Science* 9. 10.3389/fmars.2022.906085
- Luarte, T., Bonta, C.C., Silva-Rodriguez, E.A., Quijon, P.A., Miranda, C., Farias, A.A., Duarte, C., 2016. Light pollution reduces activity, food consumption and growth rates in a sandy beach invertebrate. *Environ. Pollut.* 218, 1147-1153. 10.1016/j.envpol.2016.08.068
- Ma, Y., He, J., Sieber, M., von Frieling, J., Bruchhaus, I., Baines, J.F., Bickmeyer, U., Roeder, T., 2023. The microbiome of the marine flatworm *Macrostomum lignano* provides fitness advantages and exhibits circadian rhythmicity. *Commun Biol* 6(1), 289. 10.1038/s42003-023-04671-y
- Martinez-Bakker, M., Helm, B., 2015. The influence of biological rhythms on host-parasite interactions. *Trends Ecol Evol* 30(6), 314-326. 10.1016/j.tree.2015.03.012
- Martinez Arbizu, P., 2017. pairwiseAdonis: Pairwise multilevel comparison using adonis. R Package Version 00 1.
- Mat, A.M., Massabuau, J.C., Ciret, P., Tran, D., 2012. Evidence for a plastic dual circadian rhythm in the oyster *Crassostrea gigas*. *Chronobiol. Int.* 29(7), 857-867. 10.3109/07420528.2012.699126
- McFall-Ngai, M., Hadfield, M.G., Bosch, T.C., Carey, H.V., Domazet-Lošo, T., Douglas, A.E., Dubilier, N., Eberl, G., Fukami, T., Gilbert, S.F., Hentschel, U., King, N., Kjelleberg, S., Knoll, A.H., Kremer, N., Mazmanian, S.K., Metcalf, J.L., Nealson, K., Pierce, N.E., Rawls, J.F., Reid, A., Ruby, E.G., Rumpho, M., Sanders, J.G., Tautz, D., Wernegreen, J.J., 2013. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(9), 3229-3236. 10.1073/pnas.1218525110
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8(4), e61217. 10.1371/journal.pone.0061217
- Miossec, L., Le Deuff, R.-m., Gouletquer, P., 2009. Alien Species Alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster).
- Morton, B., 1971. The diurnal rhythm and tidal rhythm of feeding and digestion in *Ostrea edulis*. *Biological Journal of the Linnean Society* 3(4), 329-342. 10.1111/j.1095-8312.1971.tb00526.x
- Nobs, S.P., Tuganbaev, T., Elinav, E., 2019. Microbiome diurnal rhythmicity and its impact on host physiology and disease risk. *EMBO Rep* 20(4). 10.15252/embr.201847129

- O'Connor, J.J., Fobert, E.K., Besson, M., Jacob, H., Lecchini, D., 2019. Live fast, die young: Behavioural and physiological impacts of light pollution on a marine fish during larval recruitment. *Mar Pollut Bull* 146, 908-914. 10.1016/j.marpolbul.2019.05.038
- Offret, C., Desriac, F., Le Chevalier, P., Mounier, J., Jegou, C., Fleury, Y., 2016. Spotlight on Antimicrobial Metabolites from the Marine Bacteria *Pseudoalteromonas*: Chemodiversity and Ecological Significance. *Mar Drugs* 14(7). 10.3390/md14070129
- Offret, C., Rochard, V., Laguerre, H., Mounier, J., Huchette, S., Brillet, B., Le Chevalier, P., Fleury, Y., 2019. Protective Efficacy of a *Pseudoalteromonas* Strain in European Abalone, *Haliotis tuberculata*, Infected with *Vibrio harveyi* ORM4. *Probiotics Antimicrob Proteins* 11(1), 239-247. 10.1007/s12602-018-9389-8
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., Simpson, G., Solymos, P., Stevens, M., Wagner, H., 2008. The vegan package: community ecology package, version 1.13-1. URL [Httpvegan R-Forge R-Proj Org](http://vegan.R-Forge.R-Project.org) 1, 1-190.
- Paillard, C., Gueguen, Y., Wegner, K.M., Bass, D., Pallavicini, A., Vezzulli, L., Arzul, I., 2022. Recent advances in bivalve-microbiota interactions for disease prevention in aquaculture. *Curr Opin Biotechnol* 73, 225-232. 10.1016/j.copbio.2021.07.026
- Partch, C.L., Green, C.B., Takahashi, J.S., 2014. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell. Biol.* 24(2), 90-99. 10.1016/j.tcb.2013.07.002
- Pathirana, E., McPherson, A., Whittington, R., Hick, P., 2019. The role of tissue type, sampling and nucleic acid purification methodology on the inferred composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) microbiome. *J Appl Microbiol* 127(2), 429-444. 10.1111/jam.14326
- Payton, L., Sow, M., Massabuau, J.C., Ciret, P., Tran, D., 2017a. How annual course of photoperiod shapes seasonal behavior of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *PLoS One* 12(10), e0185918. 10.1371/journal.pone.0185918
- Payton, L., Perrigault, M., Hoede, C., Massabuau, J.C., Sow, M., Huvet, A., Boullot, F., Fabioux, C., Hegaret, H., Tran, D., 2017b. Remodeling of the cycling transcriptome of the oyster *Crassostrea gigas* by the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Sci. Rep.* 7(1), 3480. 10.1038/s41598-017-03797-4
- Perrigault, M., Tran, D., 2017. Identification of the Molecular Clockwork of the Oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One* 12(1), e0169790. 10.1371/journal.pone.0169790
- Pulgar, J., Zeballos, D., Vargas, J., Aldana, M., Manriquez, P.H., Manriquez, K., Quijon, P.A., Widdicombe, S., Anguita, C., Quintanilla, D., Duarte, C., 2019. Endogenous cycles, activity patterns and energy expenditure of an intertidal fish is modified by artificial light pollution at night (ALAN). *Environ. Pollut.* 244, 361-366. 10.1016/j.envpol.2018.10.063

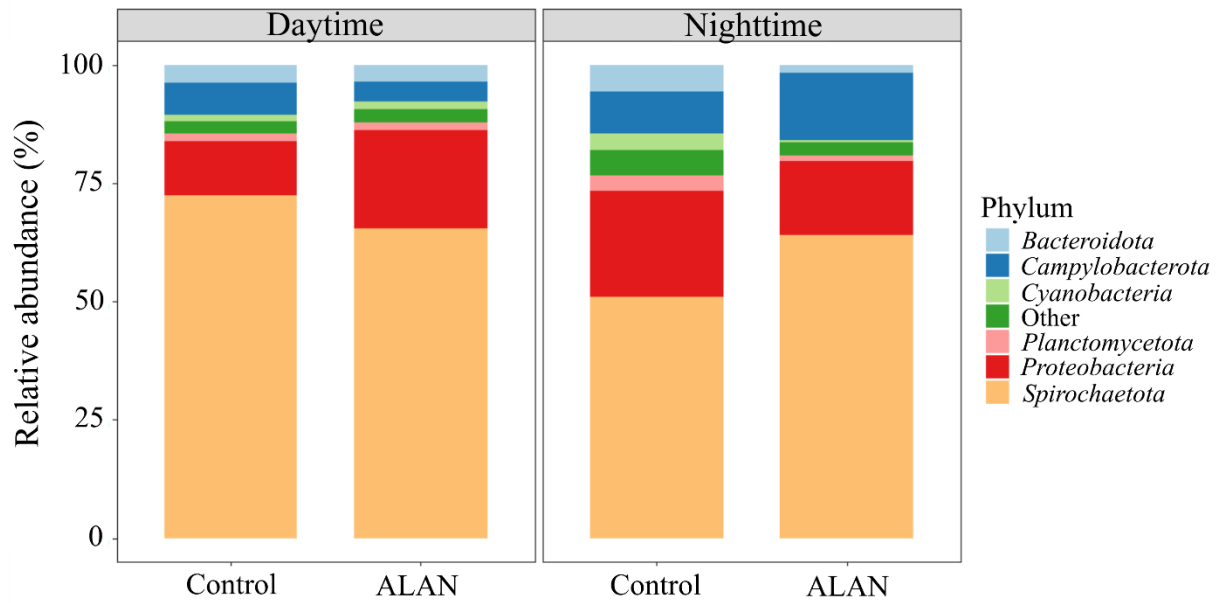


- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glockner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41(Database issue), D590-596. 10.1093/nar/gks1219
- Risely, A., 2020. Applying the core microbiome to understand host-microbe systems. *J Anim Ecol* 89(7), 1549-1558. 10.1111/1365-2656.13229
- Sanders, D., Gaston, K.J., 2018. How ecological communities respond to artificial light at night. *J. Exp. Zool. A. Ecol. Integr. Physiol.* 329(8-9), 394-400. 10.1002/jez.2157
- Sanders, D., Frago, E., Kehoe, R., Patterson, C., Gaston, K.J., 2021. A meta-analysis of biological impacts of artificial light at night. *Nat. Ecol. Evol.* 5(1), 74-81. 10.1038/s41559-020-01322-x
- Scargle, J.D., 1982. Studies in astronomical time series analysis. II - Statistical aspects of spectral analysis of unevenly spaced data. *Astrophys. J.* 263. 10.1086/160554
- Shade, A., Handelsman, J., 2012. Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environ Microbiol* 14(1), 4-12. 10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x
- Smyth, T.J., Wright, A.E., McKee, D., Tidau, S., Tamir, R., Dubinsky, Z., Iluz, D., Davies, T.W., 2021. A global atlas of artificial light at night under the sea. *Elementa: Science of the Anthropocene.* 9(1). 10.1525/elementa.2021.00049
- Sun, Y., Wang, M., Zhong, Z., Chen, H., Wang, H., Zhou, L., Cao, L., Fu, L., Zhang, H., Lian, C., Sun, S., Li, C., 2022. Adaption to hydrogen sulfide-rich environments: Strategies for active detoxification in deep-sea symbiotic mussels, *Gigantidas platifrons*. *Sci Total Environ* 804, 150054. 10.1016/j.scitotenv.2021.150054
- Svechkina, A., Portnov, B.A., Trop, T., 2020. The impact of artificial light at night on human and ecosystem health: a systematic literature review. *Landsc. Ecol.* 35(8), 1725-1742. 10.1007/s10980-020-01053-1
- Thaiss, C.A., Zeevi, D., Levy, M., Zilberman-Schapira, G., Suez, J., Tengeler, A.C., Abramson, L., Katz, M.N., Korem, T., Zmora, N., Kuperman, Y., Biton, I., Gilad, S., Harmelin, A., Shapiro, H., Halpern, Z., Segal, E., Elinav, E., 2014. Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell* 159(3), 514-529. 10.1016/j.cell.2014.09.048
- Thomas, J.R., James, J., Newman, R.C., Riley, W.D., Griffiths, S.W., Cable, J., 2016. The impact of streetlights on an aquatic invasive species: Artificial light at night alters signal crayfish behaviour. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 176, 143-149. 10.1016/j.applanim.2015.11.020

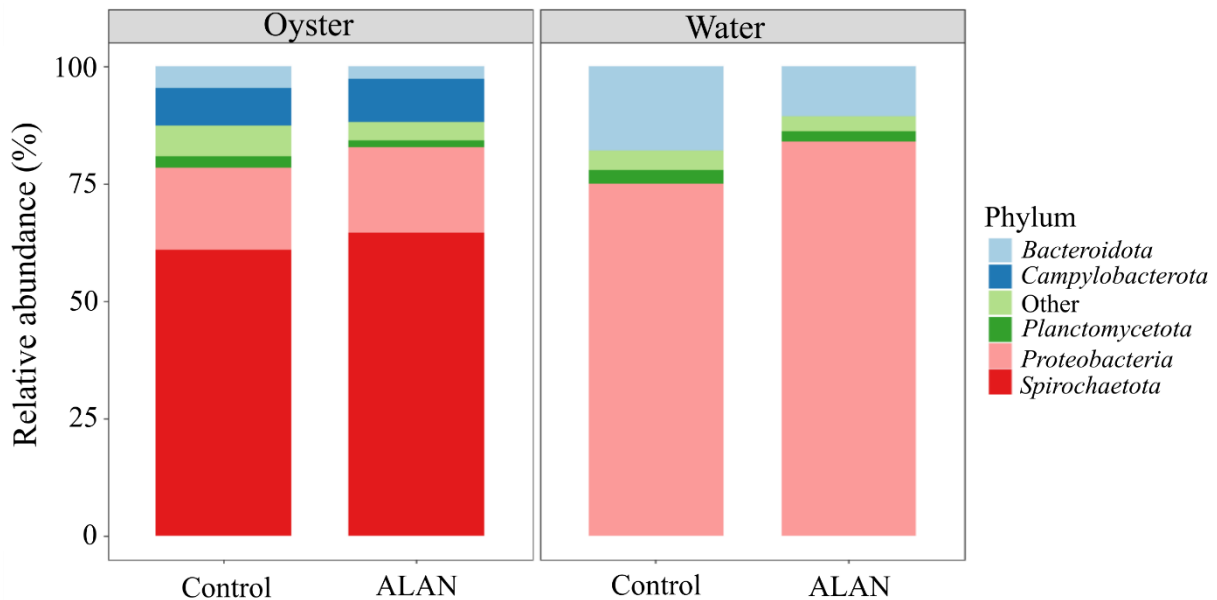
- Tran, D., Massabuau, J.C., Garnier-Laplacet, J., 2004. Effect of carbon dioxide on uranium bioaccumulation in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(3), 739-747. 10.1897/03-75
- Tran, D., Nadau, A., Durrieu, G., Ciret, P., Parisot, J.P., Massabuau, J.C., 2011. Field chronobiology of a molluscan bivalve: how the moon and sun cycles interact to drive oyster activity rhythms. *Chronobiol. Int.* 28(4), 307-317. 10.3109/07420528.2011.565897
- Tran, D., Ciutat, A., Mat, A., Massabuau, J.C., Hegaret, H., Lambert, C., Le Goic, N., Soudant, P., 2015. The toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* disrupts daily rhythmic activities at gene transcription, physiological and behavioral levels in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 158, 41-49. 10.1016/j.aquatox.2014.10.023
- Tran, D., Perrigault, M., Ciret, P., Payton, L., 2020a. Bivalve mollusc circadian clock genes can run at tidal frequency. *Proc. Biol. Sci.* 287(1918), 20192440. 10.1098/rspb.2019.2440
- Tran, D., Andrade, H., Durier, G., Ciret, P., Leopold, P., Sow, M., Ballantine, C., Camus, L., Berge, J., Perrigault, M., 2020b. Growth and behaviour of blue mussels, a re-emerging polar resident, follow a strong annual rhythm shaped by the extreme high Arctic light regime. *R. Soc. Open Sci.* 7(10), 200889. 10.1098/rsos.200889
- Vezzulli, L., Stagnaro, L., Grande, C., Tassistro, G., Canesi, L., Pruzzo, C., 2018. Comparative 16SrDNA Gene-Based Microbiota Profiles of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) and the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from a Shellfish Farm (Ligurian Sea, Italy). *Microb Ecol* 75(2), 495-504. 10.1007/s00248-017-1051-6
- Voigt, R.M., Summa, K.C., Forsyth, C.B., Green, S.J., Engen, P., Naqib, A., Vitaterna, M.H., Turek, F.W., Keshavarzian, A., 2016. The Circadian Clock Mutation Promotes Intestinal Dysbiosis. *Alcohol Clin Exp Res* 40(2), 335-347. 10.1111/acer.12943
- Wang, H., Zhang, H., Su, Y., 2022. New Insights into the Diurnal Rhythmicity of Gut Microbiota and Its Crosstalk with Host Circadian Rhythm. *Animals (Basel)* 12(13). 10.3390/ani12131677
- Wegner, K.M., Volkenborn, N., Peter, H., Eiler, A., 2013. Disturbance induced decoupling between host genetics and composition of the associated microbiome. *BMC Microbiol* 13, 252. 10.1186/1471-2180-13-252
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., Zhang, B., 2012. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant. Mol. Biol.* 10.1007/s11103-012-9885-2

### 3. Annexes

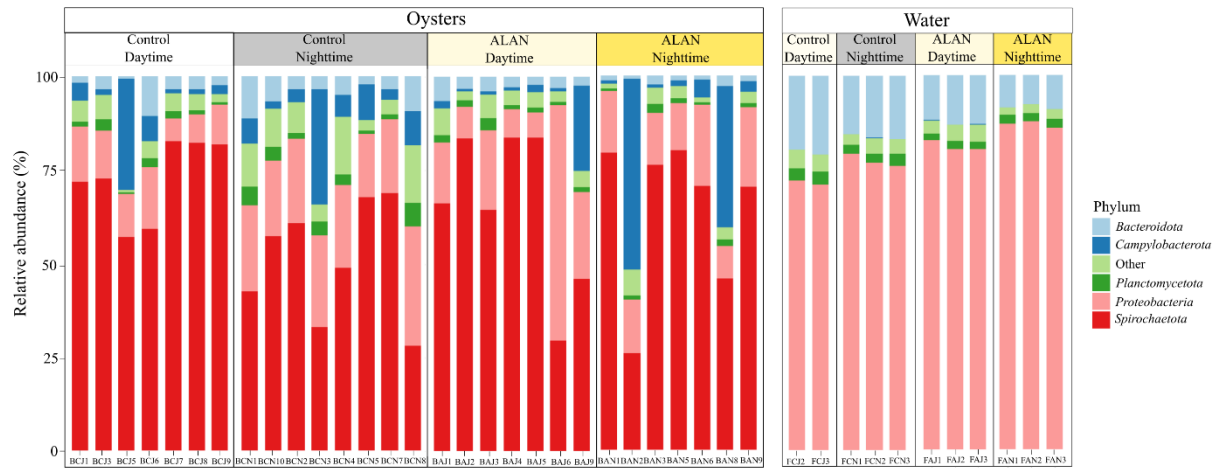
**Supplementary material:** Botté, A., Bellec, L., Payton, L., Tran, D.. Link between the robustness of diurnal behavior and disruption of the gills microbiota and the shell growth of the oyster *Crassostrea gigas* exposed to artificial light at night. (Soumis au journal *Sci. Total Environ.*)



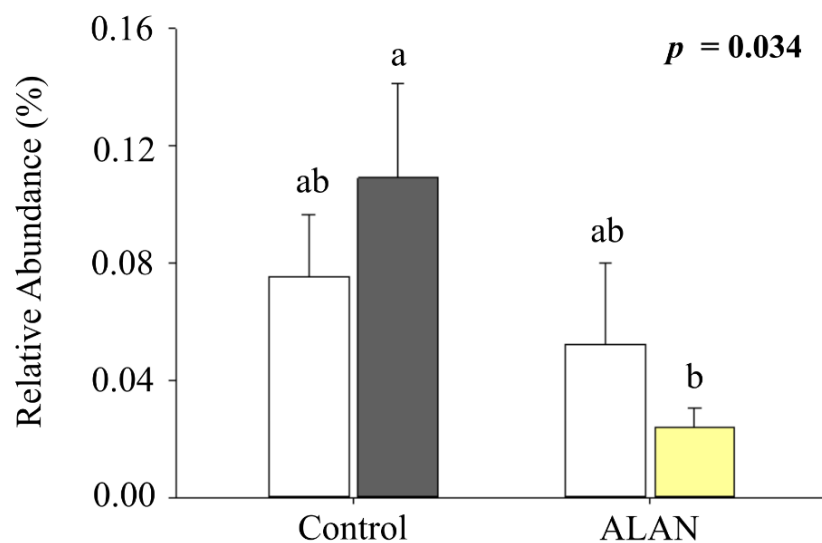
**Supplementary figure 1.** Bacterial community composition in gills tissues of oysters during daytime and nighttime in the control and ALAN conditions at the phylum level. Relative abundance is represented as the percentage of the total effective bacterial sequences per treatment. Only phyla representing more than 1% of overall abundance are detailed.



**Supplementary figure 2.** Bacterial community composition in gills tissues of oysters and in water samples in the control and ALAN condition at the phylum level. Relative abundance is represented as the percentage of the total effective bacterial sequences per treatment. Only phyla representing more than 1% of overall abundance are detailed.



**Supplementary figure 3.** Bacterial community composition at the phylum level in gills tissues of control oysters sampled during daytime (BCJ) and nighttime (BCN) and gills tissues of oysters exposed to ALAN sampled during daytime (BAJ) and nighttime (BAN). Relative abundance is represented as the percentage of the total effective bacterial sequences per sample. Only phyla representing more than 1% of overall abundance are detailed.



**Supplementary figure 4.** Relative abundance of the genus *Pseudoalteromonas* in the oysters' gills microbiota during daytime and nighttime in the control and ALAN conditions.

**Supplementary Data S1.** Results of chronobiological analysis for the control and ALAN condition at the individual level (n = 16 oysters / condition). The table indicates for each day of the experiment and for the control and ALAN condition: the mesor, the strength of the rhythm, the rhythm's amplitude and acrophase of oysters having a daily rhythm (p-value = 0.05). No significant rhythms are indicated by “n.s.”.

Day	Oysters	Control			ALAN		
		Strength of the rhythm (%)	Amplitude (%)	Acrophase (h)	Strength of the rhythm (%)	Amplitude (%)	Acrophase (h)
1	1	17.0	13.7	2.4	7.5	16.1	13.7
	2	41.3	31.3	16.8	29.6	22.7	10.1
	3	83.4	62.0	13.9	36.4	36.8	12.4
	4	32.4	28.0	11.3	53.6	43.3	12.9
	5	52.3	42.9	13.3	50.4	45.3	14.7
	6	32.7	32.7	12.9	32.7	23.8	19.5
	7	66.0	48.0	12.9	47.2	40.1	12.2
	8	86.0	55.4	14.4	49.7	45.3	14.6
	9	17.7	8.7	10.0	85.1	58.4	14.7
	10	7.3	13.2	21.5	27.6	21.1	11.7
	11	35.9	28.4	10.4	34.4	38.1	9.5
	12	60.0	44.8	11.1	78.6	54.5	15.4
	13	71.2	52.9	14.1	18.5	24.6	9.1
	14	14.8	14.4	4.9	9.4	17.1	13.9
	15	68.1	50.8	12.7	25.7	28.2	21.9
	16	63.6	37.9	13.2	40.9	34.9	15.3
2	1	62.6	47.6	11.6	57.8	45.0	16.6
	2	53.1	41.2	15.9	55.0	42.7	13.5
	3	n.s.	n.s.	n.s.	39.3	42.3	13.6
	4	49.2	38.3	11.2	43.5	42.2	15.3
	5	36.0	28.5	10.4	81.6	58.0	16.1
	6	75.7	52.2	13.6	n.s.	n.s.	n.s.
	7	54.5	44.5	11.5	30.4	35.1	9.7
	8	58.9	41.7	14.3	64.1	52.8	12.7
	9	62.8	46.0	12.9	72.8	55.3	17.6
	10	76.0	54.1	13.1	64.3	49.9	5.6
	11	46.0	33.7	11.3	44.1	43.3	18.3
	12	56.5	47.0	13.0	67.0	45.7	15.2
	13	66.2	52.3	13.4	56.2	44.2	14.2
	14	33.4	39.0	8.2	64.1	49.5	13.0
	15	60.2	50.0	13.5	0.1	1.7	6.5
	16	56.3	38.5	13.7	31.4	23.6	16.4

**Supplementary Data S1. Continued.**

3	1	27.6	24.1	11.0	19.5	21.7	14.8
	2	62.3	49.1	17.1	34.9	26.2	10.5
	3	78.0	58.0	15.0	7.3	16.6	9.1
	4	68.8	50.1	12.4	40.5	36.8	13.1
	5	79.8	56.4	13.0	n.s.	n.s.	n.s.
	6	20.4	22.2	12.3	40.5	40.7	17.7
	7	69.3	52.7	13.7	61.0	45.0	11.3
	8	57.3	35.8	13.1	1.4	7.1	14.0
	9	17.8	14.7	11.6	41.7	32.1	18.4
	10	67.0	53.7	14.9	8.7	7.8	2.0
	11	52.3	39.6	11.3	24.3	28.7	11.0
	12	49.5	40.0	8.5	n.s.	n.s.	n.s.
	13	63.8	51.5	13.7	45.0	35.1	10.9
	14	5.6	12.3	6.5	50.0	44.3	16.9
	15	24.0	17.2	3.8	19.7	20.8	5.5
	16	51.9	28.3	15.7	45.1	35.9	9.0
4	1	66.6	52.2	17.2	29.9	27.6	15.5
	2	56.1	39.7	15.3	20.0	17.4	9.5
	3	48.3	37.0	12.6	31.2	36.0	12.5
	4	47.7	38.1	12.3	29.7	21.5	10.6
	5	46.5	41.2	12.4	51.1	43.3	16.8
	6	69.0	48.8	13.7	21.5	30.3	10.3
	7	58.7	46.2	11.6	17.3	21.2	8.4
	8	57.7	38.2	14.0	5.2	13.5	12.3
	9	44.7	33.7	13.1	n.s.	n.s.	n.s.
	10	41.3	32.6	15.7	75.8	56.5	7.5
	11	59.5	44.9	11.9	19.9	16.9	10.6
	12	62.6	47.8	12.0	48.2	37.7	11.2
	13	84.4	60.2	15.2	59.0	43.6	12.9
	14	71.4	53.6	11.9	7.5	8.2	19.8
	15	41.6	30.9	12.9	21.9	14.9	10.4
	16	49.2	34.8	16.3	31.7	33.1	14.0
5	1	66.6	52.2	17.2	41.4	41.8	17.1
	2	56.1	39.7	15.3	54.3	41.8	11.5
	3	48.3	37.0	12.7	13.6	23.5	10.9
	4	47.7	38.1	12.3	47.2	43.3	14.6
	5	46.5	41.2	12.4	8.7	3.0	2.0
	6	69.0	48.8	13.7	n.s.	n.s.	n.s.
	7	58.3	46.0	11.7	72.0	54.9	15.1
	8	57.7	38.2	14.0	52.6	41.5	11.7
	9	44.7	33.7	13.3	87.3	63.1	15.0
	10	41.3	32.6	15.8	54.6	44.5	10.2
	11	59.5	44.9	11.9	84.7	62.5	16.8
	12	62.6	47.8	12.0	74.2	55.5	15.1
	13	84.4	60.2	15.2	58.7	46.8	13.8
	14	71.4	53.6	11.9	39.1	38.4	12.7
	15	41.6	30.9	12.9	69.7	55.9	17.7
	16	49.2	34.8	16.5	36.8	36.3	24.2

**Supplementary Data S1. Continued.**

6	1	16.6	5.4	2.4	24.3	28.7	17.9
	2	n.s.	n.s.	n.s.	47.3	35.2	10.9
	3	52.6	41.1	1.1	82.1	60.0	11.4
	4	56.6	43.7	13.4	18.4	14.1	10.2
	5	28.9	21.8	10.0	69.1	53.0	17.3
	6	78.8	54.6	13.4	63.9	52.9	16.7
	7	56.4	40.9	11.2	39.5	30.9	10.3
	8	10.2	5.1	18.1	38.4	38.2	14.0
	9	29.3	24.9	10.4	76.2	56.6	14.9
	10	76.9	57.1	19.8	21.7	0.2	11.7
	11	31.7	26.2	11.9	22.2	31.5	9.3
	12	47.1	37.6	11.1	n.s.	n.s.	n.s.
	13	74.8	59.4	14.9	60.6	45.4	13.1
	14	23.3	17.5	9.7	39.6	36.9	12.1
	15	66.7	50.4	12.6	15.1	17.0	9.9
	16	49.5	29.9	13.5	27.3	22.4	13.5
7	1	22.9	31.7	17.3	21.7	26.7	15.0
	2	60.6	51.2	15.7	35.0	27.7	10.3
	3	44.7	34.4	12.8	44.1	43.5	9.0
	4	63.2	47.8	12.7	53.6	40.4	11.9
	5	58.2	47.9	13.9	10.2	20.3	13.2
	6	81.9	58.6	13.7	29.9	22.2	15.4
	7	57.5	43.2	11.7	77.3	54.0	12.4
	8	84.4	58.7	15.7	42.2	33.1	11.5
	9	81.5	58.7	13.7	75.4	55.4	13.4
	10	58.0	41.5	13.0	33.3	24.1	10.6
	11	48.3	35.6	11.8	16.5	25.8	18.7
	12	53.2	41.4	11.9	68.1	51.5	15.1
	13	77.3	58.4	14.1	59.3	44.2	12.2
	14	20.8	24.9	12.1	51.5	39.2	11.3
	15	74.4	55.9	17.1	46.0	42.3	15.2
	16	57.7	38.2	15.3	53.6	42.0	13.7
8	1	21.1	21.8	13.6	64.6	52.4	14.5
	2	n.s.	n.s.	n.s.	72.4	51.2	12.7
	3	74.8	57.4	13.7	44.7	42.8	10.4
	4	62.2	47.9	12.5	53.0	42.6	13.3
	5	52.5	43.2	13.8	57.8	49.0	16.7
	6	39.8	30.5	10.8	n.s.	n.s.	n.s.
	7	63.3	49.1	11.8	74.9	54.1	12.1
	8	61.9	44.1	12.2	60.8	45.5	12.9
	9	66.6	48.9	14.2	80.7	59.1	14.7
	10	71.7	53.3	14.2	52.8	41.1	10.8
	11	40.7	31.8	12.7	27.1	22.3	12.1
	12	61.8	47.6	12.3	72.1	53.7	12.1
	13	80.4	57.6	13.4	84.4	63.5	14.7
	14	60.3	47.1	11.7	71.5	55.0	12.3
	15	28.6	32.4	9.9	36.2	28.4	12.9
	16	61.4	44.2	14.9	60.4	51.8	17.4



**Supplementary Data S1. Continued.**

9	1	56.4	44.0	12.3	52.1	48.5	14.2
	2	60.0	52.8	15.5	77.6	55.2	12.4
	3	n.s.	n.s.	n.s.	79.9	58.9	10.1
	4	68.8	52.9	12.5	60.9	48.8	14.5
	5	41.1	38.5	12.5	58.5	44.2	14.2
	6	80.0	59.9	14.1	61.3	52.6	19.2
	7	76.1	56.0	13.5	83.2	58.7	13.6
	8	63.8	48.9	14.5	72.5	55.2	12.3
	9	66.6	49.7	13.5	61.9	46.8	12.9
	10	74.9	53.2	15.3	56.4	45.9	15.1
	11	72.7	58.4	16.3	81.8	57.8	17.5
	12	67.7	52.4	12.8	36.4	38.6	13.9
	13	75.8	57.3	13.0	75.7	57.5	13.1
	14	57.4	45.2	11.7	77.1	58.8	12.9
	15	41.3	31.9	15.2	65.1	54.0	17.7
	16	37.7	31.4	17.3	24.8	33.4	15.9
10	1	52.9	39.7	12.5	36.0	38.1	13.5
	2	70.7	54.3	14.5	55.5	42.4	11.7
	3	71.0	54.3	14.4	12.7	21.8	7.5
	4	78.1	55.7	12.4	34.9	35.9	13.7
	5	85.4	62.4	13.7	28.3	35.0	15.1
	6	78.4	56.5	13.9	14.6	23.3	14.7
	7	72.2	53.4	12.4	11.2	18.9	11.0
	8	68.9	47.6	13.8	64.5	50.7	11.5
	9	65.0	48.9	13.1	36.3	30.0	11.4
	10	77.6	58.6	14.3	15.4	20.1	8.9
	11	56.4	42.8	12.9	16.8	26.6	13.8
	12	73.0	52.3	13.3	21.6	16.3	10.2
	13	75.4	57.2	12.9	45.0	34.9	10.7
	14	56.5	42.8	10.9	36.2	39.7	14.7
	15	68.8	52.8	14.7	28.0	28.5	10.8
	16	68.9	49.8	16.9	15.2	21.9	10.6
11	1	80.0	58.5	14.2	14.4	20.7	17.1
	2	65.1	50.1	15.0	49.5	39.4	10.9
	3	76.0	56.5	15.1	23.4	30.8	23.2
	4	66.2	49.1	11.5	32.6	32.5	11.8
	5	84.1	62.2	13.4	7.2	15.6	17.9
	6	79.2	54.1	13.2	n.s.	n.s.	n.s.
	7	78.1	55.3	13.3	50.2	43.1	11.9
	8	83.1	57.3	14.4	9.1	19.3	12.2
	9	67.3	45.4	13.1	27.8	21.6	19.3
	10	80.4	57.3	14.0	24.6	19.0	9.6
	11	69.1	50.0	13.9	30.1	33.6	12.9
	12	39.1	40.4	12.4	33.1	24.2	10.5
	13	52.1	46.1	16.4	44.0	29.9	12.5
	14	65.0	51.3	11.0	0.4	3.2	24.6
	15	64.9	48.7	13.5	36.4	28.3	12.2
	16	67.4	43.4	15.6	35.8	29.5	13.4

**Supplementary Data S1. Continued.**

12	1	15.1	11.4	3.8	35.9	35.9	18.8
	2	n.s.	n.s.	n.s.	45.7	37.3	10.9
	3	43.7	38.9	16.5	n.s.	n.s.	n.s.
	4	69.1	47.1	12.4	53.4	43.6	13.0
	5	50.9	45.4	11.3	41.3	40.7	22.3
	6	79.5	55.0	13.3	60.1	50.8	17.2
	7	71.0	53.2	10.9	31.4	36.7	12.4
	8	51.8	32.6	15.3	63.0	49.9	11.6
	9	47.4	31.6	12.2	n.s.	n.s.	n.s.
	10	30.4	23.0	11.4	36.1	27.7	10.1
	11	59.0	46.9	13.2	15.1	24.5	13.1
	12	71.3	52.1	12.9	43.3	32.6	11.1
	13	21.2	29.1	10.3	n.s.	n.s.	n.s.
	14	11.7	17.0	8.7	56.0	46.6	12.9
	15	n.s.	n.s.	n.s.	49.5	44.6	17.4
	16	47.3	30.5	16.6	40.2	39.7	17.9
13	1	71.2	53.6	13.0	40.3	30.6	19.9
	2	63.6	47.3	14.4	60.3	45.6	11.8
	3	n.s.	n.s.	n.s.	63.9	53.3	10.6
	4	59.5	43.9	12.5	53.4	39.0	12.4
	5	38.8	33.6	10.9	13.9	24.6	16.8
	6	26.4	20.1	10.1	26.1	20.2	3.6
	7	67.3	53.4	12.7	20.3	28.2	10.6
	8	15.1	6.9	18.3	25.2	32.2	10.9
	9	45.1	34.2	12.1	73.7	56.2	15.9
	10	21.2	18.0	10.6	22.9	17.7	9.3
	11	19.4	16.7	9.4	0.4	3.6	10.7
	12	54.4	42.4	11.3	n.s.	n.s.	n.s.
	13	70.9	52.9	14.2	71.0	53.7	13.6
	14	35.1	28.0	9.8	48.0	39.5	13.1
	15	81.5	60.3	14.1	45.2	42.2	16.5
	16	48.1	29.5	16.6	36.1	29.1	12.9
14	1	n.s.	n.s.	n.s.	59.6	41.6	21.1
	2	n.s.	n.s.	n.s.	23.6	18.0	10.3
	3	63.3	47.7	13.7	53.3	40.1	10.3
	4	60.8	44.8	12.4	32.9	34.2	13.8
	5	32.6	26.8	11.8	40.1	42.3	19.1
	6	74.8	53.7	13.5	n.s.	n.s.	n.s.
	7	63.0	49.0	12.7	23.6	16.7	9.1
	8	74.2	49.5	17.3	32.3	26.5	9.8
	9	30.3	20.1	11.0	n.s.	n.s.	n.s.
	10	68.3	49.9	14.3	51.3	37.9	11.3
	11	74.9	54.4	12.4	16.6	20.7	14.0
	12	51.4	39.6	11.3	78.7	59.0	15.0
	13	74.1	54.0	14.3	n.s.	n.s.	n.s.
	14	49.3	38.5	9.2	n.s.	n.s.	n.s.
	15	n.s.	n.s.	n.s.	18.1	15.8	12.8
	16	49.7	31.2	16.6	69.6	55.5	14.9

**Supplementary Data S1. Continued.**

15	1	64.9	48.7	11.7	26.4	20.2	19.1
	2	n.s.	n.s.	n.s.	29.7	24.8	9.9
	3	n.s.	n.s.	n.s.	67.5	55.5	12.4
	4	13.7	18.0	11.8	27.5	23.5	11.4
	5	83.0	59.6	13.1	8.9	18.5	19.9
	6	75.5	54.9	13.1	52.0	47.0	17.5
	7	35.9	36.8	13.5	34.6	25.2	9.6
	8	59.7	43.0	13.3	42.8	32.0	10.1
	9	16.3	11.6	7.4	87.1	60.1	14.3
	10	81.5	57.9	16.1	49.5	36.1	11.1
	11	26.4	20.4	13.1	n.s.	n.s.	n.s.
	12	61.2	48.3	13.0	n.s.	n.s.	n.s.
	13	n.s.	n.s.	n.s.	63.9	46.5	11.8
	14	33.6	27.2	9.8	61.6	48.7	12.7
	15	61.3	51.3	15.4	63.5	50.4	20.1
	16	25.4	18.0	15.2	20.2	17.5	7.0
16	1	30.8	23.5	10.7	60.4	46.7	18.0
	2	61.3	49.7	16.3	30.1	25.6	9.9
	3	63.6	50.4	13.5	46.8	42.5	11.0
	4	72.4	51.9	12.7	26.6	20.7	10.8
	5	34.5	32.3	12.1	8.2	18.1	19.3
	6	26.4	20.7	9.9	n.s.	n.s.	n.s.
	7	34.7	28.1	10.3	4.8	14.7	14.2
	8	n.s.	n.s.	n.s.	73.2	54.1	12.1
	9	69.2	45.7	13.5	70.1	51.0	16.5
	10	49.7	40.1	15.4	42.6	32.2	10.7
	11	83.1	59.6	16.2	83.0	62.6	14.7
	12	52.7	39.5	11.5	66.4	52.3	12.8
	13	81.2	59.9	14.1	58.2	45.5	15.5
	14	30.1	22.3	9.4	n.s.	n.s.	n.s.
	15	n.s.	n.s.	n.s.	15.8	24.9	11.8
	16	48.3	29.6	15.3	32.2	26.3	6.7
17	1	73.6	57.4	14.6	27.7	22.5	19.1
	2	59.5	46.3	13.1	41.1	31.6	10.2
	3	74.9	54.7	14.6	23.4	18.9	9.0
	4	25.1	25.0	11.3	64.6	47.4	13.1
	5	39.0	32.9	11.1	7.4	14.1	15.5
	6	26.4	21.6	9.9	59.6	49.7	18.5
	7	61.5	44.1	12.3	49.8	43.9	11.7
	8	85.2	56.8	13.6	51.7	40.2	10.7
	9	58.3	38.4	13.8	28.1	21.2	19.4
	10	48.0	36.5	13.0	32.9	25.9	10.1
	11	50.1	40.3	11.9	19.6	14.7	9.3
	12	48.4	38.7	11.7	n.s.	n.s.	n.s.
	13	79.2	56.4	13.5	n.s.	n.s.	n.s.
	14	39.4	29.9	9.9	30.8	35.4	11.9
	15	80.7	60.3	14.6	23.0	15.6	16.7
	16	43.4	22.8	16.6	50.1	40.9	13.2

**Supplementary Data S1. Continued.**

18	1	64.9	52.4	11.5	28.5	31.4	15.0
	2	26.4	19.3	11.7	40.9	32.3	10.3
	3	45.9	36.6	12.6	55.9	41.9	9.2
	4	41.0	32.1	10.3	53.2	41.4	13.0
	5	32.0	26.1	9.8	17.8	28.0	21.7
	6	83.3	62.9	14.7	n.s.	n.s.	n.s.
	7	36.5	31.7	13.3	49.1	42.0	12.9
	8	64.1	44.8	14.2	36.1	39.2	13.5
	9	49.9	34.2	13.0	n.s.	n.s.	n.s.
	10	39.4	28.0	12.6	40.0	29.8	9.9
	11	47.8	34.2	11.5	59.7	47.9	12.1
	12	45.8	36.3	11.0	36.7	31.7	10.5
	13	72.8	54.9	13.5	35.4	26.6	7.5
	14	27.2	22.4	10.0	72.9	56.0	16.1
	15	69.5	51.9	13.9	26.9	22.1	15.6
	16	29.8	20.6	19.1	39.5	32.5	13.3
19	1	42.6	34.4	10.7	34.0	26.9	18.0
	2	50.4	36.4	13.3	30.3	25.4	7.9
	3	56.9	43.0	12.9	80.3	56.5	14.1
	4	78.6	51.7	12.5	25.9	23.3	12.9
	5	79.8	59.7	13.1	30.3	35.7	24.6
	6	56.7	43.9	12.7	n.s.	n.s.	n.s.
	7	54.5	42.3	11.5	5.7	14.3	8.8
	8	22.0	14.4	17.5	60.7	52.0	12.5
	9	46.0	36.5	12.8	63.2	49.7	20.9
	10	70.9	55.6	15.1	30.0	24.9	10.1
	11	72.3	52.8	16.1	13.8	22.1	19.9
	12	71.3	53.6	12.3	n.s.	n.s.	n.s.
	13	70.1	50.9	12.9	55.6	44.7	13.9
	14	41.1	41.7	12.9	13.4	23.5	16.4
	15	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	16	49.8	29.7	15.7	44.6	32.5	13.4
20	1	17.8	13.6	9.5	59.4	49.2	15.2
	2	n.s.	n.s.	n.s.	56.6	43.0	7.1
	3	67.0	49.5	13.5	29.9	22.9	8.4
	4	12.0	19.1	12.7	22.3	18.2	11.5
	5	31.1	23.2	10.8	4.0	12.9	10.7
	6	39.9	34.8	13.1	80.4	59.0	15.5
	7	56.7	48.9	14.3	36.4	39.5	10.8
	8	n.s.	n.s.	n.s.	28.5	32.9	14.0
	9	24.8	20.0	11.6	17.9	16.0	2.5
	10	70.3	50.2	14.9	28.0	24.0	10.0
	11	25.0	20.3	13.2	25.3	19.7	10.2
	12	67.9	49.0	13.7	69.1	54.1	17.4
	13	75.2	56.4	13.5	n.s.	n.s.	n.s.
	14	83.0	62.6	11.0	13.8	22.6	1.7
	15	74.5	57.9	13.0	79.6	59.0	19.1
	16	23.6	17.5	14.1	44.9	42.3	18.9

**Supplementary Data S1. Continued.**

21	1	23.0	16.9	10.2	14.7	23.4	15.7
	2	40.5	37.3	14.5	52.8	41.4	10.9
	3	31.8	24.7	11.8	76.3	58.4	14.3
	4	75.9	55.6	13.0	52.8	47.9	16.2
	5	63.6	49.5	12.7	17.7	21.8	14.7
	6	78.6	55.2	13.6	n.s.	n.s.	n.s.
	7	26.8	21.7	12.1	19.3	12.9	6.0
	8	69.4	50.0	14.3	48.3	41.1	12.2
	9	59.0	44.0	13.0	84.2	61.7	14.9
	10	25.5	17.9	12.0	55.8	42.1	11.2
	11	n.s.	n.s.	n.s.	20.4	25.4	12.4
	12	44.3	34.3	12.8	10.2	18.9	8.9
	13	74.0	54.5	13.1	61.3	48.1	12.3
	14	23.0	18.7	9.5	9.7	14.4	19.6
	15	n.s.	n.s.	n.s.	11.3	20.7	9.2
	16	36.9	28.7	12.5	24.6	28.3	10.0
22	1	70.5	53.3	14.2	21.3	26.9	14.4
	2	n.s.	n.s.	n.s.	41.3	31.6	10.2
	3	79.4	58.0	14.7	84.1	61.7	11.9
	4	65.2	48.3	12.2	28.2	31.6	14.7
	5	44.9	38.9	12.1	18.2	25.6	14.5
	6	76.1	55.3	13.8	54.8	47.1	15.5
	7	40.1	32.7	10.4	62.9	41.4	11.3
	8	25.2	15.3	17.3	24.6	29.4	14.1
	9	40.7	31.6	12.4	73.0	54.2	15.4
	10	71.2	50.9	15.1	29.8	24.8	10.1
	11	64.7	48.4	12.1	58.2	51.4	15.3
	12	51.1	40.4	11.2	n.s.	n.s.	n.s.
	13	69.3	54.3	13.5	n.s.	n.s.	n.s.
	14	26.8	21.5	5.9	32.6	28.3	11.7
	15	79.8	59.9	14.2	50.3	46.1	14.4
	16	44.1	31.5	14.8	25.8	27.7	15.9
23	1	69.5	53.5	15.3	66.2	49.8	15.5
	2	77.1	57.9	15.1	22.5	17.1	6.3
	3	30.0	22.8	12.5	26.7	21.0	7.8
	4	56.6	39.9	11.0	26.7	19.4	12.3
	5	39.6	29.6	10.0	17.1	27.3	15.5
	6	37.5	29.0	11.2	n.s.	n.s.	n.s.
	7	71.8	57.0	13.1	24.6	29.2	16.7
	8	8.7	5.7	18.0	56.7	42.9	11.1
	9	39.5	29.2	12.2	45.7	40.9	14.9
	10	27.0	21.4	12.0	54.1	43.3	11.9
	11	n.s.	n.s.	n.s.	5.7	13.8	14.6
	12	48.5	39.1	11.1	60.8	46.6	13.8
	13	80.6	57.9	13.9	45.9	36.4	12.3
	14	48.6	44.2	13.4	76.0	58.3	15.3
	15	n.s.	n.s.	n.s.	21.2	17.2	13.8
	16	32.4	23.0	15.9	9.6	15.3	12.8

**Supplementary Data S1. Continued.**

24	1	70.3	54.9	17.1	16.1	21.2	14.0
	2	n.s.	n.s.	n.s.	57.7	41.0	10.9
	3	48.5	36.9	13.0	5.1	12.7	3.5
	4	30.3	22.1	9.4	50.9	37.5	13.5
	5	18.2	12.4	8.9	6.7	15.5	19.1
	6	35.8	27.3	10.5	38.9	38.5	17.4
	7	63.8	52.5	11.8	58.0	48.8	10.9
	8	81.2	58.5	15.1	25.0	26.7	11.9
	9	61.1	45.0	13.2	n.s.	n.s.	n.s.
	10	68.9	47.7	15.4	38.2	28.0	10.1
	11	65.7	49.8	12.3	22.4	15.2	11.1
	12	62.5	49.5	12.1	n.s.	n.s.	n.s.
	13	74.1	52.7	12.9	26.9	20.6	12.4
	14	27.3	23.9	11.0	46.4	34.0	10.6
	15	80.0	57.6	15.6	51.2	40.3	15.5
	16	59.7	37.6	15.1	44.1	34.7	13.9
25	1	27.2	23.1	10.1	14.8	19.3	12.9
	2	51.3	43.3	15.2	51.5	38.2	11.0
	3	40.5	32.6	12.8	11.2	1.4	23.6
	4	82.5	56.1	13.0	19.6	12.9	11.4
	5	42.3	31.5	10.0	31.9	26.2	10.0
	6	33.4	36.8	16.0	n.s.	n.s.	n.s.
	7	37.0	38.0	14.1	16.1	24.0	11.1
	8	86.0	59.0	13.1	57.6	43.9	11.2
	9	56.8	42.8	13.7	77.9	56.5	13.7
	10	33.1	26.2	13.6	35.4	26.2	10.5
	11	n.s.	n.s.	n.s.	30.4	31.3	12.5
	12	56.3	44.6	11.6	42.3	31.7	11.1
	13	82.0	58.7	14.2	n.s.	n.s.	n.s.
	14	26.6	19.9	10.0	41.6	32.7	10.4
	15	64.6	50.5	13.5	n.s.	n.s.	n.s.
	16	51.3	30.8	15.3	26.0	20.0	12.6
26	1	29.3	22.9	10.2	58.8	47.1	14.6
	2	n.s.	n.s.	n.s.	56.1	43.1	11.5
	3	36.7	29.6	13.0	82.8	62.7	12.4
	4	76.5	53.1	12.3	40.3	32.1	13.3
	5	53.6	43.7	12.9	50.3	44.5	14.9
	6	55.4	40.4	13.0	44.7	41.3	16.7
	7	75.1	55.7	12.9	49.8	39.5	11.9
	8	62.8	42.3	14.4	45.8	38.0	11.1
	9	25.4	18.4	11.6	n.s.	n.s.	n.s.
	10	72.8	53.3	15.3	34.0	26.9	10.3
	11	68.9	49.7	12.4	78.6	57.8	17.6
	12	53.0	40.6	11.3	n.s.	n.s.	n.s.
	13	69.6	53.4	15.3	80.7	56.3	13.5
	14	44.0	34.2	10.8	79.2	58.1	14.4
	15	42.6	32.7	11.8	57.3	49.4	18.3
	16	33.2	25.1	15.5	47.3	39.3	14.5

**Supplementary Data S1. Continued.**

27	1	34.0	23.4	10.6	19.0	25.4	18.0
	2	70.9	54.1	15.8	24.2	174.0	9.9
	3	76.6	56.5	15.7	61.2	49.8	11.6
	4	66.5	47.5	11.8	35.2	30.7	13.9
	5	4.3	7.2	11.8	31.4	21.4	10.4
	6	36.7	30.6	11.5	n.s.	n.s.	n.s.
	7	54.5	40.3	12.4	27.4	26.7	12.5
	8	31.1	18.9	15.9	68.8	55.1	12.5
	9	52.1	38.1	13.2	77.8	56.9	14.5
	10	55.6	46.7	15.7	33.4	27.0	10.3
	11	23.8	19.1	13.5	34.1	37.8	6.7
	12	71.6	52.1	13.3	75.1	55.2	13.1
	13	74.3	54.1	13.2	n.s.	n.s.	n.s.
	14	26.0	18.7	9.9	28.1	20.8	10.6
	15	60.6	47.0	13.0	7.5	16.5	11.6
	16	33.7	23.1	14.3	42.9	32.3	14.9
28	1	61.5	46.6	13.0	36.2	26.2	16.5
	2	54.1	42.7	16.3	54.2	41.5	11.5
	3	73.5	55.4	15.9	6.8	15.2	11.2
	4	36.1	26.3	9.7	17.3	12.0	13.1
	5	63.5	46.8	12.1	27.5	34.7	19.1
	6	59.8	44.9	13.5	33.1	27.0	15.2
	7	52.3	36.3	11.4	31.5	23.2	9.7
	8	n.s.	n.s.	n.s.	30.3	33.8	15.2
	9	56.3	40.3	13.7	31.7	25.1	19.8
	10	25.5	18.4	13.5	29.0	20.9	10.5
	11	32.2	23.9	12.3	7.0	12.3	14.7
	12	62.7	48.4	12.1	60.4	47.5	16.6
	13	68.6	53.6	13.5	69.5	51.8	14.6
	14	46.8	36.2	10.3	40.9	31.5	12.3
	15	36.3	29.7	13.6	34.7	31.2	15.8
	16	39.0	26.7	14.7	49.4	33.9	15.3

**Supplementary Data S2.** Statistical analysis of the alpha diversity measurements. A difference is considered as significant when  $p < 0.05$ .

<b>Comparison between Environments for the alpha diversity index</b>	
<b>Observed ASVs</b>	<b><i>p</i>-value</b>
Wilcoxon test Water vs Oysters	0.0001*

<b>Shannon index</b>	<b><i>p</i>-value</b>
Wilcoxon test Water vs Oysters	0.00009793*

<b>Comparison between Control and ALAN for the alpha diversity index</b>	
<b>Observed ASVs</b>	<b><i>p</i>-value</b>
Wilcoxon test Control vs ALAN	0.119

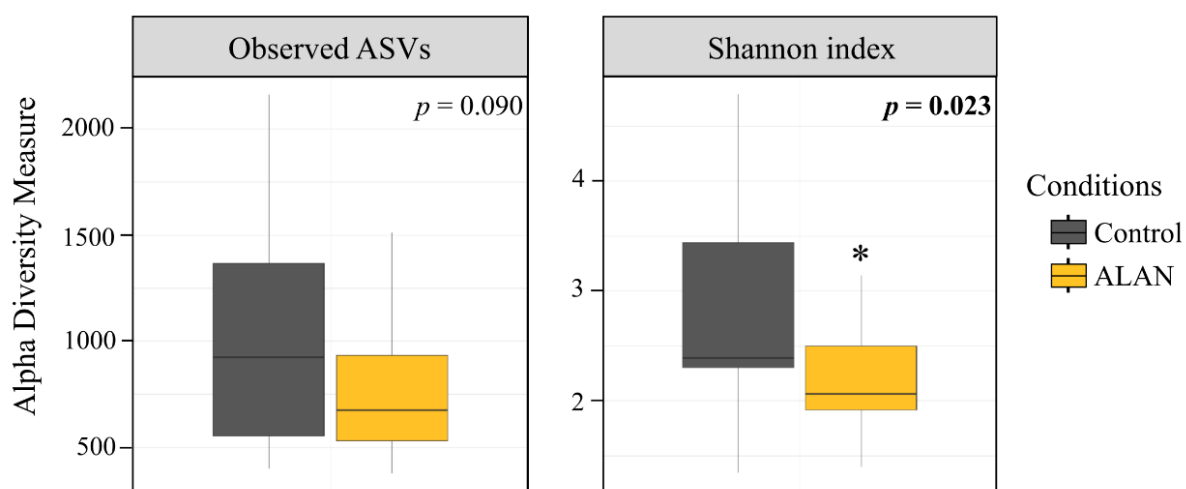
  

<b>Shannon index</b>	<b><i>p</i>-value</b>
Wilcoxon test Control vs ALAN	0.023*

<b>Comparison between conditions for the alpha diversity index</b>	
<b>Shannon index</b>	<b><i>p</i>-value</b>
Kruskal-Wallis test	0.021*
Wilcoxon test Control_Daytime vs Control_Nighttime	0.019*
Wilcoxon test ALAN_Daytime vs ALAN_Nighttime	0.923
Wilcoxon test Control_Daytime vs ALAN_Daytime	0.999
Wilcoxon test Control_Daytime vs ALAN_Nighttime	0.946
Wilcoxon test Control_Nighttime vs ALAN_Daytime	0.024*
Wilcoxon test Control_Nighttime vs ALAN_Nighttime	0.005*





**Supplementary figure 5.** Alpha diversity measures of (A) ASVs number (richness, number of observed ASVs) and (B) Shannon index (evenness of the ASVs abundance distribution) between conditions (control and ALAN) in oysters gills tissues. Asterisks indicate significant differences between the two conditions ( $p < 0.05$ ).

**Supplementary Data S3a.** Venn diagram ASV description of the core microbiota.**Core microbiota (39 ASVs)**

<b>ASV</b>	<b>Phylum</b>	<b>Family</b>	<b>Genus</b>
ASV160	<i>Actinobacteriota</i>	<i>Ilumatobacteraceae</i>	<i>Ilumatobacter</i>
ASV16	<i>Bacteroidota</i>	<i>Cryomorphaceae</i>	NoAffiliation
ASV21	<i>Bacteroidota</i>	<i>Cryomorphaceae</i>	NoAffiliation
ASV22	<i>Bacteroidota</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Polaribacter</i>
ASV26	<i>Bacteroidota</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Polaribacter</i>
ASV7	<i>Campylobacterota</i>	<i>Arcobacteraceae</i>	NoAffiliation
ASV121	<i>Campylobacterota</i>	<i>Arcobacteraceae</i>	NoAffiliation
ASV95	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Paraspirulinaceae</i>	NoAffiliation
ASV68	<i>Firmicutes</i>	<i>Mycoplasmataceae</i>	<i>Mycoplasma</i>
ASV134	<i>Firmicutes</i>	<i>Mycoplasmataceae</i>	<i>Mycoplasma</i>
ASV200	<i>Myxococcota</i>	<i>Nannocystaceae</i>	NoAffiliation
ASV83	<i>Patescibacteria</i>	NoAffiliation	NoAffiliation
ASV251	<i>Planctomycetota</i>	<i>Pirellulaceae</i>	<i>Blastopirellula</i>
ASV239	<i>Planctomycetota</i>	<i>Gimesiaceae</i>	<i>Gimesia</i>
ASV18	<i>Proteobacteria</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Lentibacter</i>
ASV129	<i>Proteobacteria</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	NoAffiliation
ASV219	<i>Proteobacteria</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	NoAffiliation
ASV110	<i>Proteobacteria</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Pseudophaeobacter</i>
ASV142	<i>Proteobacteria</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Roseovarius</i>
ASV3	<i>Proteobacteria</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Sedimentitalea</i>
ASV188	<i>Proteobacteria</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Yoonia-Loktanella</i>
ASV91	<i>Proteobacteria</i>	<i>Rickettsiaceae</i>	<i>Candidatus</i>
ASV29	<i>Proteobacteria</i>	<i>Clade</i>	<i>Clade</i>
ASV6	<i>Proteobacteria</i>	<i>Colwelliaceae</i>	<i>Colwellia</i>
ASV14	<i>Proteobacteria</i>	<i>Colwelliaceae</i>	<i>Colwellia</i>
ASV27	<i>Proteobacteria</i>	<i>Colwelliaceae</i>	<i>Colwellia</i>
ASV32	<i>Proteobacteria</i>	<i>Colwelliaceae</i>	<i>Colwellia</i>
ASV149	<i>Proteobacteria</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Aliivibrio/Vibrio</i>
ASV5	<i>Proteobacteria</i>	<i>Nitrincolaceae</i>	<i>Amphritea</i>
ASV19	<i>Proteobacteria</i>	<i>Nitrincolaceae</i>	<i>Amphritea</i>
ASV71	<i>Proteobacteria</i>	<i>Nitrincolaceae</i>	<i>Amphritea</i>
ASV63	<i>Proteobacteria</i>	<i>Nitrincolaceae</i>	<i>Marinobacterium</i>
ASV75	<i>Proteobacteria</i>	<i>Nitrincolaceae</i>	<i>Neptuniibacter</i>
ASV45	<i>Proteobacteria</i>	<i>Nitrincolaceae</i>	NoAffiliation
ASV1	<i>Spirochaetota</i>	<i>Spirochaetaceae</i>	NoAffiliation
ASV2	<i>Spirochaetota</i>	<i>Spirochaetaceae</i>	NoAffiliation
ASV8	<i>Spirochaetota</i>	<i>Spirochaetaceae</i>	NoAffiliation
ASV186	<i>Spirochaetota</i>	<i>Spirochaetaceae</i>	NoAffiliation
ASV47	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Puniceicoccaceae</i>	<i>Lentimonas</i>

**Supplementary Data S3b.** Venn diagram ASV description of the microbiota specific to oysters gills in the control condition

**Microbiota specific to oysters gills exposed in the control condition (20 ASVs)**

ASV	Phylum	Family	Genus
ASV235	<i>Actinobacteriota</i>	<i>Ilumatobacteraceae</i>	<i>Ilumatobacter</i>
ASV649	<i>Actinobacteriota</i>	<i>Microtrichaceae</i>	NoAffiliation
ASV316	<i>Bacteroidota</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Lacinutrix</i>
ASV135	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Xenococcaceae</i>	<i>Xenococcus</i>
ASV496	<i>Fusobacteriota</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Psychrilyobacter</i>
ASV593	<i>Nitrospinota</i>	<i>Nitrospinaceae</i>	<i>LS-NOB</i>
ASV217	<i>Planctomycetota</i>	<i>Phycisphaeraceae</i>	<i>SMIA02</i>
ASV463	<i>Planctomycetota</i>	<i>Pirellulaceae</i>	<i>Blastopirellula</i>
ASV506	<i>Proteobacteria</i>	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Filomicrobium</i>
ASV628	<i>Proteobacteria</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Ahrensia</i>
ASV374	<i>Proteobacteria</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Cognatiyoonia/Sulfitobacter</i>
ASV62	<i>Proteobacteria</i>	<i>Methylophilaceae</i>	<i>Methylotenera</i>
ASV99	<i>Proteobacteria</i>	<i>Colwelliaceae</i>	<i>Colwellia</i>
ASV450	<i>Proteobacteria</i>	<i>Colwelliaceae</i>	<i>Colwellia</i>
ASV344	<i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>
ASV415	<i>Proteobacteria</i>	<i>Psychromonadaceae</i>	<i>Psychromonas</i>
ASV39	<i>Proteobacteria</i>	<i>Nitrincolaceae</i>	<i>Amphritea</i>
ASV59	<i>Proteobacteria</i>	<i>Nitrincolaceae</i>	<i>Amphritea</i>
ASV197	<i>Proteobacteria</i>	<i>Porticoccaceae</i>	<i>Porticoccus</i>
ASV387	<i>Proteobacteria</i>	<i>Porticoccaceae</i>	<i>Porticoccus</i>

**Supplementary Data S3c.** Venn diagram ASV description of the microbiota specific to oysters gills exposed to ALAN

**Microbiota specific to oysters gills exposed to ALAN (11 ASVs)**

ASV	Phylum	Family	Genus
ASV348	<i>Campylobacterota</i>	<i>Arcobacteraceae</i>	NoAffiliation
ASV60	<i>Planctomycetota</i>	NoAffiliation	NoAffiliation
ASV290	<i>Planctomycetota</i>	NoAffiliation	NoAffiliation
ASV195	<i>Planctomycetota</i>	<i>Phycisphaeraceae</i>	<i>SMIA02</i>
ASV209	<i>Proteobacteria</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Phaeobacter/Pseudophaeobacter</i>
ASV367	<i>Proteobacteria</i>	<i>Colwelliaceae</i>	<i>Colwellia</i>
ASV366	<i>Proteobacteria</i>	<i>Psychromonadaceae</i>	<i>Psychromonas</i>
ASV230	<i>Proteobacteria</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio</i>
ASV82	<i>Proteobacteria</i>	<i>Cellvibrionaceae</i>	<i>Aestuariicella</i>
ASV185	<i>Proteobacteria</i>	<i>Nitrincolaceae</i>	NoAffiliation
ASV488	<i>Proteobacteria</i>	<i>Spongiibacteraceae</i>	<i>BD1-7</i>

**Supplementary Data S4.** Statistical analysis of the beta diversity. A difference is considered as significant when  $p < 0.05$ .

<b>Comparison between daytime and nighttime in control condition</b>		
<b>PERMANOVA</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b><i>p</i>-value</b>
Daytime vs Nighttime	0.28	0.0117*

<b>Comparison between daytime and nighttime in ALAN condition</b>		
<b>PERMANOVA</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b><i>p</i>-value</b>
Daytime vs Nighttime	0.06	0.4652

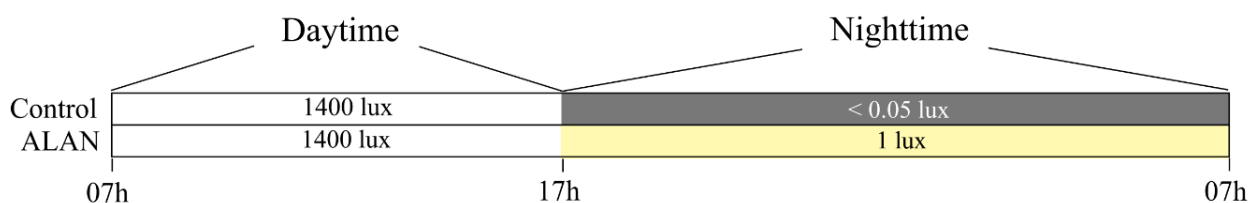
<b>Comparison between control and ALAN during daytime</b>		
<b>PERMANOVA</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b><i>p</i>-value</b>
Control vs ALAN	0.07	0.4706

<b>Comparison between control and ALAN during nighttime</b>		
<b>PERMANOVA</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b><i>p</i>-value</b>
Control vs ALAN	0.19	0.038*

ASV	log2FoldChange	Adjusted p-value	Phylum	Class	Order	Family	Genus
ASV13813	18.59899461	2.17E-07	Bacteroidota	Bacteroidia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	<i>Lacinutrix</i>   <i>Olleya</i>
ASV348	7.496859019	1.47E-05	Campylobacterota	Campylobacteria	Campylobacterales	Arcobacteraceae	NoAffiliation
ASV13811	18.59899461	2.17E-07	Patescibacteria	Parcubacteria	Candidatus	NoAffiliation	NoAffiliation
ASV8247	18.59899461	2.17E-07	Planctomycetota	Planctomycetes	Pirellulales	Pirellulaceae	<i>Pirellula</i>
ASV13812	18.59899461	2.17E-07	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Micavibrionales	NoAffiliation	NoAffiliation
ASV107	23.87669327	7.39E-13	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	ABI	NoAffiliation
ASV205	26.35185403	1.21E-18	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Polynucleobacter</i>
ASV3744	18.59899461	2.17E-07	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Coxiellales	Coxiellaceae	<i>Coxiella</i>
ASV6	2.64839119	0.008059243	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Colwelliaceae	<i>Colwellia</i>
ASV13814	18.59899461	2.17E-07	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacterales	Colwelliaceae	<i>Colwellia</i>
ASV39	-12.47368083	1.86E-21	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Nitriocolaceae	<i>Amphritea</i>
ASV59	-9.369163215	3.34E-13	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Nitriocolaceae	<i>Amphritea</i>
ASV13810	18.59899461	2.17E-07	Verrucomicrobiota	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	DEV007	NoAffiliation

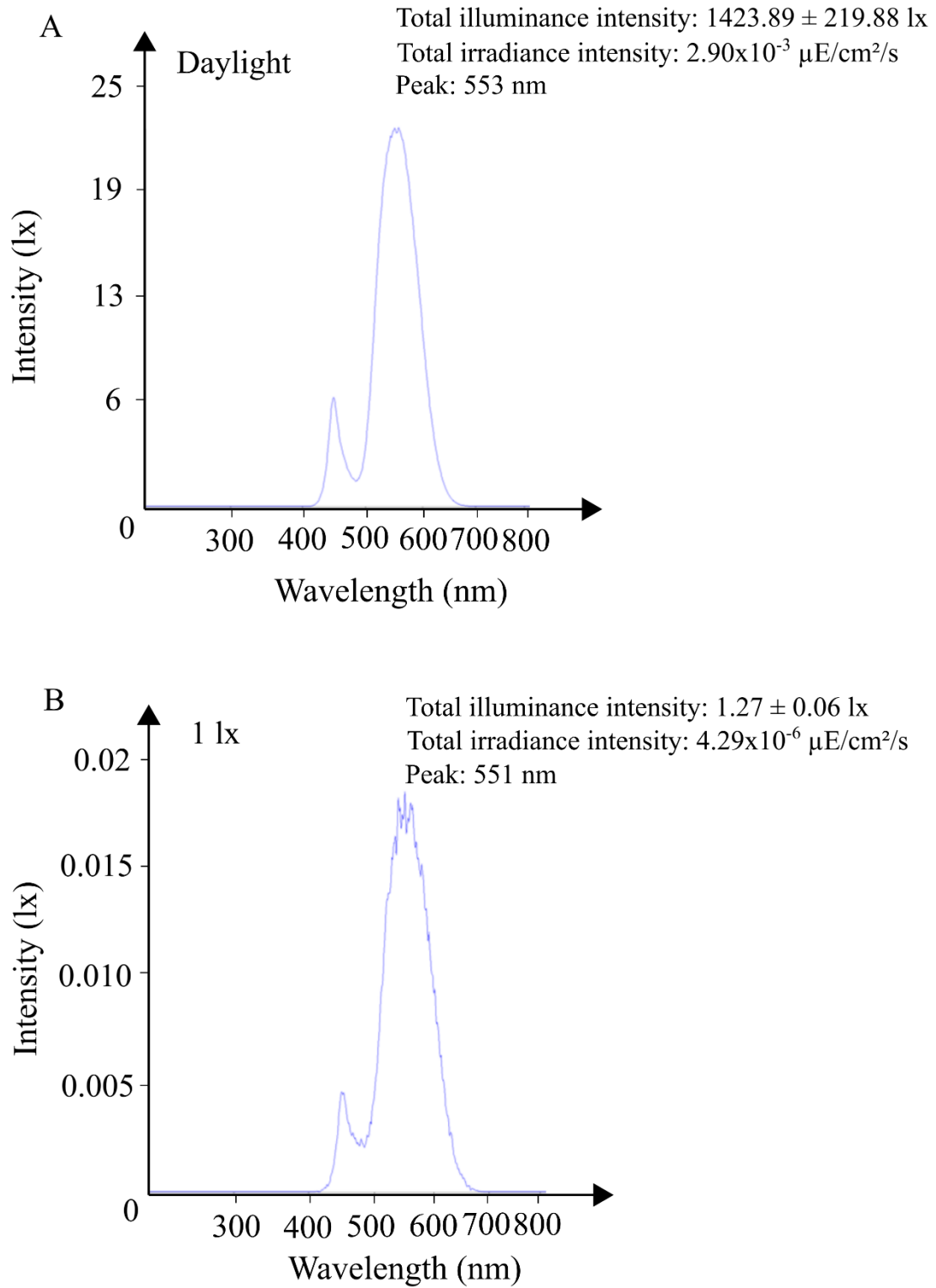
**Supplementary Data S5.** ASVs significant differential abundance in the ALAN condition compared to the control. A difference is considered as significant when  $p < 0.05$ .



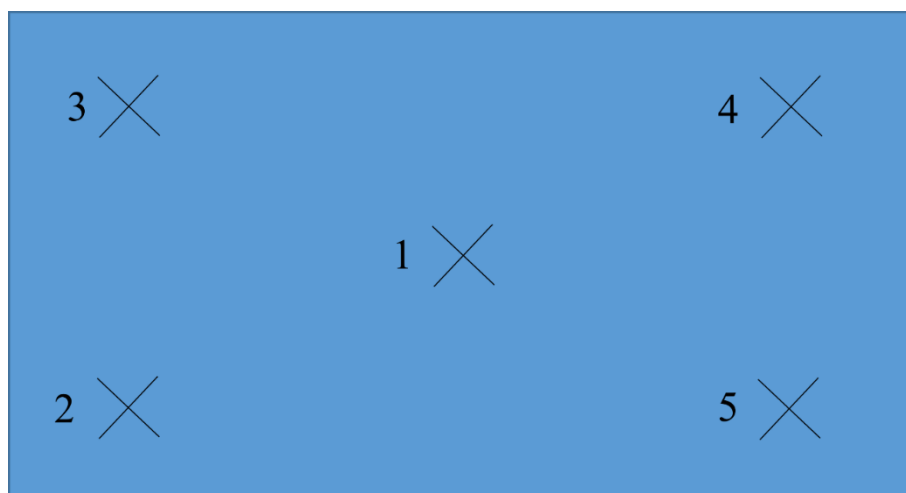
**Supplementary figure 6.** Daily light during the 30 days of exposure to the control and the ALAN conditions.

**Supplementary Table S1.** Values of underwater measurements of the maximum light intensity during the daytime and ALAN intensity for each position in the tank, and the mean  $\pm$  SE.

Location in the tank	Maximum intensity during the daytime (lx)	ALAN intensities (lx)
1	2087.15	1.48
2	1636.35	1.26
3	1519.94	1.26
4	922.64	1.20
5	953.38	1.14
<b>Mean <math>\pm</math> SE</b>	<b>1423.89 <math>\pm</math> 219.88</b>	<b>1.27 <math>\pm</math> 0.06</b>



**Supplementary figure 7.** Spectrum of the maximum light intensity during daytime (A), and light spectrum of ALAN at an intensity of 1 lx (B) measured underwater near the oysters.



**Supplementary figure 8.** Five locations in the experimental tank (L x W x H: 74.8 x 54.8 x 40.8 mm) used for underwater intensity and spectral measurements at the oyster level.



## 4. Conclusion

Les résultats de cette dernière étude indiquent que la perturbation du rythme journalier au niveau moléculaire et comportemental de *C. gigas* par LAN à une intensité faible et réaliste persiste au bout de 28 jours. Ce travail montre également que LAN réduit de 32 % la croissance coquillière de l’huitre dans nos conditions expérimentales. L’effet négatif de LAN sur la croissance de l’huitre est très marqué sur toute la durée de l’expérimentation qui a été conduite en hiver, période de l’année où la croissance est la plus faible. Ainsi, l’effet de LAN sur ce paramètre mériterait d’être étudié pendant le printemps, période pendant laquelle la croissance est la plus importante, afin d’observer un effet qui pourrait être plus marqué (Payton et al., 2017a). LAN affecte également le microbiote branchial. En effet, sa composition taxonomique et sa diversité sont perturbées au bout des 28 jours d’exposition. Même si les fonctions du microbiote branchial de l’huitre ne sont pas bien connues, nous savons que cet organe est directement impliqué dans les fonctions de respiration et de nutrition. Nous savons aussi que ce microbiote branchial est suspecté d’avoir un rôle dans la santé des huitres, notamment du fait qu’une des étapes du syndrome de mortalité chez l’huitre (*Pacific Oyster Mortality Syndrome*, POMS) correspond à un microbiote déstabilisé dont la structure et la composition taxonomique peut prédire la mortalité des huitres (Clerissi et al., 2020; de Lorgeril et al., 2018; Paillard et al., 2022). Cette étude a montré que LAN modifie la diversité microbienne journalière et en particulier l’abondance relative des genres *Arcobacter* et *Pseudoalteromonas* qui pourrait conduire à des conséquences sur la santé de l’huitre, notamment en facilitant l’infection par des pathogènes.

Enfin, j’ai pu valider l’hypothèse initiale de ce travail qui était d’établir un lien entre la perturbation du rythme biologique par LAN et les fonctions physiologiques. J’ai pu montrer une relation entre la robustesse du rythme journalier et le taux de croissance coquillière de l’huitre ainsi que la dysbiose du microbiote. Dans ce travail, j’ai pu montrer que plus LAN perturbe le rythme, moins l’huitre grandit et plus l’abondance relative du troisième phyla le plus abondant du microbiote, *Campylobacterota*, est modifiée.

Ces résultats nous amènent donc à émettre l’hypothèse que la pollution lumineuse, via son action principale qui est de désynchroniser des rythmes biologiques, peut potentiellement avoir des conséquences délétères sur toutes les fonctions physiologiques à travers leurs organisations temporelles, et donc d’avoir des répercussions majeures sur la santé des organismes.

# **Conclusion générale et perspectives**

## 1. Discussion et conclusion générale

L'objectif de ce travail de recherche est de mieux comprendre les effets de LAN chez les organismes côtiers, peu étudiés comparés aux organismes terrestres, en évaluant son impact chez un bivalve sentinelle d'intérêt économique et écologique, l'huitre *C. gigas*. Cette espèce clé des écosystèmes côtiers originaire du Japon est aujourd'hui distribuée sur les zones côtières dans le monde entier notamment dû à sa forte tolérance à des conditions environnementales variables. Cela en fait une espèce facilement utilisable comme bioindicateur de la pollution lumineuse du littoral (FAO, 2016; Miossec et al., 2009; Troost, 2010). Ainsi, après avoir caractérisé la robustesse du rythme journalier de *C. gigas* en fonction d'une gamme d'intensités lumineuses pendant la photophase, les études menées ici ont cherché à répondre à deux principales questions. Quels sont les effets de LAN sur la physiologie de *C. gigas* à travers la perturbation des rythmes biologiques ? Quelles conséquences tirer de mes résultats pour limiter efficacement ces effets ?

### 1.1. Les effets de LAN sur le rythme journalier et la physiologie de *C. gigas*

Dans un premier temps, ce travail a permis de mettre en évidence que LAN affecte le rythme journalier comportemental et l'horloge moléculaire de *C. gigas* dès une intensité très faible (0.1 lx). Cette faible intensité correspond à celle du skyglow, la source indirecte de LAN (Figure 6), qui peut couvrir de larges étendues. Le skyglow pouvant être présent à des centaines de km de sa source, il peut toucher des zones préservées des activités humaines telles que les aires marines protégées (Davies et al., 2016; Luginbuhl et al., 2014).

Les environnements côtiers sont très touchés par LAN avec 1.9 million de km<sup>2</sup> de côtes exposées à des intensités biologiquement importantes de LAN (intensités lumineuses suffisantes pour provoquer des réponses chez les organismes marins) à une profondeur de 1 m (Bâtnes et al., 2015; Smyth et al., 2021). Dans ces environnements, la présence de LAN est vouée à augmenter. En effet, dans beaucoup de régions du monde LAN est liée à la densité de population qui est importante sur le littoral et ne cesse d'augmenter (Cox et al., 2022; Kummu et al., 2016). Par exemple, en France, premier pays producteur d'huitre en Europe, la densité de population sur les côtes est 2.5 fois plus élevée que la densité moyenne en métropole (<https://observatoires-littoral.developpement-durable.gouv.fr/chiffres-cles-r9.html>). Ainsi, en France, comme dans de multiples régions du monde, *C. gigas* réside dans des environnements côtiers fortement touchés par LAN (Figure 9 et Figure 15).

Etant sessiles et benthiques, les huitres sont des organismes d'autant plus susceptibles d'être exposées à LAN. Si je prends comme cas d'étude le site du bassin d'Arcachon, c'est un lieu très anthropisé où l'ostréiculture constitue une part importante de l'activité économique. Dans le cadre de cette activité, les ostréiculteurs peuvent être amenés à éclairer directement les parcs à huitres afin d'éviter les vols par exemple, sans parler du *skyglow* venant de communes bordant le bassin d'Arcachon, ou même de la métropole de Bordeaux située à 40 kms. Nos résultats suggérant le fait que LAN impacte la croissance de l'huitre, ils pourraient, s'ils se confirment *in situ*, amener les ostréiculteurs à reconsidérer cette pratique puisqu'elle peut nuire à leur production et donc être un manque à gagner. Par ailleurs, l'impact de LAN sur le microbiote branchial peut avoir des conséquences importantes sur l'intégrité de *C. gigas* puisqu'il serait impliqué dans la santé de l'huitre, et donc à terme la perturbation de ce microbiote pourrait aussi induire une perte économique chez les ostréiculteurs (Clerissi et al., 2020; Paillard et al., 2022). Etant donné que *C. gigas* est une espèce cultivée dans le monde entier, les répercussions économiques de leur perturbation par LAN peuvent être mondiales (FAO, 2016).

Les impacts physiologiques mis en évidence dans ce travail sont significativement corrélés à la perturbation du rythme par LAN : plus le rythme journalier est robuste face à LAN, moins la croissance et le microbiote sont atteints. Ces résultats soulignent bien l'importance de l'organisation temporelle des fonctions physiologiques pour l'intégrité des organismes. Ainsi, la perturbation de ce rythme journalier chez *C. gigas* et les conséquences physiologiques qu'elle engendre pourrait avoir de graves impacts sur l'intégrité de cet organisme clé des écosystèmes côtiers et donc sur la structure de ces derniers. En effet, les huitres et plus globalement les bivalves remplissent diverses fonctions au sein des écosystèmes notamment en représentant une zone d'habitats, de refuges ou d'alimentation pour d'autres espèces (Grabowski et al., 2012; van der Schatte Olivier et al., 2018). Quelques études se sont intéressées aux potentielles conséquences de LAN sur la structure et les processus des écosystèmes côtiers. Par exemple, Davies et al. (2015) ont montré que LAN altère la composition des communautés marines épifaunales et Bolton et al. (2017) ont mis en évidence que la pression de prédation sur les assemblages d'invertébrés sessiles par des poissons était plus importante lors de nuit éclairées. Ainsi, la perturbation de l'organisation temporelle des processus biologiques de l'huitre, que ce soit la croissance, le microbiote ou d'autres (recrutement larvaire, gamétogénèse, ponte...), est susceptible d'avoir d'importantes répercussions écologiques qui restent à découvrir. Plus globalement, des études traitant de l'effet de LAN sur les populations et communautés côtières sont manquantes dans la littérature.

## 1.2. Comment limiter efficacement l'impact de LAN chez *C. gigas* ?

Étant donné les effets néfastes de LAN chez l'huître, limiter ses impacts chez cet organisme clé des écosystèmes côtiers semble nécessaire. Des stratégies visant à atténuer l'effet de LAN sont proposées dans la littérature mais leur réelle efficacité n'est que très peu évaluée. Les travaux présentés ici permettent de rendre compte de la potentielle efficacité de trois stratégies d'atténuation chez l'huître : diminuer l'intensité lumineuse, restreindre le spectre et couper l'éclairage pendant une partie de la nuit (PNL).

Tout d'abord, il a été montré ici que diminuer l'intensité de LAN à 0.1 lx diminuait ses effets sur le rythme journalier comportemental de l'huître. Cependant, à cette faible intensité les effets comportementaux persistent, même s'ils sont atténués, et les effets moléculaires restent inchangés, sans compter le fait que cette intensité est bien trop faible pour un éclairage public. Ainsi, diminuer l'intensité de LAN comme stratégie d'atténuation de ses effets n'est pas une solution applicable sur le terrain.

Ensuite, l'effet de LAN sur le rythme journalier de *C. gigas* a été évalué en fonction de la longueur d'onde (lumière blanche, rouge, verte et bleue). Les résultats indiquent que toutes les compositions spectrales testées affectent le rythme journalier de *C. gigas* avec un effet plus marqué pour la lumière bleue, intermédiaire en lumière rouge et moins marqué en lumière verte. Ainsi, dans l'optique de limiter les effets de LAN chez l'huître, l'utilisation de lumières blanche et bleue est à bannir alors que l'utilisation de lumière verte au lieu de la blanche classiquement utilisée pourrait être envisagée. Cependant, dans les écosystèmes côtiers où réside *C. gigas*, les bénéfices apportés à l'huître par la lumière verte pourraient n'être bénéfiques qu'à cette espèce et voir même être plus néfaste qu'une lumière blanche pour d'autres. La diversité de photorécepteurs et de sensibilités spectrales dans l'environnement étant très large, celles-ci doivent être caractérisées chez un ensemble d'organismes représentatifs d'un même environnement, afin de trouver une longueur d'onde ayant les effets les plus restreints sur les communautés côtières (Alaasam et al., 2021; Falcon et al., 2020). Même si cette étude apporte un premier élément de réponse pour trouver la longueur d'onde ayant le moins d'impacts sur les environnements côtiers, tester l'effet de différentes compositions spectrales de LAN chez d'autres organismes côtiers est aujourd'hui nécessaire.

Enfin, les potentiels bénéfiques du PNL chez *C. gigas* ont été évalués. L'ensemble des résultats indique que PNL atténue certains effets de LAN induits en FNL sur le rythme comportemental journalier de l'huître. Cependant, quand on se place dans des conditions plus réalistes, c'est-à-

dire avec un *skyglow* présent pendant toute la nuit, les bénéfices de la stratégie PNL s'en trouvent pour la plupart abolies. Certains effets de LAN en FNL peuvent même être aggravés et d'autres n'apparaissent que lorsque le *skyglow* est présent (effets moléculaires). Ainsi, la stratégie consistant à couper l'éclairage nocturne pendant une partie de la nuit serait plus néfaste encore qu'un éclairage constant dû à la présence continue du *skyglow*. Des études sur le terrain doivent être menées pour confirmer ces résultats. Cependant, on peut émettre l'hypothèse que, pour que la stratégie d'atténuation soit efficace dans le cas des huitres, il serait nécessaire que toutes les communes coupent leur éclairage nocturne aux mêmes heures, afin que, sur cette plage horaire, les huitres soient plongées dans une obscurité plus « naturelle ».

Ainsi, même si des études *in situ* sont nécessaires, les résultats de ce travail indiquent que les différentes stratégies d'atténuation testées ne semblent soit pas réalisables, soit pas bénéfiques pour l'huitre. Cependant, d'autres stratégies peuvent être mise en place. Tout d'abord, il est primordial de conserver les zones dont le ciel nocturne est préservé de LAN, c'est-à-dire que la lumière artificielle ne dépasse pas la luminosité naturelle du ciel (Gaston et al., 2012; Gaston and Sánchez de Miguel, 2022). Pour cela, l'association *International DarkSky* certifie des sites de « *Dark Sky Places* » dont la qualité du ciel nocturne est alors protégée (<https://darksky.org/what-we-do/international-dark-sky-places/>). Ensuite, il semble nécessaire d'optimiser les systèmes d'éclairage déjà en place qui peuvent être mal conçus, mal installés ou mal entretenus et donc émettre une partie de leur lumière dans des directions non souhaitées (Gaston et al., 2012). De plus, afin de limiter l'émission de lumière vers des zones que l'on ne souhaite pas éclairer, des barrières à la diffusion de cette lumière (mur, végétation) peuvent être construites et les surfaces absorbantes peuvent remplacer des surfaces réfléchissantes (Gaston et al., 2012; Longcore and Rich, 2016). Il est également possible de coupler aux éclairages nocturne un détecteur de mouvement pour que la lumière ne se déclenche qu'en cas d'activité proche (Kyba et al., 2014; Longcore and Rich, 2016; Zielinska-Dabkowska, 2018). Cependant, comme dans le cadre de l'expérimentation avec PNL couplé au *skyglow*, provoquer des changements d'intensité lumineuse brusques pourrait être plus néfaste qu'une intensité lumineuse constante pendant la nuit (Longcore and Rich, 2016).

## 2. Perspectives

Les résultats des études menées ici offrent plusieurs perspectives de travail. Tout d'abord, les effets de LAN chez *C. gigas* pourraient être caractérisés en fonction d'autres caractéristiques d'éclairage. Par exemple, il serait intéressant de comparer l'effet de différentes technologies d'éclairage (LED, HPS, LPS ...) à une intensité identique. Chez *Gammarus jazdzewskii* une différence d'effets est observée : à une intensité de 2 lx, l'éclairage LED provoque une diminution significative de sa croissance alors que l'éclairage HPS n'a pas d'impact (Czarnecka et al., 2021). Ensuite, après avoir évalué l'effet de LAN sur le rythme journalier de *C. gigas*, son impact peut être étudié sur les autres rythmes biologiques identifiés à ce jour chez cet organisme. En effet, le comportement l'huitre peut également être synchronisé avec les cycles lunaires (Payton and Tran, 2019). Etant donné que les faibles intensités de la lune et leurs variations sont perçues par *C. gigas*, on peut facilement imaginer qu'elles soient masquées par les intensités de LAN. Ce cas de figure a déjà été identifié chez les coraux *Acropora millepora* et *Acropora digitifera* dont la gamétogénèse a été retardée ou masquée par LAN, entraînant une ponte désynchronisée (Ayalon et al., 2021). A l'échelle annuelle, le comportement de *C. gigas* est également synchronisé avec la variation de la photopériode au fil des jours et des saisons afin d'anticiper les changements saisonniers et de synchroniser des processus biologiques primordiaux (la phénologie) tels que la croissance, la gamétogénèse et la ponte (Bernard et al., 2016; Payton et al., 2017a). Cependant, LAN peut venir masquer la variation de cette photopériode et en perturber la perception chez l'huitre puisque l'éclairage artificiel nocturne est souvent présent pendant l'aube et le crépuscule. Ainsi, les processus physiologiques saisonniers chez cet organisme peuvent en être impactés. Les travaux réalisés ici montre que LAN perturbe deux processus physiologiques, la croissance coquillière et le microbiote branchial, mais d'autres fonctions physiologiques, telles que la reproduction ou l'immunité, pourraient également être affectées par LAN. Par exemple, la gamétogénèse et la ponte, étant deux paramètres liés notamment à la perception de la photopériode, seraient tous deux susceptibles d'être impactés par LAN, mettant en danger la fitness de *C. gigas*. Il serait également intéressant d'évaluer le potentiel impact de LAN sur la capacité de cette espèce à lutter contre une infection virale. L'impact négatif de LAN sur le système immunitaire a déjà été mis en évidence chez le criquet *Teleogryllus commodus* et les juvéniles du crapaud *Bufo bufo* (Jones et al., 2015; Touzot et al., 2021). L'hypothèse de l'effet néfaste de LAN sur l'immunité de l'huitre est renforcée par les résultats du chapitre VII qui indiquent que LAN impacte le microbiote branchial ayant une fonction de barrière de défense contre les pathogènes.

Ici, les études réalisées ont été menées sur des huitres adultes. Cependant, LAN pourrait également affecter les stades larvaires de *C. gigas*, avec des effets potentiels sur le développement embryon-larvaire ou bien sur la fixation des larves, qui est impactée par LAN chez les bernacles (Lynn et al., 2021; Manriquez et al., 2021).

Ce travail révèle que l'huitre *C. gigas* est sensible à de très faibles intensités lumineuses de LAN (0.1 lx), équivalentes à celle du *skyglow*. Ainsi cette espèce pourrait être envisagée comme espèce bioindicatrice de LAN, c'est-à-dire une espèce sentinelle permettant de caractériser l'état d'un écosystème, ce qui est déjà le cas en écotoxicologie (Burioli et al., 2017; Gerhardt, 2002; Shulkin et al., 2003). Ainsi, dans le cadre de l'étude de LAN, *C. gigas* pourrait être utilisée comme bioindicateur des effets de LAN sur un environnement côtier. Cependant pour une telle utilisation, caractériser au préalable l'impact de LAN sur le rythme journalier de *C. gigas in situ* est nécessaire. En effet, les résultats obtenus lors de ce travail en conditions contrôlées du laboratoire demandent à être validés *in situ* et sur du long terme. Une étude sur le terrain d'au moins une année permettrait d'évaluer les impacts néfastes de LAN en conditions réalistes sur le rythme journalier de l'huitre mais également sur ses rythmes tidaux, lunaires et saisonniers qui ont été déjà caractérisés sur le terrain (Payton et al., 2017a; Payton and Tran, 2019; Tran et al., 2020a). Une étude *in situ* peut également permettre d'évaluer l'impact de LAN sur la physiologie de l'huitre : la croissance à l'échelle annuelle ou la ponte, deux processus qui peuvent être étudiés à l'aide de la valvométrie HFNI. L'ensemble de ces études, qu'elles se déroulent au laboratoire ou sur le terrain, permettront de mieux caractériser et comprendre les effets de LAN chez *C. gigas* et donc de trouver le moyen le plus efficace de préserver cette espèce clé des écosystèmes côtiers de la menace grandissante que constitue LAN.

En plus de *C. gigas*, il serait intéressant d'évaluer l'impact de LAN chez d'autres bivalves côtiers. Hormis les études menées ici, une seule autre s'est intéressée à l'impact de LAN chez un bivalve, la moule *Mytilus edulis*, révélant notamment une diminution de la fréquence d'ouverture et de fermeture de ses valves causée par LAN à une intensité unique et élevée (19.86 lx) (Christoforou et al., 2023). Utiliser des intensités lumineuses faibles et réalistes dans le cadre de l'étude des effets de LAN est aujourd'hui primordial, tout comme l'évaluation de l'impact de LAN via des études sur le terrain (Hölker et al., 2021). De plus, l'effet de LAN chez d'autres espèces de bivalves peut être évalué, à commencer par l'huitre plate *Ostrea edulis*, une espèce menacée dont la connaissance des effets de LAN pourrait aider à la préserver (Haelters et al., 2009). De plus, évaluer également les effets de LAN sur d'autres espèces côtières qui



forment un réseau trophique permettrait d'aller plus loin dans l'appréhension des effets de la pollution lumineuse nocturne sur la structuration des écosystèmes côtiers et de leurs biodiversités.

# Références bibliographiques

## A

- Alaasam, V.J., Kernbach, M.E., Miller, C.R., Ferguson, S.M., 2021. The Diversity of Photosensitivity and its Implications for Light Pollution. *Integr Comp Biol* 61(3), 1170-1181. 10.1093/icb/icab156
- Amaral, F.G., Castrucci, A.M., Cipolla-Neto, J., Poletini, M.O., Mendez, N., Richter, H.G., Sellix, M.T., 2014. Environmental control of biological rhythms: effects on development, fertility and metabolism. *J Neuroendocrinol* 26(9), 603-612. 10.1111/jne.12144
- Andrade, H., Massabuau, J.-C., Cochrane, S., Ciret, P., Tran, D., Sow, M., Camus, L., 2016. High Frequency Non-invasive (HFNI) Bio-Sensors As a Potential Tool for Marine Monitoring and Assessments. *Front. Mar. Sci.* 3. 10.3389/fmars.2016.00187
- Andreatta, G., Tessmar-Raible, K., 2020. The Still Dark Side of the Moon: Molecular Mechanisms of Lunar-Controlled Rhythms and Clocks. *J Mol Biol* 432(12), 3525-3546. 10.1016/j.jmb.2020.03.009
- Aschoff, J., 1960. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 25, 11-28. 10.1101/sqb.1960.025.01.004
- Aschoff, J. (1981). Freerunning and Entrained Circadian Rhythms. In *Biological Rhythms* (pp. 81-93). Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6552-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6552-9_6)
- Aube, M., 2015. Physical behaviour of anthropogenic light propagation into the nocturnal environment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370(1667). 10.1098/rstb.2014.0117
- Audino, J.A., Serb, J.M., Marian, J., 2020. Hard to get, easy to lose: Evolution of mantle photoreceptor organs in bivalves (Bivalvia, Pteriomorpha). *Evolution* 74(9), 2105-2120. 10.1111/evo.14050
- Auguste, M., Lasa, A., Balbi, T., Pallavicini, A., Vezzulli, L., Canesi, L., 2020. Impact of nanoplastics on hemolymph immune parameters and microbiota composition in *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Environ Res* 159, 105017. 10.1016/j.marenvres.2020.105017
- Ayalon, I., Rosenberg, Y., Benichou, J.I.C., Campos, C.L.D., Sayco, S.L.G., Nada, M.A.L., Baquiran, J.I.P., Ligson, C.A., Avisar, D., Conaco, C., Kuechly, H.U., Kyba, C.C.M., Cabaitan, P.C., Levy, O., 2021. Coral Gametogenesis Collapse under Artificial Light Pollution. *Curr. Biol.* 31(2), 413-419 e413. 10.1016/j.cub.2020.10.039
- Azam, C., Kerbirou, C., Vernet, A., Julien, J.F., Bas, Y., Plichard, L., Maratrat, J., Le Viol, I., 2015. Is part-night lighting an effective measure to limit the impacts of artificial lighting on bats? *Glob. Chang. Biol.* 21(12), 4333-4341. 10.1111/gcb.13036

## B

- Båtnes, A.S., Miljeteig, C., Berge, J., Greenacre, M., Johnsen, G., 2015. Quantifying the light sensitivity of *Calanus* spp. during the polar night: potential for orchestrated migrations conducted by ambient light from the sun, moon, or aurora borealis? *Polar Biology* 38(1), 51-65. 10.1007/s00300-013-1415-4
- Bauer, F., Ritter, M., Siljeg, A., Gretschel, G., Lenz, M., 2022. Effects of artificial light at night on the feeding behaviour of three marine benthic grazers from the Adriatic Sea are species-specific and mostly short-lived. *Mar. Pollut. Bull.* 185(Pt B), 114303. 10.1016/j.marpolbul.2022.114303

- Bell-Pedersen, D., Cassone, V.M., Earnest, D.J., Golden, S.S., Hardin, P.E., Thomas, T.L., Zoran, M.J., 2005. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat. Rev. Genet.* 6(7), 544-556. 10.1038/nrg1633
- Bernard, I., Massabuau, J.C., Ciret, P., Sow, M., Sottolichio, A., Pouvreau, S., Tran, D., 2016. In situ spawning in a marine broadcast spawner, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Timing and environmental triggers. *Limnol. Oceanogr.* 61(2), 635-647. 10.1002/lno.10240
- Bhadra, U., Thakkar, N., Das, P., Pal Bhadra, M., 2017. Evolution of circadian rhythms: from bacteria to human. *Sleep Med* 35, 49-61. 10.1016/j.sleep.2017.04.008
- Bierman, A., 2012. Will switching to LED outdoor lighting increase sky glow? *Light. Res. Technol.* 44(4), 449-458. 10.1177/1477153512437147
- Bingham, C., Arbogast, B., Guillaume, G.C., Lee, J.K., Halberg, F., 1982. Inferential statistical methods for estimating and comparing cosinor parameters. *Chronobiologia* 9, 397-439.
- Bolton, D., Mayer-Pinto, M., Clark, G.F., Dafforn, K.A., Brassil, W.A., Becker, A., Johnston, E.L., 2017. Coastal urban lighting has ecological consequences for multiple trophic levels under the sea. *Sci Total Environ* 576, 1-9. 10.1016/j.scitotenv.2016.10.037
- Botté, A., Payton, L., Tran, D., The effects of Artificial Light at Night on behavioral rhythm and related gene expression are wavelength dependent in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environ. Sci. Pollut. Res. (In press)*.
- Botté, A., Payton, L., Tran, D., 2023a. Artificial light at night at environmental intensities disrupts daily rhythm of the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Pollut. Bull.* 191, 114850. 10.1016/j.marpolbul.2023.114850
- Botté, A., Payton, L., Lefeuvre, E., Tran, D., 2023b. Is part-night lighting a suitable mitigation strategy to limit ALAN's effects on the biological rhythm at the behavioral and molecular scales of the oyster *Crassostrea gigas*? *Sci. Total Environ.* 905, 167052. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167052>
- Bradshaw, W.E., Holzapfel, C.M., 2010. Light, time, and the physiology of biotic response to rapid climate change in animals. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 147-166. 10.1146/annurev-physiol-021909-135837
- Brayley, O., How, D.M., Wakefield, D.A., 2022. Biological Effects of Light Pollution on Terrestrial and Marine Organisms. *Int. J. Sustain. Light.* 24(1), 13-38. 10.26607/ijsl.v24i1.121
- Bruce-White, C., Shardlow, M. Trust, B.T.I.C., 2011. A Review of the Impact of Artificial Light on Invertebrates.
- Bruning, A., Holker, F., Franke, S., Kleiner, W., Kloas, W., 2016. Impact of different colours of artificial light at night on melatonin rhythm and gene expression of gonadotropins in European perch. *Sci Total Environ* 543(Pt A), 214-222. 10.1016/j.scitotenv.2015.11.023
- Bruning, A., Kloas, W., Preuer, T., Holker, F., 2018a. Influence of artificially induced light pollution on the hormone system of two common fish species, perch and roach, in a rural habitat. *Conserv. Physiol.* 6(1), coy016. 10.1093/conphys/coy016
- Bruning, A., Holker, F., Franke, S., Kleiner, W., Kloas, W., 2018b. Influence of light intensity and spectral composition of artificial light at night on melatonin rhythm and mRNA expression of gonadotropins in roach *Rutilus rutilus*. *Fish. Physiol. Biochem.* 44(1), 1-12. 10.1007/s10695-017-0408-6
- Brzezinski, A., Rai, S., Purohit, A., Pandi-Perumal, S.R., 2021. Melatonin, Clock Genes, and Mammalian Reproduction: What Is the Link? *Int J Mol Sci* 22(24). 10.3390/ijms222413240

- Burioli, E.A.V., Squadrone, S., Stella, C., Foglini, C., Abete, M.C., Prearo, M., 2017. Trace element occurrence in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from coastal marine ecosystems in Italy. *Chemosphere* 187, 248-260. 10.1016/j.chemosphere.2017.08.102
- Burt, C.S., Kelly, J.F., Trankina, G.E., Silva, C.L., Khalighifar, A., Jenkins-Smith, H.C., Fox, A.S., Fristrup, K.M., Horton, K.G., 2023. The effects of light pollution on migratory animal behavior. *Trends Ecol. Evol.* 38(4), 355-368. 10.1016/j.tree.2022.12.006

## C

- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13(7), 581-583. 10.1038/nmeth.3869
- Cermakian, N., Sassone-Corsi, P., 2000. Multilevel regulation of the circadian clock. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1(1), 59-67. 10.1038/35036078
- Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L.O., van der Horst, G.T., Batschauer, A., Ahmad, M., 2011. The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 335-364. 10.1146/annurev-arplant-042110-103759
- Chepesiuk, R., 2009. Missing the dark: health effects of light pollution. *Environ Health Perspect* 117(1), A20-27. 10.1289/ehp.117-a20
- Christoforou, E., 2022. Effects of microfiber and light pollution on coastal ecosystem services provided by the blue mussel, *Mytilus edulis*. University of Glasgow. <https://theses.gla.ac.uk/82885/>
- Christoforou, E., Dominoni, D., Lindström, J., Diamantopoulou, C., Czyzewski, J., Mirzai, N., Spatharis, S., 2023. The effects of artificial light at night (ALAN) on the gaping activity and feeding of mussels. 10.1101/2023.03.10.532051
- Cinzano, P., Falchi, F., Elvidge, C.D., 2001. The first World Atlas of the artificial night sky brightness. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society* 328(3), 689-707. 10.1046/j.1365-8711.2001.04882.x
- Clerissi, C., de Lorgeril, J., Petton, B., Lucasson, A., Escoubas, J.M., Gueguen, Y., Degremont, L., Mitta, G., Toulza, E., 2020. Microbiota Composition and Evenness Predict Survival Rate of Oysters Confronted to Pacific Oyster Mortality Syndrome. *Front Microbiol* 11, 311. 10.3389/fmicb.2020.00311
- Cox, D.T.C., Sanchez de Miguel, A., Bennie, J., Dzurjak, S.A., Gaston, K.J., 2022. Majority of artificially lit Earth surface associated with the non-urban population. *Sci Total Environ* 841, 156782. 10.1016/j.scitotenv.2022.156782
- Cox, K.H., Takahashi, J.S., 2019. Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism. *J Mol Endocrinol* 63(4), R93-R102. 10.1530/JME-19-0153
- Crnko, S., Du Pre, B.C., Sluijter, J.P.G., Van Laake, L.W., 2019. Circadian rhythms and the molecular clock in cardiovascular biology and disease. *Nat Rev Cardiol* 16(7), 437-447. 10.1038/s41569-019-0167-4
- Cronin, T.W., Johnsen, S., 2016. Extraocular, Non-Visual, and Simple Photoreceptors: An Introduction to the Symposium. *Integr Comp Biol* 56(5), 758-763. 10.1093/icb/icw106
- Curtis, A.M., Bellet, M.M., Sassone-Corsi, P., O'Neill, L.A., 2014. Circadian clock proteins and immunity. *Immunity* 40(2), 178-186. 10.1016/j.immuni.2014.02.002

Czarnecka, M., Kobak, J., Grubisic, M., Kakareko, T., 2021. Disruptive effect of artificial light at night on leaf litter consumption, growth and activity of freshwater shredders. *Sci. Total. Environ.* 786, 147407. 10.1016/j.scitotenv.2021.147407

## D

- Da Silva, A., Valcu, M., Kempenaers, B., 2015. Light pollution alters the phenology of dawn and dusk singing in common European songbirds. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370(1667). 10.1098/rstb.2014.0126
- Dacke, M., Baird, E., Byrne, M., Scholtz, C.H., Warrant, E.J., 2013. Dung beetles use the Milky Way for orientation. *Curr Biol* 23(4), 298-300. 10.1016/j.cub.2012.12.034
- Dananay, K.L., Benard, M.F., 2018. Artificial light at night decreases metamorphic duration and juvenile growth in a widespread amphibian. *Proc. Biol. Sci.* 285(1882). 10.1098/rspb.2018.0367
- Davies, T.W., Duffy, J.P., Bennie, J., Gaston, K.J., 2014. The nature, extent, and ecological implications of marine light pollution. *Front. Ecol. Environ.* 12(6), 347-355. 10.1890/130281
- Davies, T.W., Coleman, M., Griffith, K.M., Jenkins, S.R., 2015. Night-time lighting alters the composition of marine epifaunal communities. *Biol Lett* 11(4), 20150080. 10.1098/rsbl.2015.0080
- Davies, T.W., Duffy, J.P., Bennie, J., Gaston, K.J., 2016. Stemming the Tide of Light Pollution Encroaching into Marine Protected Areas. *Conserv. Lett.* 9(3), 164-171. 10.1111/conl.12191
- Davies, T.W., Bennie, J., Cruse, D., Blumgart, D., Inger, R., Gaston, K.J., 2017. Multiple night-time light-emitting diode lighting strategies impact grassland invertebrate assemblages. *Glob. Chang. Biol.* 23(7), 2641-2648. 10.1111/gcb.13615
- Davies, T.W., Smyth, T., 2018. Why artificial light at night should be a focus for global change research in the 21st century. *Glob. Chang. Biol.* 24(3), 872-882. 10.1111/gcb.13927
- Davies, T.W., Levy, O., Tidau, S., de Barros Marangoni, L.F., Wiedenmann, J., D'Angelo, C., Smyth, T., 2023. Global disruption of coral broadcast spawning associated with artificial light at night. *Nat Commun* 14(1), 2511. 10.1038/s41467-023-38070-y
- Davis, N.M., Proctor, D.M., Holmes, S.P., Relman, D.A., Callahan, B.J., 2018. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome* 6(1), 226. 10.1186/s40168-018-0605-2
- Day, J., Baker, J., Schofield, H., Mathews, F., Gaston, K.J., 2015. Part-night lighting: implications for bat conservation. *Anim. Conserv.* 18(6), 512-516. 10.1111/acv.12200
- de Lorgetil, J., Lucasson, A., Petton, B., Toulza, E., Montagnani, C., Clerissi, C., Vidal-Dupiol, J., Chaparro, C., Galinier, R., Escoubas, J.M., Haffner, P., Degremont, L., Charriere, G.M., Lafont, M., Delort, A., Vergnes, A., Chiarello, M., Faury, N., Rubio, T., Leroy, M.A., Perignon, A., Regler, D., Morga, B., Alunno-Bruscia, M., Boudry, P., Le Roux, F., Destoumieux-Garzomicronn, D., Gueguen, Y., Mitta, G., 2018. Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. *Nat Commun* 9(1), 4215. 10.1038/s41467-018-06659-3
- de Winter, N.J., Killam, D., Fröhlich, L., de Nooijer, L., Boer, W., Schöne, B.R., Thébault, J., Reichart, G.-J., 2023. Ultradian rhythms in shell composition of photosymbiotic and

- non-photosymbiotic mollusks. *Biogeosciences* 20(14), 3027-3052. 10.5194/bg-20-3027-2023
- Depledge, M.H., Godard-Codding, C.A., Bowen, R.E., 2010. Light pollution in the sea. *Mar Pollut Bull* 60(9), 1383-1385. 10.1016/j.marpolbul.2010.08.002
- DiLaura, D., 2008. A Brief History of Lighting. *Optics and Photonics News* 19(9). 10.1364/opn.19.9.000022
- Doi, M., Hirayama, J., Sassone-Corsi, P., 2006. Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell* 125(3), 497-508. 10.1016/j.cell.2006.03.033
- Duarte, C., Quintanilla-Ahumada, D., Anguita, C., Manriquez, P.H., Widdicombe, S., Pulgar, J., Silva-Rodriguez, E.A., Miranda, C., Manriquez, K., Quijon, P.A., 2019. Artificial light pollution at night (ALAN) disrupts the distribution and circadian rhythm of a sandy beach isopod. *Environ Pollut* 248, 565-573. 10.1016/j.envpol.2019.02.037
- Dunlap, J.C., 1999. Molecular Bases for Circadian Clocks. *Cell* 96(2), 271-290. 10.1016/s0092-8674(00)80566-8

## E

- Elvidge, C.D., Baugh, K.E., Kihn, E.A., Kroehl, H.W., Davis, E.R., 1997. Mapping city lights with nighttime data from the DMSP operational linescan system. *Photogramm Eng Rem S* 63(6), 727-734. [Go to ISI://WOS:A1997XC40700009](https://www.isi.edu/WOS:A1997XC40700009)
- Elvidge, C.D., Baugh, K.E., Zhizhin, M., Hsu, F.-C., 2013. Why VIIRS data are superior to DMSP for mapping nighttime lights. *Proceedings of the Asia-Pacific Advanced Network* 35(0). 10.7125/apan.35.7
- Elvidge, C.D., Hsu, F.C., Baugh, K.E., Ghosh, T. (2014). National Trends in Satellite-Observed Lighting: 1992–2012. In *Global Urban Monitoring and Assessment through Earth Observation* (pp. 24).
- Emerson, K.J., Bradshaw, W.E., Holzapfel, C.M., 2008. Concordance of the circadian clock with the environment is necessary to maximize fitness in natural populations. *Evolution* 62(4), 979-983. 10.1111/j.1558-5646.2008.00324.x
- Enríquez-Díaz, M., Pouvreau, S., Chávez-Villalba, J., Le Pennec, M., 2008. Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquac. Int.* 17(5), 491-506. 10.1007/s10499-008-9219-1

## F

- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., Pouvreau, S., 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture* 250(1-2), 458-470. 10.1016/j.aquaculture.2005.02.038
- Fadrosh, D.W., Ma, B., Gajer, P., Sengamalay, N., Ott, S., Brotman, R.M., Ravel, J., 2014. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome* 2(1), 6. 10.1186/2049-2618-2-6
- Falchi, F., Cinzano, P., Elvidge, C.D., Keith, D.M., Haim, A., 2011. Limiting the impact of light pollution on human health, environment and stellar visibility. *J Environ Manage* 92(10), 2714-2722. 10.1016/j.jenvman.2011.06.029

- Falchi, F., Cinzano, P., Duriscoe, D., Kyba, C.C., Elvidge, C.D., Baugh, K., Portnov, B.A., Rybnikova, N.A., Furgoni, R., 2016. The new world atlas of artificial night sky brightness. *Sci Adv* 2(6), e1600377. 10.1126/sciadv.1600377
- Falcon, J., Torriglia, A., Attia, D., Vienot, F., Gronfier, C., Behar-Cohen, F., Martinsons, C., Hicks, D., 2020. Exposure to Artificial Light at Night and the Consequences for Flora, Fauna, and Ecosystems. *Front Neurosci* 14, 602796. 10.3389/fnins.2020.602796
- FAO. 2016. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Cultured Aquatic Species Information Programme *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793).
- Fobert, E.K., Burke da Silva, K., Swearer, S.E., 2019. Artificial light at night causes reproductive failure in clownfish. *Biol. Lett.* 15(7), 20190272. 10.1098/rsbl.2019.0272
- Froland Steindal, I.A., Whitmore, D., 2019. Circadian Clocks in Fish-What Have We Learned so far? *Biology (Basel)* 8(1). 10.3390/biology8010017

## G

- Gachon, F., Nagoshi, E., Brown, S.A., Ripperger, J., Schibler, U., 2004. The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology. *Chromosoma* 113(3), 103-112. 10.1007/s00412-004-0296-2
- Gallaway, T., Olsen, R.N., Mitchell, D.M., 2010. The economics of global light pollution. *Ecological Economics* 69(3), 658-665. 10.1016/j.ecolecon.2009.10.003
- García-March, J.R., Sanchís Solsona, M.Á., García-Carrascosa, A.M., 2007. Shell gaping behaviour of *Pinna nobilis* L., 1758: circadian and circalunar rhythms revealed by in situ monitoring. *Marine Biology* 153(4), 689-698. 10.1007/s00227-007-0842-6
- Garratt, M.J., Jenkins, S.R., Davies, T.W., 2019. Mapping the consequences of artificial light at night for intertidal ecosystems. *Sci Total Environ* 691, 760-768. 10.1016/j.scitotenv.2019.07.156
- Garrett, J.K., Donald, P.F., Gaston, K.J., 2019. Skyglow extends into the world's Key Biodiversity Areas. *Animal Conservation* 23(2), 153-159. 10.1111/acv.12480
- Gaston, K.J., Davies, T.W., Bennie, J., Hopkins, J., 2012. Reducing the ecological consequences of night-time light pollution: options and developments. *J. Appl. Ecol.* 49(6), 1256-1266. 10.1111/j.1365-2664.2012.02212.x
- Gaston, K.J., Bennie, J., Davies, T.W., Hopkins, J., 2013. The ecological impacts of nighttime light pollution: a mechanistic appraisal. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 88(4), 912-927. 10.1111/brv.12036
- Gaston, K.J., Duffy, J.P., Gaston, S., Bennie, J., Davies, T.W., 2014. Human alteration of natural light cycles: causes and ecological consequences. *Oecologia* 176(4), 917-931. 10.1007/s00442-014-3088-2
- Gaston, K.J., Bennie, J., 2014. Demographic effects of artificial nighttime lighting on animal populations. *Environ. Rev.* 22(4), 323-330. 10.1139/er-2014-0005
- Gaston, K.J., Gaston, S., Bennie, J., Hopkins, J., 2015a. Benefits and costs of artificial nighttime lighting of the environment. *Environ. Rev.* 23(1), 14-23. 10.1139/er-2014-0041
- Gaston, K.J., Duffy, J.P., Bennie, J., 2015b. Quantifying the erosion of natural darkness in the global protected area system. *Conserv. Biol.* 29(4), 1132-1141. 10.1111/cobi.12462
- Gaston, K.J., Davies, T.W., Nedelec, S.L., Holt, L.A., 2017. Impacts of Artificial Light at Night on Biological Timings. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 48(1), 49-68. 10.1146/annurev-ecolsys-110316-022745



- Gaston, K.J., 2018. Lighting up the nighttime. *Science* 362(6416), 744-746.  
10.1126/science.aau8226
- Gaston, K.J., Ackermann, S., Bennie, J., Cox, D.T.C., Phillips, B.B., Sanchez de Miguel, A., Sanders, D., 2021. Pervasiveness of Biological Impacts of Artificial Light at Night. *Integr. Comp. Biol.* 61(3), 1098-1110. 10.1093/icb/icab145
- Gaston, K.J., Sánchez de Miguel, A., 2022. Environmental Impacts of Artificial Light at Night. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 47(1), 373-398. 10.1146/annurev-environ-112420-014438
- Gerhardt, A., 2002. Bioindicator species and their use in biomonitoring. *Environmental Monitoring—Vol. I—Bioindicator Species and Their Use in Biomonitoring, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS).* .
- Glé, C., Del Amo, Y., Sautour, B., Laborde, P., Chardy, P., 2008. Variability of nutrients and phytoplankton primary production in a shallow macrotidal coastal ecosystem (Arcachon Bay, France). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 76(3), 642-656.  
10.1016/j.ecss.2007.07.043
- Goldbeter, A., 2008. Biological rhythms: clocks for all times. *Curr Biol* 18(17), R751-R753.  
10.1016/j.cub.2008.06.044
- Golombek, D.A., Rosenstein, R.E., 2010. Physiology of circadian entrainment. *Physiol. Rev.* 90(3), 1063-1102. 10.1152/physrev.00009.2009
- Gonzalez, R., Henriquez-Castillo, C., Lohrmann, K.B., Romero, M.S., Ramajo, L., Schmitt, P., Brokordt, K., 2022. The Gill Microbiota of *Argopecten purpuratus* Scallop Is Dominated by Symbiotic Campylobacterota and Upwelling Intensification Differentially Affects Their Abundance. *Microorganisms* 10(12).  
10.3390/microorganisms10122330
- Gouthiere, L., Mauvieux, B., Davenne, D., Waterhouse, J., 2005a. Complementary methodology in the analysis of rhythmic data, using examples from a complex situation, the rhythmicity of temperature in night shift workers. *Biological Rhythm Research* 36(3), 177-193. 10.1080/09291010400026298
- Gouthiere, L., Claustrat, B., Brun, J., Mauvieux, B., 2005b. Complementary methodological steps in the analysis of rhythms: search of periods, modelling. Examples of plasma melatonin and temperature curves. *Pathol Biol (Paris)* 53(5), 285-289.  
10.1016/j.patbio.2004.12.025 (Elements methodologiques complementaires dans l'analyse des rythmes: recherche de periodes, modelisation. Exemples de la Melatonine plasmatique et de courbes de temperatures.)
- Gouthière, L., Mauvieux, B., 2003. Etapes essentielles dans l'analyse des rythmes: qualité des données expérimentales, recherche de périodes par analyses spectrales de principes divers, modélisation. XXXVème Congrès Société Francoph Chronobiol, Université de Saint-Etienne.
- Grabowski, J.H., Brumbaugh, R.D., Conrad, R.F., Keeler, A.G., Opaluch, J.J., Peterson, C.H., Piehler, M.F., Powers, S.P., Smyth, A.R., 2012. Economic Valuation of Ecosystem Services Provided by Oyster Reefs. *BioScience* 62(10), 900-909.  
10.1525/bio.2012.62.10.10
- Grubisic, M., 2018. Waters under Artificial Lights: Does Light Pollution Matter for Aquatic Primary Producers? *Limnol. Oceanogr. Bull.* 27(3), 76-81. 10.1002/lob.10254
- Grubisic, M., Haim, A., Bhusal, P., Dominoni, D.M., Gabriel, K.M.A., Jechow, A., Kupprat, F., Lerner, A., Marchant, P., Riley, W., Stebelova, K., van Grunsven, R.H.A., Zeman, M., Zubidat, A.E., Hölker, F., 2019. Light Pollution, Circadian Photoreception, and Melatonin in Vertebrates. *Sustainability* 11(22). 10.3390/su11226400

Guillard, R.R.L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. In *Culture of Marine Invertebrate Animals* (pp. 29-60). [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3)

Guo, X., Hedgecock, D., Hershberger, W.K., Cooper, K., Allen, S.K., 1998. Genetic Determinants of Protandric Sex in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Evolution* 52(2). 10.2307/2411076

## H

Haelters, J., Kerckhof, F., 428. OSPAR Biodiversity Series publication, p., 2009. Background Document for *Ostrea Edulis* and *Ostrea Edulis* Beds (OSPAR Biodiversity Series publication, Issue.

Hafker, N.S., Tessmar-Raible, K., 2020. Rhythms of behavior: are the times changin'? *Curr Opin Neurobiol* 60, 55-66. 10.1016/j.conb.2019.10.005

Halberg, F., 1969. Chronobiology. *Annu Rev Physiol* 31, 675-725. 10.1146/annurev.ph.31.030169.003331

Hänel, A., Posch, T., Ribas, S.J., Aubé, M., Duriscoe, D., Jechow, A., Kollath, Z., Lolkema, D.E., Moore, C., Schmidt, N., Spoelstra, H., Wuchterl, G., Kyba, C.C.M., 2018. Measuring night sky brightness: methods and challenges. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 205, 278-290. 10.1016/j.jqsrt.2017.09.008

Heinen, R., Sanchez-Mahecha, O., Bezemer, T.M., Dominoni, D.M., Knappe, C., Kollmann, J., Kopatsch, A., Pfeiffer, Z.A., Schloter, M., Sturm, S., Schnitzler, J.-P., Vlot, A.C., Weisser, W.W., 2023. Part-night exposure to artificial light at night has more detrimental effects on aphid colonies than fully lit nights. *bioRxiv*. 10.1101/2022.10.24.513514

Helm, B., Visser, M.E., Schwartz, W., Kronfeld-Schor, N., Gerkema, M., Piersma, T., Bloch, G., 2017. Two sides of a coin: ecological and chronobiological perspectives of timing in the wild. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B., Biol. Sci.* 372(1734). 10.1098/rstb.2016.0246

Hölker, F., Moss, T., Griefahn, B., Kloas, W., Voigt, C.C., Henckel, D., Hänel, A., Kappeler, P.M., Völker, S., Schwöpe, A., Franke, S., Uhrlandt, D., Fischer, J., Klenke, R., Wolter, C., Tockner, K., 2010. The Dark Side of Light: A Transdisciplinary Research Agenda for Light Pollution Policy. *Ecol. Soc.* 15(4). 10.5751/es-03685-150413

Hölker, F., Bolliger, J., Davies, T.W., Giavi, S., Jechow, A., Kalinkat, G., Longcore, T., Spoelstra, K., Tidau, S., Visser, M.E., Knop, E., 2021. 11 Pressing Research Questions on How Light Pollution Affects Biodiversity. *Frontiers in Ecology and Evolution* 9. 10.3389/fevo.2021.767177

Hooker, J., Lintott, P., Stone, E., 2022. Lighting up our waterways: Impacts of a current mitigation strategy on riparian bats. *Environ. Pollut.* 307, 119552. 10.1016/j.envpol.2022.119552

Hornung, B.V.H., Zwittink, R.D., Kuijper, E.J., 2019. Issues and current standards of controls in microbiome research. *FEMS Microbiol Ecol* 95(5). 10.1093/femsec/fiz045

Hou, K., Wu, Z.X., Chen, X.Y., Wang, J.Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J.B., Wei, L., Li, J., Chen, Z.S., 2022. Microbiota in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther* 7(1), 135. 10.1038/s41392-022-00974-4

<http://www.ngdc.noaa.gov/dmsp/spectra.html>.

<https://darksky.org/what-we-do/international-dark-sky-places/>.

<https://observatoires-littoral.developpement-durable.gouv.fr/chiffres-cles-r9.html>.

<https://oceanexplorer.noaa.gov/explorations/04deepscope/background/deeplight/media/diagram3.html>.

Hu, Y., Zhang, Y., 2020. Global Nighttime Light Change from 1992 to 2017: Brighter and More Uniform. *Sustainability* 12(12). 10.3390/su12124905

Hussein, A.A.A., Bloem, E., Fodor, I., Baz, E.S., Tadros, M.M., Soliman, M.F.M., El-Shenawy, N.S., Koene, J.M., 2021. Slowly seeing the light: an integrative review on ecological light pollution as a potential threat for mollusks. *Environ Sci Pollut Res Int* 28(5), 5036-5048. 10.1007/s11356-020-11824-7

## J

Jechow, Hölker, 2019. Snowglow—The Amplification of Skyglow by Snow and Clouds can Exceed Full Moon Illuminance in Suburban Areas. *Journal of Imaging* 5(8). 10.3390/jimaging5080069

Jiang, J., He, Y., Kou, H., Ju, Z., Gao, X., Zhao, H., 2020. The effects of artificial light at night on Eurasian tree sparrow (*Passer montanus*): Behavioral rhythm disruption, melatonin suppression and intestinal microbiota alterations. *Ecological Indicators* 108. 10.1016/j.ecolind.2019.105702

Jones, T.M., Durrant, J., Michaelides, E.B., Green, M.P., 2015. Melatonin: a possible link between the presence of artificial light at night and reductions in biological fitness. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B., Biol. Sci.* 370(1667). 10.1098/rstb.2014.0122

Jorgensen, C.B., 1990. Bivalve Filter Feeding: Hydrodynamics, Bioenergetics, Physiology and Ecology. Olsen & Olsen.

Jou, L.-J., Lin, S.-C., Chen, B.-C., Chen, W.-Y., Liao, C.-M., 2013. Synthesis and measurement of valve activities by an improved online clam-based behavioral monitoring system. *Computers and Electronics in Agriculture* 90, 106-118. 10.1016/j.compag.2012.09.008

## K

Kaniewska, P., Alon, S., Karako-Lampert, S., Hoegh-Guldberg, O., Levy, O., 2015. Signaling cascades and the importance of moonlight in coral broadcast mass spawning. *Elife* 4. 10.7554/eLife.09991

Kesarcodi-Watson, A., Miner, P., Nicolas, J.-L., Robert, R., 2012. Protective effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*). *Aquaculture* 344-349, 29-34. 10.1016/j.aquaculture.2012.02.029

Kim, T.W., Jeong, J.H., Hong, S.C., 2015. The impact of sleep and circadian disturbance on hormones and metabolism. *Int J Endocrinol* 2015, 591729. 10.1155/2015/591729

King, W.L., Siboni, N., Kahlke, T., Dove, M., O'Connor, W., Mahbub, K.R., Jenkins, C., Seymour, J.R., Labbate, M., 2020. Regional and oyster microenvironmental scale heterogeneity in the Pacific oyster bacterial community. *FEMS Microbiol Ecol* 96(5). 10.1093/femsec/fiaa054

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glockner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and

- next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 41(1), e1. 10.1093/nar/gks808
- Koike, N., Yoo, S.H., Huang, H.C., Kumar, V., Lee, C., Kim, T.K., Takahashi, J.S., 2012. Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science* 338(6105), 349-354. 10.1126/science.1226339
- Kojima, S., Sher-Chen, E.L., Green, C.B., 2012. Circadian control of mRNA polyadenylation dynamics regulates rhythmic protein expression. *Genes Dev* 26(24), 2724-2736. 10.1101/gad.208306.112
- Kolláth, Z., 2010. Measuring and modelling light pollution at the Zselic Starry Sky Park. *Journal of Physics: Conference Series* 218. 10.1088/1742-6596/218/1/012001
- Koyanagi, M., Terakita, A., 2014. Diversity of animal opsin-based pigments and their optogenetic potential. *Biochim Biophys Acta* 1837(5), 710-716. 10.1016/j.bbabi.2013.09.003
- Kummu, M., de Moel, H., Salvucci, G., Viviroli, D., Ward, P.J., Varis, O., 2016. Over the hills and further away from coast: global geospatial patterns of human and environment over the 20th–21st centuries. *Environ. Res. Lett.* 11(3). 10.1088/1748-9326/11/3/034010
- Kupprat, F., Holker, F., Kloas, W., 2020. Can skyglow reduce nocturnal melatonin concentrations in Eurasian perch? *Environ. Pollut.* 262, 114324. 10.1016/j.envpol.2020.114324
- Kyba, C.C.M., Hänel, A., Hölker, F., 2014. Redefining efficiency for outdoor lighting. *Energy Environ. Sci.* 7(6), 1806-1809. 10.1039/c4ee00566j
- Kyba, C.C.M., Tong, K.P., Bennie, J., Birriel, I., Birriel, J.J., Cool, A., Danielsen, A., Davies, T.W., Outer, P.N., Edwards, W., Ehlert, R., Falchi, F., Fischer, J., Giacomelli, A., Giubbilini, F., Haaïma, M., Hesse, C., Heygster, G., Holker, F., Inger, R., Jensen, L.J., Kuechly, H.U., Kuehn, J., Langill, P., Lolkema, D.E., Nagy, M., Nievas, M., Ochi, N., Popow, E., Posch, T., Puschnig, J., Ruhtz, T., Schmidt, W., Schwarz, R., Schwoppe, A., Spoelstra, H., Tekatch, A., Trueblood, M., Walker, C.E., Weber, M., Welch, D.L., Zamorano, J., Gaston, K.J., 2015. Worldwide variations in artificial skyglow. *Sci. Rep.* 5, 8409. 10.1038/srep08409
- Kyba, C.C.M., Kuester, T., Sanchez de Miguel, A., Baugh, K., Jechow, A., Holker, F., Bennie, J., Elvidge, C.D., Gaston, K.J., Guanter, L., 2017a. Artificially lit surface of Earth at night increasing in radiance and extent. *Sci. Adv.* 3(11), e1701528. 10.1126/sciadv.1701528
- Kyba, C.C.M., Mohar, Posch, 2017b. How bright is moonlight? *Astron. Geophys.* 58(1), 1.31-31.32. 10.1093/astrogeo/atx025
- Kyba, C.C.M., 2018. Is light pollution getting better or worse? *Nat Astron* 2(4), 267-269. 10.1038/s41550-018-0402-7
- Kyba, C.C.M., Altintas, Y.O., Walker, C.E., Newhouse, M., 2023. Citizen scientists report global rapid reductions in the visibility of stars from 2011 to 2022. *Science* 379(6629), 265-268. 10.1126/science.abq7781

## L

- Lamphar, H., Kocifaj, M., Limon-Romero, J., Paredes-Tavares, J., Chakameh, S.D., Mego, M., Prado, N.J., Baez-Lopez, Y.A., Diez, E.R., 2022. Light pollution as a factor in

- breast and prostate cancer. *Sci Total Environ* 806(Pt 4), 150918.  
10.1016/j.scitotenv.2021.150918
- Last, K.S., Hobbs, L., Berge, J., Brierley, A.S., Cottier, F., 2016. Moonlight Drives Ocean-Scale Mass Vertical Migration of Zooplankton during the Arctic Winter. *Curr Biol* 26(2), 244-251. 10.1016/j.cub.2015.11.038
- Latchem, E., Madliger, C.L., Abrams, A.E.I., Cooke, S.J., 2021. Does Artificial Light at Night Alter the Subsequent Diurnal Behavior of a Teleost Fish? *Wat. Air and Soil Poll.* 232(2). 10.1007/s11270-021-05023-4
- Leach, W.B., Carrier, T.J., Reitzel, A.M., 2019. Diel patterning in the bacterial community associated with the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Ecol Evol* 9(17), 9935-9947. 10.1002/ece3.5534
- Leach, W.B., Reitzel, A.M., 2020. Decoupling behavioral and transcriptional responses to color in an eyeless cnidarian. *BMC Genom* 21(1), 361. 10.1186/s12864-020-6766-y
- Leone, V., Gibbons, S.M., Martinez, K., Hutchison, A.L., Huang, E.Y., Cham, C.M., Pierre, J.F., Heneghan, A.F., Nadimpalli, A., Hubert, N., Zale, E., Wang, Y., Huang, Y., Theriault, B., Dinner, A.R., Musch, M.W., Kudsk, K.A., Prendergast, B.J., Gilbert, J.A., Chang, E.B., 2015. Effects of diurnal variation of gut microbes and high-fat feeding on host circadian clock function and metabolism. *Cell Host Microbe* 17(5), 681-689. 10.1016/j.chom.2015.03.006
- Li, D., Huang, J., Zhou, Q., Gu, L., Sun, Y., Zhang, L., Yang, Z., 2022. Artificial Light Pollution with Different Wavelengths at Night Interferes with Development, Reproduction, and Antipredator Defenses of *Daphnia magna*. *Environ Sci Technol* 56(3), 1702-1712. 10.1021/acs.est.1c06286
- Li, X., Zhou, Y., 2017. Urban mapping using DMSP/OLS stable night-time light: a review. *International Journal of Remote Sensing* 38(21), 6030-6046. 10.1080/01431161.2016.1274451
- Li, Y.F., Yang, N., Liang, X., Yoshida, A., Osatomi, K., Power, D., Batista, F.M., Yang, J.L., 2018. Elevated Seawater Temperatures Decrease Microbial Diversity in the Gut of *Mytilus coruscus*. *Front Physiol* 9, 839. 10.3389/fphys.2018.00839
- Liang, X., Bushman, F.D., FitzGerald, G.A., 2015. Rhythmicity of the intestinal microbiota is regulated by gender and the host circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(33), 10479-10484. 10.1073/pnas.1501305112
- Liang, X., FitzGerald, G.A., 2017. Timing the Microbes: The Circadian Rhythm of the Gut Microbiome. *J Biol Rhythms* 32(6), 505-515. 10.1177/0748730417729066
- Lin, C., Todo, T., 2005. The cryptochromes. *Genome Biol* 6(5), 220. 10.1186/gb-2005-6-5-220
- Liu, Q., Manning, A.J., Duston, J., 2019. Light intensity and suppression of nocturnal plasma melatonin in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 228, 103-106. 10.1016/j.cbpa.2018.11.012
- Liu, Y., Yao, H., Zhou, T., Lin, Z., Dong, Y., 2021. The Discovery of Circadian Rhythm of Feeding Time on Digestive Enzymes Activity and Their Gene Expression in *Sinonovacula constricta* Within a Light/Dark Cycle. *Frontiers in Marine Science* 8. 10.3389/fmars.2021.744212
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C(T)$ ) Method. *Methods* 25(4), 402-408. 10.1006/meth.2001.1262
- Lokmer, A., Wegner, M.K., 2015. Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *ISME J* 9(3), 670-682. 10.1038/ismej.2014.160

- Longcore, T., Rich, C., 2004. Ecological light pollution. *Front. Ecol. Environ.* 2(4), 191-198. 10.1890/1540-9295(2004)002[0191:Elp]2.0.Co;2
- Longcore, T., Rich, C., 2016. Artificial night lighting and protected lands: Ecological effects and management approaches. Natural Resource Report NPS/NRSS/NSNS/NRR—2016/1213. National Park Service, F.C., Colorado.
- Longcore, T., Rodriguez, A., Witherington, B., Penniman, J.F., Herf, L., Herf, M., 2018. Rapid assessment of lamp spectrum to quantify ecological effects of light at night. *J. Exp. Zool. A: Ecol. Integr. Physiol.* 329(8-9), 511-521. 10.1002/jez.2184
- Louis, V., Besseau, L., Lartaud, F., 2022. Step in Time: Biomineralisation of Bivalve's Shell. *Frontiers in Marine Science* 9. 10.3389/fmars.2022.906085
- Luarte, T., Bonta, C.C., Silva-Rodriguez, E.A., Quijon, P.A., Miranda, C., Farias, A.A., Duarte, C., 2016. Light pollution reduces activity, food consumption and growth rates in a sandy beach invertebrate. *Environ. Pollut.* 218, 1147-1153. 10.1016/j.envpol.2016.08.068
- Ludvigsen, M., Berge, J., Geoffroy, M., Cohen, J.H., De La Torre, P.R., Nornes, S.M., Singh, H., Sorensen, A.J., Daase, M., Johnsen, G., 2018. Use of an Autonomous Surface Vehicle reveals small-scale diel vertical migrations of zooplankton and susceptibility to light pollution under low solar irradiance. *Sci Adv* 4(1), eaap9887. 10.1126/sciadv.aap9887
- Luginbuhl, C.B., Walker, C.E., Wainscoat, R.J., 2009. Lighting and astronomy. *Physics Today* 62(12), 32-37. 10.1063/1.3273014
- Luginbuhl, C.B., Boley, P.A., Davis, D.R., 2014. The impact of light source spectral power distribution on sky glow. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 139, 21-26. 10.1016/j.jqsrt.2013.12.004
- Lynn, K.D., Tummon Flynn, P., Manriquez, K., Manriquez, P.H., Pulgar, J., Duarte, C., Quijon, P.A., 2021. Artificial light at night alters the settlement of acorn barnacles on a man-made habitat in Atlantic Canada. *Mar. Pollut. Bull.* 163, 111928. 10.1016/j.marpolbul.2020.111928

## M

- Ma, Y., He, J., Sieber, M., von Frieling, J., Bruchhaus, I., Baines, J.F., Bickmeyer, U., Roeder, T., 2023. The microbiome of the marine flatworm *Macrostomum lignano* provides fitness advantages and exhibits circadian rhythmicity. *Commun Biol* 6(1), 289. 10.1038/s42003-023-04671-y
- Maggi, E., Bongiorno, L., Fontanini, D., Capocchi, A., Dal Bello, M., Giacomelli, A., Benedetti-Cecchi, L., Fox, C., 2019. Artificial light at night erases positive interactions across trophic levels. *Functional Ecology* 34(3), 694-706. 10.1111/1365-2435.13485
- Manriquez, K., Quijon, P.A., Manriquez, P.H., Miranda, C., Pulgar, J., Quintanilla-Ahumada, D., Duarte, C., 2021. Artificial Light at Night (ALAN) negatively affects the settlement success of two prominent intertidal barnacles in the southeast Pacific. *Mar. Pollut. Bull.* 168, 112416. 10.1016/j.marpolbul.2021.112416
- Manriquez, P.H., Jara, M.E., Diaz, M.I., Quijon, P.A., Widdicombe, S., Pulgar, J., Manriquez, K., Quintanilla-Ahumada, D., Duarte, C., 2019. Artificial light pollution influences behavioral and physiological traits in a keystone predator species, *Concholepas concholepas*. *Sci. Total Environ.* 661, 543-552. 10.1016/j.scitotenv.2019.01.157

- Marangoni, L.F.B., Davies, T., Smyth, T., Rodriguez, A., Hamann, M., Duarte, C., Pendoley, K., Berge, J., Maggi, E., Levy, O., 2022. Impacts of artificial light at night in marine ecosystems-A review. *Glob Chang Biol.* 10.1111/gcb.16264
- Marin, F., Le Roy, N., Marie, B., 2012. The formation and mineralization of mollusk shell. *Front Biosci (Schol Ed)* 4(3), 1099-1125. 10.2741/s321
- Marteil, L., 1976. Shellfish culture in France. Part 2. Oyster and mussel biology. *Rev. Trav. Inst. Peches Marit.* 40(2), 149–346.
- Martinez-Bakker, M., Helm, B., 2015. The influence of biological rhythms on host-parasite interactions. *Trends Ecol Evol* 30(6), 314-326. 10.1016/j.tree.2015.03.012
- Martinez Arbizu, P., 2017. *pairwiseAdonis: Pairwise multilevel comparison using adonis. R Package Version 00 1.*
- Mat, A.M., Massabuau, J.C., Ciret, P., Tran, D., 2012. Evidence for a plastic dual circadian rhythm in the oyster *Crassostrea gigas*. *Chronobiol. Int.* 29(7), 857-867. 10.3109/07420528.2012.699126
- Mat, A.M., Massabuau, J.-C., Ciret, P., Tran, D., 2014. Looking for the clock mechanism responsible for circatidal behavior in the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 161(1), 89-99. 10.1007/s00227-013-2317-2
- Mat, A.M., Perrigault, M., Massabuau, J.C., Tran, D., 2016. Role and expression of cry1 in the adductor muscle of the oyster *Crassostrea gigas* during daily and tidal valve activity rhythms. *Chronobiol. Int.* 33(8), 949-963. 10.1080/07420528.2016.1181645
- McFall-Ngai, M., Hadfield, M.G., Bosch, T.C., Carey, H.V., Domazet-Loaso, T., Douglas, A.E., Dubilier, N., Eberl, G., Fukami, T., Gilbert, S.F., Hentschel, U., King, N., Kjelleberg, S., Knoll, A.H., Kremer, N., Mazmanian, S.K., Metcalf, J.L., Neelson, K., Pierce, N.E., Rawls, J.F., Reid, A., Ruby, E.G., Rumpho, M., Sanders, J.G., Tautz, D., Wernegreen, J.J., 2013. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(9), 3229-3236. 10.1073/pnas.1218525110
- McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8(4), e61217. 10.1371/journal.pone.0061217
- Mendoza-Viveros, L., Bouchard-Cannon, P., Hegazi, S., Cheng, A.H., Pastore, S., Cheng, H.M., 2017. Molecular modulators of the circadian clock: lessons from flies and mice. *Cell Mol Life Sci* 74(6), 1035-1059. 10.1007/s00018-016-2378-8
- Menet, J.S., Pescatore, S., Rosbash, M., 2014. CLOCK:BMAL1 is a pioneer-like transcription factor. *Genes Dev* 28(1), 8-13. 10.1101/gad.228536.113
- Min, J.Y., Min, K.B., 2018. Outdoor light at night and the prevalence of depressive symptoms and suicidal behaviors: A cross-sectional study in a nationally representative sample of Korean adults. *J Affect Disord* 227, 199-205. 10.1016/j.jad.2017.10.039
- Miossec, L., Le Deuff, R.-m., Gouletquer, P., 2009. Alien Species Alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster).
- Morton, B., 1971. The diurnal rhythm and tidal rhythm of feeding and digestion in *Ostrea edulis*. *Biological Journal of the Linnean Society* 3(4), 329-342. 10.1111/j.1095-8312.1971.tb00526.x
- Morton, B.S., 1977. The tidal rhythm of feeding and digestion in the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 26(2), 135-151. 10.1016/0022-0981(77)90103-4
- Mougi, A., 2021. Diversity of biological rhythm and food web stability. *Biol. Lett.* 17(2), 20200673. 10.1098/rsbl.2020.0673
- Muscogiuri, G., Poggiogalle, E., Barrea, L., Tarsitano, M.G., Garifalos, F., Liccardi, A., Pugliese, G., Savastano, S., Colao, A., Obesity Programs of nutrition, E.R.,

Assessment, g., 2022. Exposure to artificial light at night: A common link for obesity and cancer? *Eur J Cancer* 173, 263-275. 10.1016/j.ejca.2022.06.007

## N

- Navara, K.J., Nelson, R.J., 2007. The dark side of light at night: physiological, epidemiological, and ecological consequences. *J. Pineal Res.* 43(3), 215-224. 10.1111/j.1600-079X.2007.00473.x
- Nobs, S.P., Tuganbaev, T., Elinav, E., 2019. Microbiome diurnal rhythmicity and its impact on host physiology and disease risk. *EMBO Rep* 20(4). 10.15252/embr.201847129
- Nunez, J.D., Bas, C.C., Perez Garcia, M., Ocampo, E.H., Ribeiro, P.D., Luppi, T.A., 2021. Artificial light at night may increase the predation pressure in a salt marsh keystone species. *Mar Environ Res* 167, 105285. 10.1016/j.marenvres.2021.105285

## O

- O'Connor, J.J., Fobert, E.K., Besson, M., Jacob, H., Lecchini, D., 2019. Live fast, die young: Behavioural and physiological impacts of light pollution on a marine fish during larval recruitment. *Mar Pollut Bull* 146, 908-914. 10.1016/j.marpolbul.2019.05.038
- Ochi, N., Wuchterl, G., 2014. Long-term measurement of the night sky brightness in Japan using Lightmeters: 2009-2012 data. *Journal of Tokyo University, Natural Science* 58, 1-12.
- Offret, C., Desriac, F., Le Chevalier, P., Mounier, J., Jegou, C., Fleury, Y., 2016. Spotlight on Antimicrobial Metabolites from the Marine Bacteria *Pseudoalteromonas*: Chemodiversity and Ecological Significance. *Mar Drugs* 14(7). 10.3390/md14070129
- Offret, C., Rochard, V., Laguerre, H., Mounier, J., Huchette, S., Brillet, B., Le Chevalier, P., Fleury, Y., 2019. Protective Efficacy of a *Pseudoalteromonas* Strain in European Abalone, *Haliotis tuberculata*, Infected with *Vibrio harveyi* ORM4. *Probiotics Antimicrob Proteins* 11(1), 239-247. 10.1007/s12602-018-9389-8
- Oksanen, J., Kindt, R., Legendre, P., O'Hara, B., Simpson, G., Solymos, P., Stevens, M., Wagner, H., 2008. The vegan package: community ecology package, version 1.13-1. *URL [Httpvegan R-Forge R-Proj Org](http://vegan.R-Forge.R-Project.org)* 1, 1-190.
- Oliveri, P., Fortunato, A.E., Petrone, L., Ishikawa-Fujiwara, T., Kobayashi, Y., Todo, T., Antonova, O., Arboleda, E., Zantke, J., Tessmar-Raible, K., Falciatore, A., 2014. The Cryptochrome/Photolyase Family in aquatic organisms. *Mar Genomics* 14, 23-37. 10.1016/j.margen.2014.02.001
- Orlando, L., Ortega, L., Defeo, O., 2020. Urbanization effects on sandy beach macrofauna along an estuarine gradient. *Ecological Indicators* 111. 10.1016/j.ecolind.2019.106036
- Owens, A.C.S., Cochard, P., Durrant, J., Farnworth, B., Perkin, E.K., Seymoure, B., 2020. Light pollution is a driver of insect declines. *Biological Conservation* 241. 10.1016/j.biocon.2019.108259



## P

- Paillard, C., Gueguen, Y., Wegner, K.M., Bass, D., Pallavicini, A., Vezzulli, L., Arzul, I., 2022. Recent advances in bivalve-microbiota interactions for disease prevention in aquaculture. *Curr Opin Biotechnol* 73, 225-232. 10.1016/j.copbio.2021.07.026
- Panda, S., 2016. Circadian physiology of metabolism. *Science* 354(6315), 1008-1015. 10.1126/science.aah4967
- Partch, C.L., Green, C.B., Takahashi, J.S., 2014. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell. Biol.* 24(2), 90-99. 10.1016/j.tcb.2013.07.002
- Pathirana, E., McPherson, A., Whittington, R., Hick, P., 2019. The role of tissue type, sampling and nucleic acid purification methodology on the inferred composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) microbiome. *J Appl Microbiol* 127(2), 429-444. 10.1111/jam.14326
- Pauwels, J., 2019. Light pollution & biodiversity : What are the levers of action to limit the impact of artificial lighting on nocturnal fauna ? *Museum national d'histoire naturelle*. Paris.
- Payton, L., Sow, M., Massabuau, J.C., Ciret, P., Tran, D., 2017a. How annual course of photoperiod shapes seasonal behavior of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *PLoS One* 12(10), e0185918. 10.1371/journal.pone.0185918
- Payton, L., Perrigault, M., Hoede, C., Massabuau, J.C., Sow, M., Huvet, A., Boullot, F., Fabioux, C., Hegaret, H., Tran, D., 2017b. Remodeling of the cycling transcriptome of the oyster *Crassostrea gigas* by the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Sci. Rep.* 7(1), 3480. 10.1038/s41598-017-03797-4
- Payton, L., Tran, D., 2019. Moonlight cycles synchronize oyster behaviour. *Biol. Lett.* 15(1), 20180299. 10.1098/rsbl.2018.0299
- Perrigault, M., Tran, D., 2017. Identification of the Molecular Clockwork of the Oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One* 12(1), e0169790. 10.1371/journal.pone.0169790
- Pevet, P., Balemans, M.G., Legerstee, W.C., Vivien-Roels, B., 1980. Circadian rhythmicity of the activity of hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the formation of melatonin and 5-methoxytryptophol in the pineal, retina, and hardierian gland of the golden hamster. *J. Neural. Transm.* 49(4), 229-245. 10.1007/BF01252128
- Pilorz, V., Helfrich-Forster, C., Oster, H., 2018. The role of the circadian clock system in physiology. *Pflugers Arch* 470(2), 227-239. 10.1007/s00424-017-2103-y
- Poehn, B., Krishnan, S., Zurl, M., Coric, A., Rokvic, D., Hafker, N.S., Jaenicke, E., Arboleda, E., Orel, L., Raible, F., Wolf, E., Tessmar-Raible, K., 2022. A Cryptochrome adopts distinct moon- and sunlight states and functions as sun- versus moonlight interpreter in monthly oscillator entrainment. *Nat Commun* 13(1), 5220. 10.1038/s41467-022-32562-z
- Poot, H., Ens, B.J., de Vries, H., Donners, M.A.H., Wernand, M.R., Marquenie, J.M., 2008. Green light for nocturnally migrating birds. *Ecology and Society* 13(2). <http://www.ecologyandsociety.org/vol13/iss2/art47/>
- Pulgar, J., Zeballos, D., Vargas, J., Aldana, M., Manriquez, P.H., Manriquez, K., Quijon, P.A., Widdicombe, S., Anguita, C., Quintanilla, D., Duarte, C., 2019. Endogenous cycles, activity patterns and energy expenditure of an intertidal fish is modified by artificial light pollution at night (ALAN). *Environ. Pollut.* 244, 361-366. 10.1016/j.envpol.2018.10.063

## Q

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glockner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41(Database issue), D590-596. 10.1093/nar/gks1219

## R

- Rich, C., Longcore, T. Rich, C., Longcore, T., 2006. *Ecological Consequences of Artificial Night Lighting*. Island Press.
- Riegel, K.W., 1973. Light Pollution: Outdoor lighting is a growing threat to astronomy. *Science* 179(4080), 1285-1291. 10.1126/science.179.4080.1285
- Risely, A., 2020. Applying the core microbiome to understand host-microbe systems. *J Anim Ecol* 89(7), 1549-1558. 10.1111/1365-2656.13229
- Rivas, M.L., Santidrián Tomillo, P., Diéguez Uribeondo, J., Marco, A., 2015. Leatherback hatchling sea-finding in response to artificial lighting: Interaction between wavelength and moonlight. *J Exp l Mar Biol Ecol* 463, 143-149. 10.1016/j.jembe.2014.12.001
- Roeder, T., 2020. The control of metabolic traits by octopamine and tyramine in invertebrates. *J. Exp. Biol.* 223(Pt 7). 10.1242/jeb.194282
- Ruesink, J.L., Lenihan, H.S., Trimble, A.C., Heiman, K.W., Micheli, F., Byers, J.E., Kay, M.C., 2005. Introduction of Non-Native Oysters: Ecosystem Effects and Restoration Implications. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36(1), 643-689. 10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152638
- Russart, K.L.G., Nelson, R.J., 2018. Artificial light at night alters behavior in laboratory and wild animals. *J Exp Zool A Ecol Integr Physiol* 329(8-9), 401-408. 10.1002/jez.2173

## S

- Salmon, M., Tolbert, M.G., Painter, D.P., Goff, M., Reiners, R., 1995. Behavior of Loggerhead Sea Turtles on an Urban Beach. II. Hatchling Orientation. *Journal of Herpetology* 29(4). 10.2307/1564740
- Salmon, M. (2006). Protecting sea turtles from artificial night lighting at Florida's oceanic beaches. In Rich, C., Longcore, T. (Eds.), *Ecological Consequences of Artificial Night Lighting*. Island Press.
- Sánchez de Miguel, A., Aubé, M., Zamorano, J., Kocifaj, M., Roby, J., Tapia, C., 2017. Sky Quality Meter measurements in a colour-changing world. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society* 467(3), 2966-2979. 10.1093/mnras/stx145
- Sanders, D., Gaston, K.J., 2018. How ecological communities respond to artificial light at night. *J. Exp. Zool. A. Ecol. Integr. Physiol.* 329(8-9), 394-400. 10.1002/jez.2157
- Sanders, D., Frago, E., Kehoe, R., Patterson, C., Gaston, K.J., 2021. A meta-analysis of biological impacts of artificial light at night. *Nat. Ecol. Evol.* 5(1), 74-81. 10.1038/s41559-020-01322-x

- Scargle, J.D., 1982. Studies in astronomical time series analysis. II - Statistical aspects of spectral analysis of unevenly spaced data. *Astrophys. J.* 263. 10.1086/160554
- Schubert, E.F., Kim, J.K., 2005. Solid-state light sources getting smart. *Science* 308(5726), 1274-1278. 10.1126/science.1108712
- Secondi, J., Davranche, A., Théry, M., Mondy, N., Lengagne, T., Isaac, N., 2019. Assessing the effects of artificial light at night on biodiversity across latitude – Current knowledge gaps. *Global Ecology and Biogeography* 29(3), 404-419. 10.1111/geb.13037
- Senthilan, P.R., Grebler, R., Reinhard, N., Rieger, D., Helfrich-Forster, C., 2019. Role of Rhodopsins as Circadian Photoreceptors in the *Drosophila melanogaster*. *Biology (Basel)* 8(1). 10.3390/biology8010006
- Shade, A., Handelsman, J., 2012. Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environ Microbiol* 14(1), 4-12. 10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x
- Shulkin, V.M., Presley, B.J., Kavun, V., 2003. Metal concentrations in mussel *Crenomytilus grayanus* and oyster *Crassostrea gigas* in relation to contamination of ambient sediments. *Environ Int* 29(4), 493-502. 10.1016/s0160-4120(03)00004-7
- Smith, M., 2009. Time to turn off the lights. *Nature* 457(7225), 27. 10.1038/457027a
- Smyth, T.J., Wright, A.E., McKee, D., Tidau, S., Tamir, R., Dubinsky, Z., Iluz, D., Davies, T.W., 2021. A global atlas of artificial light at night under the sea. *Elementa: Science of the Anthropocene*. 9(1). 10.1525/elementa.2021.00049
- Smyth, T.J., Wright, A.E., Edwards-Jones, A., McKee, D., Queirós, A., Rendon, O., Tidau, S., Davies, T.W., 2022. Disruption of marine habitats by artificial light at night from global coastal megacities. *Elementa: Science of the Anthropocene*. 10(1). 10.1525/elementa.2022.00042
- Steinbach, R., Perkins, C., Tompson, L., Johnson, S., Armstrong, B., Green, J., Grundy, C., Wilkinson, P., Edwards, P., 2015. The effect of reduced street lighting on road casualties and crime in England and Wales: controlled interrupted time series analysis. *J Epidemiol Community Health* 69(11), 1118-1124. 10.1136/jech-2015-206012
- Sun, Y., Wang, M., Zhong, Z., Chen, H., Wang, H., Zhou, L., Cao, L., Fu, L., Zhang, H., Lian, C., Sun, S., Li, C., 2022. Adaption to hydrogen sulfide-rich environments: Strategies for active detoxification in deep-sea symbiotic mussels, *Gigantidas platifrons*. *Sci Total Environ* 804, 150054. 10.1016/j.scitotenv.2021.150054
- Svechkina, A., Portnov, B.A., Trop, T., 2020. The impact of artificial light at night on human and ecosystem health: a systematic literature review. *Landsc. Ecol.* 35(8), 1725-1742. 10.1007/s10980-020-01053-1
- Syndicat de l'éclairage, ADEME. 2021. Rénover l'éclairage extérieur.

## T

- Tamir, R., Eyal, G., Cohen, I., Loya, Y., 2020. Effects of Light Pollution on the Early Life Stages of the Most Abundant Northern Red Sea Coral. *Microorganisms* 8(2). 10.3390/microorganisms8020193
- Tan, D.X., Hardeland, R., Manchester, L.C., Paredes, S.D., Korkmaz, A., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Fuentes-Broto, L., Reiter, R.J., 2010. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev Camb Philos Soc* 85(3), 607-623. 10.1111/j.1469-185X.2009.00118.x

- Tessmar-Raible, K., Raible, F., Arboleda, E., 2011. Another place, another timer: Marine species and the rhythms of life. *Bioessays* 33(3), 165-172. 10.1002/bies.201000096
- Thaiss, C.A., Zeevi, D., Levy, M., Zilberman-Schapira, G., Suez, J., Tengeler, A.C., Abramson, L., Katz, M.N., Korem, T., Zmora, N., Kuperman, Y., Biton, I., Gilad, S., Harmelin, A., Shapiro, H., Halpern, Z., Segal, E., Elinav, E., 2014. Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell* 159(3), 514-529. 10.1016/j.cell.2014.09.048
- Thomas, J.R., James, J., Newman, R.C., Riley, W.D., Griffiths, S.W., Cable, J., 2016. The impact of streetlights on an aquatic invasive species: Artificial light at night alters signal crayfish behaviour. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 176, 143-149. 10.1016/j.applanim.2015.11.020
- Thums, M., Whiting, S.D., Reisser, J., Pendoley, K.L., Pattiaratchi, C.B., Proietti, M., Hetzel, Y., Fisher, R., Meekan, M.G., 2016. Artificial light on water attracts turtle hatchlings during their near shore transit. *R Soc Open Sci* 3(5), 160142. 10.1098/rsos.160142
- Tidau, S., Smyth, T., McKee, D., Wiedenmann, J., D'Angelo, C., Wilcockson, D., Ellison, A., Grimmer, A.J., Jenkins, S.R., Widdicombe, S., Queirós, A.M., Talbot, E., Wright, A., Davies, T.W., 2021. Marine artificial light at night: An empirical and technical guide. *Methods in Ecology and Evolution*. 10.1111/2041-210x.13653
- Tidau, S., Whittle, J., Jenkins, S.R., Davies, T.W., 2022. Artificial light at night reverses monthly foraging pattern under simulated moonlight. *Biol. Lett.* 18(7), 20220110. 10.1098/rsbl.2022.0110
- Torres, D., Tidau, S., Jenkins, S., Davies, T., 2020. Artificial skyglow disrupts celestial migration at night. *Curr Biol* 30(12), R696-R697. 10.1016/j.cub.2020.05.002
- Touzot, M., Lefebure, T., Lengagne, T., Secondi, J., Dumet, A., Konecny-Dupre, L., Veber, P., Navratil, V., Duchamp, C., Mondy, N., 2021. Transcriptome-wide deregulation of gene expression by artificial light at night in tadpoles of common toads. *Sci Total Environ*, 151734. 10.1016/j.scitotenv.2021.151734
- Tran, D., Ciret, P., Ciutat, A., Durrieu, G., Massabuau, J.-C., 2003. Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: Application to cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(4), 914-920. 10.1002/etc.5620220432
- Tran, D., Massabuau, J.C., Garnier-Laplacet, J., 2004. Effect of carbon dioxide on uranium bioaccumulation in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(3), 739-747. 10.1897/03-75
- Tran, D., Nadau, A., Durrieu, G., Ciret, P., Parisot, J.P., Massabuau, J.C., 2011. Field chronobiology of a molluscan bivalve: how the moon and sun cycles interact to drive oyster activity rhythms. *Chronobiol. Int.* 28(4), 307-317. 10.3109/07420528.2011.565897
- Tran, D., Ciutat, A., Mat, A., Massabuau, J.C., Hegaret, H., Lambert, C., Le Goic, N., Soudant, P., 2015. The toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* disrupts daily rhythmic activities at gene transcription, physiological and behavioral levels in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 158, 41-49. 10.1016/j.aquatox.2014.10.023
- Tran, D., Perrigault, M., Ciret, P., Payton, L., 2020a. Bivalve mollusc circadian clock genes can run at tidal frequency. *Proc. Biol. Sci.* 287(1918), 20192440. 10.1098/rspb.2019.2440
- Tran, D., Andrade, H., Durier, G., Ciret, P., Leopold, P., Sow, M., Ballantine, C., Camus, L., Berge, J., Perrigault, M., 2020b. Growth and behaviour of blue mussels, a re-emerging polar resident, follow a strong annual rhythm shaped by the extreme high Arctic light regime. *R. Soc. Open Sci.* 7(10), 200889. 10.1098/rsos.200889

Tran, D., Andrade, H., Camus, L., Leopold, P., Ballantine, C., Berge, J., Durier, G., Sow, M., Ciret, P., 2023. Evidence of separate influence of moon and sun on light synchronization of mussel's daily rhythm during the polar night. *iScience* 26(3), 106168. 10.1016/j.isci.2023.106168

Troost, K., 2010. Causes and effects of a highly successful marine invasion: Case-study of the introduced Pacific oyster *Crassostrea gigas* in continental NW European estuaries. *Journal of Sea Research* 64(3), 145-165. 10.1016/j.seares.2010.02.004

## U

Underwood, C.N., Davies, T.W., Queiros, A.M., 2017. Artificial light at night alters trophic interactions of intertidal invertebrates. *J Anim Ecol* 86(4), 781-789. 10.1111/1365-2656.12670

## V

van der Schatte Olivier, A., Jones, L., Vay, L.L., Christie, M., Wilson, J., Malham, S.K., 2018. A global review of the ecosystem services provided by bivalve aquaculture. *Rev. Aquac.* 12(1), 3-25. 10.1111/raq.12301

Vezzulli, L., Stagnaro, L., Grande, C., Tassistro, G., Canesi, L., Pruzzo, C., 2018. Comparative 16SrDNA Gene-Based Microbiota Profiles of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) and the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from a Shellfish Farm (Ligurian Sea, Italy). *Microb Ecol* 75(2), 495-504. 10.1007/s00248-017-1051-6

Voigt, R.M., Summa, K.C., Forsyth, C.B., Green, S.J., Engen, P., Naqib, A., Vitaterna, M.H., Turek, F.W., Keshavarzian, A., 2016. The Circadian Clock Mutation Promotes Intestinal Dysbiosis. *Alcohol Clin Exp Res* 40(2), 335-347. 10.1111/acer.12943

## W

Wang, H., Zhang, H., Su, Y., 2022. New Insights into the Diurnal Rhythmicity of Gut Microbiota and Its Crosstalk with Host Circadian Rhythm. *Animals (Basel)* 12(13). 10.3390/ani12131677

Wegner, K.M., Volkenborn, N., Peter, H., Eiler, A., 2013. Disturbance induced decoupling between host genetics and composition of the associated microbiome. *BMC Microbiol* 13, 252. 10.1186/1471-2180-13-252

Wilcockson, D., Zhang, L., 2008. Circatidal clocks. *Curr Biol* 18(17), R753-R755. 10.1016/j.cub.2008.06.041

Witherington, B.E., Bjorndal, K.A., 1991. Influences of artificial lighting on the seaward orientation of hatchling loggerhead turtles *Caretta caretta*. *Biological Conservation* 55(2), 139-149. 10.1016/0006-3207(91)90053-c

Wu, C., Jiang, Q., Wei, L., Cai, Z., Chen, J., Yu, W., He, C., Wang, J., Guo, W., Wang, X., 2018. A Rhodopsin-Like Gene May Be Associated With the Light-Sensitivity of Adult Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Front Physiol* 9, 221. 10.3389/fphys.2018.00221

## X

Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., Zhang, B., 2012. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant. Mol. Biol.* 10.1007/s11103-012-9885-2

## Y

Yerushalmi, S., Green, R.M., 2009. Evidence for the adaptive significance of circadian rhythms. *Ecol. Lett.* 12(9), 970-981. 10.1111/j.1461-0248.2009.01343.x

## Z

Zapata, M.J., Sullivan, S.M.P., Gray, S.M., 2018. Artificial Lighting at Night in Estuaries—Implications from Individuals to Ecosystems. *Estuaries and Coasts* 42(2), 309-330. 10.1007/s12237-018-0479-3

Zhang, E.E., Liu, Y., Dentin, R., Pongsawakul, P.Y., Liu, A.C., Hirota, T., Nusinow, D.A., Sun, X., Landais, S., Kodama, Y., Brenner, D.A., Montminy, M., Kay, S.A., 2010. Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nat Med* 16(10), 1152-1156. 10.1038/nm.2214

Zhu, H., Sauman, I., Yuan, Q., Casselman, A., Emery-Le, M., Emery, P., Reppert, S.M., 2008. Cryptochromes define a novel circadian clock mechanism in monarch butterflies that may underlie sun compass navigation. *PLoS Biol* 6(1), e4. 10.1371/journal.pbio.0060004

Zielinska-Dabkowska, K.M., 2018. Make lighting healthier. *Nature* 553(7688), 274-276. 10.1038/d41586-018-00568-7

Zissis, G., Bertoldi, P., 2018. Status of LED-Lighting world market in 2017.

Zissis, G., Bertoldi, P., Serrenho, T., 2021. Update on the status of LED-lighting world market since 2018 <https://data.europa.eu/doi/10.2760/759859>

Zubidat, A.E., Haim, A., 2017. Artificial light-at-night - a novel lifestyle risk factor for metabolic disorder and cancer morbidity. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 28(4), 295-313. 10.1515/jbcpp-2016-0116

Zurl, M., Poehn, B., Rieger, D., Krishnan, S., Rokvic, D., Veedin Rajan, V.B., Gerrard, E., Schlichting, M., Orel, L., Coric, A., Lucas, R.J., Wolf, E., Helfrich-Forster, C., Raible, F., Tessmar-Raible, K., 2022. Two light sensors decode moonlight versus sunlight to adjust a plastic circadian/circalunidian clock to moon phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 119(22), e2115725119. 10.1073/pnas.2115725119

# **Annexes**

## Liste des articles scientifiques

- Botté, A., Payton, L., Tran, D., 2023a. Artificial light at night at environmental intensities disrupts daily rhythm of the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Pollut. Bull.* 191. 10.1016/j.marpolbul.2023.114850
- Botté, A., Payton, L., Lefeuvre, E., Tran, D., 2023b. Is part-night lighting a suitable mitigation strategy to limit ALAN's effects on the biological rhythm at the behavioral and molecular scales of the oyster *Crassostrea gigas*? *Sci. Total Environ.* 10.1016/j.scitotenv.2023.167052
- Botté, A., Payton, L., Tran, D.. The effects of Artificial Light at Night on behavioral rhythm and related gene expression are wavelength dependent in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 10.1007/s11356-023-30793-1
- Botté, A., Bellec, L., Payton, L., Tran, D.. Link between the robustness of diurnal behavior, the disruption of the gills microbiota, and the shell growth of the oyster *Crassostrea gigas* exposed to artificial light at night. (Soumis au journal *Sci. Total Environ.*)



## Présentations orales et posters

**Journée des doctorants de l'école doctorale Sciences et Environnements**, Pessac, France – 18/03/2021

Présentation orale : « Pollution lumineuse sur les écosystèmes marins côtiers. Impacts sur les rythmes biologiques des mollusques bivalves. »

**47<sup>ème</sup> congrès de la Société Francophone de Chronobiologie**, Talence, France – du 13 au 15/10/2021

Poster : « Impact de la pollution lumineuse sur le rythme comportemental de l'huître *Crassostrea gigas* ».

**Colloque d'Ecophysiologie Animale 5<sup>ème</sup> édition (CEPA-5)**, Montpellier, France – du 2 au 4/11/2021

Présentation orale : « Impact de la pollution lumineuse sur le rythme journalier d'ouverture valvaire de l'huître *Crassostrea gigas* ».

**Café sciences – Association 4P SHORE & SEAS**, Bordeaux, France – 10/06/2022

Présentation orale : « La pollution lumineuse sur l'écosystème marin ».

**Journée de rentrée de l'école doctorale Sciences et Environnements**, Pessac, France – 24/10/2022

Présentation orale : « Pollution lumineuse sur les écosystèmes marins côtiers. Impacts sur les rythmes biologiques des mollusques bivalves ».

**Journée de rentrée de l'école doctorale Sciences et Environnements**, Pessac, France – 18/01/2023

Présentation orale : « Caractérisation des effets d'ALAN sur l'huître. Etudes au laboratoire ».

Présentation orale : « Effets d'ALAN sur la croissance coquillière ».

**Société scientifique d'Arcachon**, Arcachon, France – 30/06/2023

Présentation orale : « Quelles sont les conséquences de la pollution lumineuse nocturne chez l'huître ? ».

**8<sup>th</sup> international conference on Artificial Light at Night (ALAN)**, Calgary, Canada – du 10 au 13/08/2023

Présentation orale : « Shedding light on ALAN's impact on marine coastal organisms. Disruption of daily rhythm and physiological consequences in the oyster *Crassostrea gigas*. ? ».

## **Activités complémentaires au travail de recherche pendant la thèse**

**Participation au Conseil de Laboratoire EPOC en tant que représentante doctorants et post-doctorants** – de 03/2021 à 10/2022

Université de Bordeaux, UMR EPOC 5805, France

**Participation au Conseil du Département des Sciences de l'environnement en tant que représentante doctorants et post-doctorants** – de 03/2021 à 10/2022

Université de Bordeaux, UMR EPOC 5805, Département des Sciences de l'environnement, France

**Monitorat en écotoxicologie (niveau licence 3, 23h)** – de 09/2021 à 12/2021

Université de Bordeaux, Unité de Formation de biologie, France

**Sujets de Projets Tuteurés (niveau master 1, 10h)** – de 10/2021 à 12/2021

Université de Bordeaux, Unité de Formation de biologie, France

**Monitorat en écotoxicologie (niveau licence 3, 32h)** – de 09/2022 à 12/2022

Université de Bordeaux, Unité de Formation de biologie, France

**Encadrement d'un stage de Licence 3** – de 05/2022 à 06/2022

Université de Bordeaux, UMR EPOC 5805, équipe Ecotoxicologie Aquatique, Arcachon, France