



# Evaluation des effets biologiques d'une anode galvanique à base d'aluminium sur les organismes marins

Alexandre Levallois

## ► To cite this version:

Alexandre Levallois. Evaluation des effets biologiques d'une anode galvanique à base d'aluminium sur les organismes marins. Biologie moléculaire. Normandie Université, 2023. Français. NNT : 2023NORMC206 . tel-04104705

**HAL Id: tel-04104705**

**<https://theses.hal.science/tel-04104705>**

Submitted on 24 May 2023

**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.



**Normandie Université**

## **THÈSE**

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS -  
INTERACTIONS**

**Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie**

### **Evaluation des effets biologiques d'une anode galvanique à base d'aluminium sur les organismes marins**

**Présentée et soutenue par  
ALEXANDRE LEVALLOIS**

**Thèse soutenue le 06/04/2023  
devant le jury composé de**

|                       |                                                                                  |                    |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| M. PHILIPPE REFAIT    | Professeur des universités, UNIVERSITE LA ROCHELLE                               | Rapporteur du jury |
| MME HELENE THOMAS     | Maître de conférences, UNIVERSITE LA ROCHELLE                                    | Rapporteur du jury |
| MME CHRISTELLE CAPLAT | Maître de conférences, Université de Caen Normandie                              | Membre du jury     |
| MME FLORENCE GERET    | Professeur des universités, INU JF Champollion - Dépt Sciences Technologie Santé | Membre du jury     |
| M. JEAN-MARC LEBEL    | Professeur des universités, Université de Caen Normandie                         | Président du jury  |
| M. ANTOINE SERPENTINI | Maître de conférences, Université de Caen Normandie                              | Directeur de thèse |

**Thèse dirigée par ANTOINE SERPENTINI (Biologie des organismes et écosystèmes  
aquatiques (Caen))**



UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,  
Santé, Environnement





Cette thèse de Doctorat a été réalisée au sein de l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EdNBISE), dans le laboratoire de Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA), à l'Université de Caen Normandie. Cette thèse a été financée par la région Normandie (RIN 100%).



UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE



## Partenariats scientifiques

Au cours de ces trois années de thèse, plusieurs partenariats scientifiques ont été impliqués dans la réalisation des expérimentations décrites dans ce manuscrit. Les locaux du SMEL (Synergie Mer & Littoral) ont été utilisés comme structure d'accueil pour les expérimentations de longue durée sur les huîtres, les ormeaux et le microphytobenthos. Au travers de la collaboration avec le Dr. Olivier BASUYAUX et de l'utilisation des infrastructures aquacoles, le SMEL était un partenaire indispensable au bon déroulement des expositions mises en place. L'agence de l'eau seine Normandie (Emmanuel JESTAIN) a participé financièrement au projet en permettant la location des salles d'expérimentations au SMEL.

Au cours de ces travaux, j'ai par ailleurs eu recours aux appareils mis à disposition au sein de la Structure Fédérative SF4206 ICORE (Interactions Cellules Organismes Environnement). La plateforme de cytométrie en flux (Laurent POULAIN, Marilyne GUILLAMIN) a rendu possible l'analyse de paramètres immunitaires chez les mollusques *via* l'utilisation du Cytoflex. La plateforme Proteogen (Joël HENRY, Benoît BERNAY) a permis de réaliser les analyses biochimiques avec le lecteur de microplaque Flexstation et enfin le CMABio3 (Didier GOUX) a contribué à la réalisation de photos en microscopie électronique.

En raison de la diversité des approches entreprises durant ces travaux, j'ai bénéficié de la collaboration du Dr. Christelle CAPLAT pour les dosages des métaux dans l'eau et dans le biote, du Dr. Katherine COSTIL pour les expérimentations sur les huîtres et les ormeaux, et enfin de Bertrand LEROY, du Pr. Pascal CLAQUIN, du Dr. Francis ORVAIN et du Dr. Baptiste VIVIER pour leur expertise sur les microalgues.







« Les humains ne sont pas le résultat final d'un progrès évolutif prédictible mais plutôt une minuscule brindille sur l'énorme buisson arborescent de la vie qui ne repousserait sûrement pas si la graine de cet arbre était mise en terre une seconde fois »

Stephen Jay Gould

# Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier le Dr. Céline Gaudin, directrice actuelle du laboratoire BOREA sur le site de Caen, pour m'avoir accueilli pendant ses trois années de thèse et qui s'est toujours montrée disponible et attentive.

Je tiens à remercier le Pr. Philippe Refait et le Dr. Hélène Thomas pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Leur expertise scientifique sur ce travail et leur participation au jury de thèse sont un honneur pour moi. Merci également au Pr. Florence Geret ainsi qu'au Pr. Jean-Marc Lebel pour avoir été examinateurs de cette thèse.

Mes plus sincères remerciements vont à mon directeur de thèse, le Dr. Antoine Serpentine, ainsi qu'au Dr. Christelle Caplat. Je pense avoir eu une chance énorme de pouvoir faire ma thèse sous votre direction. J'ai bénéficié d'un encadrement d'une très grande qualité tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Vous avez toujours été très disponibles et c'était plus qu'agréable au bon déroulement de mon doctorat. En plus de ça, vous avez toujours été très investis dans les manips. Merci Christelle d'avoir effectué les analyses des concentrations en métaux dans des milliers d'échantillons d'eau et d'organismes. J'ai conscience que cela t'a pris beaucoup de ton temps.

De la même manière je tiens à dire un grand merci au Dr. Katherine Costil qui a grandement participé à mes travaux de thèse, tant pour les manips que pour l'analyse des résultats. Merci pour ta grande expertise de l'huître, de tes relectures des papiers, de tes conseils et de ta bonne humeur. C'était un plaisir d'échanger avec toi. Merci d'avoir été toujours aussi disponible. C'était sympa d'aller sur l'estran à la pêche aux crevettes de temps en temps, moi qui étais en manque de terrain.

Je tiens également à remercier toute l'équipe du SMEL de Blainville-sur-mer : Olivier, Gwen, Laureen et Antoine. L'expérience et l'aide d'Olivier nous a permis l'installation des expositions sur les huîtres et les ormeaux dans deux salles, parfois en même temps. Merci Gwen, Laureen et Antoine pour le temps que vous avez consacré à la maintenance des huîtres et ormeaux. Un grand Merci à Laureen pour notre agréable coopération dans la rédaction de la première publication sur les ormeaux.

Merci au Pr. Pascal Claquin, responsable de l'équipe RECAP et directeur du CREC pendant une grande partie de ma thèse, qui m'a permis de réaliser une partie de mes expérimentations sur le microphytobenthos à la station marine de Luc-sur-mer. De la même façon, je remercie toute l'équipe du CREC : Maël, Maxime et Léon pour votre convivialité et votre aide quand j'en avais besoin. Merci Maël pour ton aide sur les scripts R du PAM sur lesquels j'ai galéré. Un grand merci à Léo pour le temps qu'il a consacré à m'expliquer les protocoles du dosage de la chlorophylle et à me conseiller sur certaines manips.

Merci Marilyne de m'avoir formé à l'utilisation du cytoflex au cours de mon stage de M2. Cette compétence a été très rentable étant donné les nombreuses après-midis que j'ai passé au cytomètre à passer des échantillons. La galère pour se garer par contre...

Merci à Didier Goux du CMABio pour les analyses de MEB et la qualité des photographies réalisées dans le cadre des expérimentations sur le microphytobenthos.

Evidemment je remercie l'ensemble des membres du laboratoire BOREA pour leur accueil. Je tiens à remercier le Pr. Jean-Marc Lebel pour ses précieux conseils et les riches échanges que nous avons eu. Un grand merci à Nadège pour tout le temps consacré à la préparation histologique des lames de gonades d'huîtres et d'ormeaux (plus de 1000 lames easy je pense). Merci Bertrand pour tes précieux

conseils sur la culture des microalgues et nos échanges passionnants sur la physiologie et la taxonomie des organismes photosynthétiques tellement importants dans les écosystèmes. Un grand merci aussi à Sandra et Fabienne pour toute la gestion technique des salles de manips et l'approvisionnement en cônes ! Merci Nesrine pour ton aide lors des expositions sur les microalgues.

Merci à tous les stagiaires qui m'ont aidé à un moment dans les manips ou avec qui j'ai eu l'occasion d'échanger : Julie, Grégoire, Simon et bien-sûr Manon...

Je remercie mes mentors de la jungle : Louis pour sa grande sagesse. Quentin (aka Dr. Noguès) avec qui j'ai développé ce qui s'apparente à de la camaraderie de prime abord. Angela qui était là au début de ma thèse, c'était passionnant de parler des Chondrichthyens avec toi. Et bien évidemment Dr. Vivier alias Baptou (double tenant du titre du concours de shots) : merci énormément pour ton implication dans ma thèse, on a potentiellement un papier en commun (faut le dire).

Merci à toutes les personnes de BOUREA qui ont rendu la fin de cette thèse plus qu'agréable : Hélène, Anna (Emma), Chinch (Fabian), Roberto, Elise et Natacha qui vient tout juste d'arriver. Parmi eux, mille mercis à Claire pour son aide précieuse lors des longues sessions de broyage de glandes digestives et de branchies, les dosages à la spectro et son coup de main pour la manip d'embryotoxicité. Je n'oublie pas Victor avec qui nous avons commencé cette lourde tâche qu'est le broyage des tissus de mollusques...

Obviously, je remercie mes autres potes thésards hors labo : Gazou, Saout et Niott (Dr. Capel depuis peu) avec qui j'ai beaucoup échangé sur le doctorat à l'occasion, autour d'un verre de lait. D'ailleurs, de manière générale merci à tous les doctorant(e)s et docteur(e)s d'avoir accepté de m'accorder des entretiens au BDF pour réaliser des petites vidéos sur le monde de la thèse.

Je trimballe aussi un paquet d'amis derrière moi, c'est archi long de tous les remercier alors en vrac voici : Toto (44 ans), Pedro & Tounega (les Lotus), Adri, Mr. Mouche & Lulu (les avortés), La Bougue (Despreux), Clem & son copain (Mimou) (les mariés), Wiwi, Huguette, la Pince, La Did, Antho et tous les autres que je zappe faute de capacité de stockage disponible dans ma mémoire. Merci à Franck, Clément et Léa du BDF pour les nombreuses Pintes ! Merci aussi à Corine, Patrick et Val qui m'ont encouragé et pour tous les bons moments passés avec vous pendant cette période de thèse. Check ça mon Pok.

Je remercie mes parents du fond du cœur de m'avoir donné le goût des sciences et de la biologie dès mon plus jeune âge. Je vous remercie de m'avoir toujours encouragé et soutenu dans mes projets, très éparpillés et pas toujours très aboutis. Merci à tous mes grands-parents, particulièrement ma grand-mère maternelle qui m'a beaucoup encouragé. Merci au **fraté** cela va de soi.

Et enfin mille merci Marie (i.e. amour de ma vie) pour ton investissement dans tout ce que j'ai toujours essayé d'entreprendre (genre coffrer une thèse et animer une chaîne youtube en même temps). Tes talents de graphiste m'ont aidé à la réalisation de certaines figures et posters, notamment ma super diapo de MT180 qui a porté ses fruits et que j'ai réutilisé dans ce manuscrit ! J'espère m'investir autant dans tes projets à l'avenir et te rendre la pareille.

*Banger*

# Valorisations scientifiques / Vulgarisation / Enseignement / Formations

## Publications

- **Levallois A.**, Caplat C., Basuyaux O., Lebel J.M., Laisney A., Costil K., Serpentine A. (2022). Effects of chronic exposure of metals released from the dissolution of an aluminium galvanic anode on the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 249 : 106223.
- Nivelais L., **Levallois A.**, Basuyaux O., Costil K., Lebel JM., Larssonneur S., Guichard G., Serpentine A., Caplat C. (2022). Effects on growth of juvenile abalones *Haliotis tuberculata* under chronic exposition to metals released from the dissolution of an aluminium-based galvanic anode. *Arch Environ Contam Toxicol.* doi: 10.1007/s00244-022-00975-y.
- **Levallois A.**, Costil K., Basuyaux O., Guegan C., Lebel J.M., Caplat C., Serpentine A. (2022). Comparative effects of trace metal elements released from dissolution of aluminum-based galvanic anodes, aluminum chloride, zinc chloride and their mixture on the development of Pacific oyster D-larvae, *Crassostrea gigas*. Soumis dans Environmental Science and Pollution Research (n° soumission ESPR-D-23-01556).
- **Levallois A.**, Nivelais L., Caplat C., Basuyaux O., Costil K., Serpentine A. (2022). Impact assessment of metals released by aluminium-based galvanic anode on the physiology of the abalone *Haliotis tuberculata* in a controlled environment. Soumis dans Ecotoxicology (n° soumission ID a4418537-ccd9-4831-842a-84e5f7602eb2).
- **Levallois A.**, Vivier B., Caplat C., Goux D., Orvain F., Lebel J-M., Claquin P., Chasselin L., Basuyaux O., Serpentine A. (2022). Aluminium-based galvanic anode impacts the photosynthesis of microphytobenthos and supports the bioaccumulation of metals released. Soumis dans Aquatic toxicology (n° soumission AQTOX-S-23-00007).
- **Levallois A.**, Nivelais L., Basuyaux O., Costil K., Serpentine A., Caplat C. (2022). Étude de la spéciation dans l'eau de mer de l'aluminium et du zinc libérés par la dissolution d'une anode galvanique. Soumis dans Matériaux & Techniques (n° soumission mt20220053).

## Communications orales

- **Levallois A.**, Caplat C., Basuyaux O., Laisney A., Costil K., Serpentine A. Effets de l'exposition chronique à des métaux issus de la dissolution d'une anode galvanique en aluminium chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Colloque conjoint en écotoxicologie : Réseau international francophone en écotoxicologie aquatique : EcoBIM – EcotoQ – Chapitre Saint-Laurent. 31 mai - 4 juin 2021. En visioconférence.

- **Levallois A.**, Caplat C., Basuyaux O., Laisney A., Costil K., Serpentine A. Bioaccumulation of metals released from the dissolution of an aluminium galvanic anode and potential effects on the Pacific oyster *Crassostrea gigas* – Colloque YOUNMARES. 5-8 octobre 2021. Hambourg (Allemagne).
- **Levallois A.**, Caplat C., Basuyaux O., Laisney A., Costil K., Serpentine A. Le système de protection cathodique par anodes galvaniques en aluminium : simulation en condition contrôlée d'une contamination chronique chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. XVIème Forum « Biodétérioration des Matériaux ». 21-22 octobre 2021. Cherbourg-en-Cotentin (France).

## Communications affichées

- **Levallois A.**, Caplat C., Basuyaux O., Laisney A., Costil K., Serpentine A. Effects of chronic exposure of metals from the dissolution of a galvanic aluminium anode in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* - Journées de l'école doctorale. 17-18 mai 2021. En visioconférence.
- **Levallois A.**, Caplat C., Basuyaux O., Laisney A., Costil K., Serpentine A. Le système de protection cathodique par anodes galvaniques en aluminium : simulation en condition contrôlée d'une contamination chronique chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. XVIème Forum « Biodétérioration des Matériaux ». 21-22 octobre 2021. Cherbourg-en-Cotentin (France).
- **Levallois A.**, Nivelais L., Basuyaux O., Lebel JM., Costil K., Serpentine A., Caplat C. Effects on growth of juvenile abalone *Haliotis tuberculata* under chronic exposure to metals released from the dissolution of an aluminum-based galvanic anode. Colloque PRIMO21. 22-25 mai 2022. Göteborg (Suède).

## Médiation scientifique

- Participation à l'Atelier du chercheur en 2020 (médiations auprès de collégiens et lycéens).
- Participation à « *Pint of Science* » en Mai 2021.

<https://www.youtube.com/watch?v=hD825JvNVIs&list=PLSM7SM0ijtNhOLFOZUbQFH4iW5mM3Diil>

- Article de vulgarisation pour le site internet du SMEL.

<https://www.smel.fr/2021/02/01/une-etude-sur-leffet-de-la-dissolution-des-anodes-galvaniques-en-aluminium-sur-lhuître-creuse-en-mesocosme/>

- Interview publiée dans le rapport d'activité 2021 du SMEL.
- Interview publiée dans le numéro 15 de PRISME.

<https://www.unicaen.fr/prisme-n15/>

- Participation à la finale régionale de MT180 (1<sup>er</sup> prix du jury et prix des lycéens).

<https://www.youtube.com/watch?v=NvhlA0mNnRc>

- Participation à la demi-finale nationale de MT180.

- Reportage sur France 3 : PORTRAIT. Doctorant et youtubeur, Alexandre fait découvrir au grand public la diversité du monde animal : "Je parle beaucoup d'insectes géants dans mes vidéos". Diffusé le 26/10/2022.
- Participation à Chercheurs Chercheuses 2023 (4 février) au Dôme à Caen. Conférence : « Pourquoi les insectes sont-ils au sommet du règne animal ? »

## Formations doctorales

- Parcours Recherche et Enseignement supérieur - INSPE - "Module 01 : "Pédagogies pour apprendre dans l'enseignement supérieur "
- Parcours Recherche et Enseignement supérieur - INSPE - "Module 02 : "Construire, conduire et évaluer un CM et un TD"
- Parcours Recherche et Enseignement supérieur - INSPE - "Module 03 : Voix, corps et communication professionnelle"
- Zotero un outil libre pour stocker / organiser ses ressources numériques et créer / gérer des bibliographies
- Se former aux bases de la médiation scientifique
- Mener sa thèse comme un projet
- Règles et usages de publication d'un article scientifique
- De la thèse à l'emploi : construire son projet professionnel
- Séquençage haut débit
- Imagerie/Microscopie

## Activités d'enseignement

- Enseignement en Biologie Animale (TP et TD) : L1 (UFR des Sciences, Département Biologie Sciences Terre) – 105 heures
- Enseignement en Reproduction et développement (TP) : L2 (UFR des Sciences, Département Biologie Sciences Terre) – 40 heures

## Encadrement de stages

- Antoine Laisney – Stage de Master 2 Sciences de la mer (Unicaen)
- Laureen Nivelais – Stage de fin d'études de l'Institut Agro Rennes-Angers (Rennes)

## Liste des Abréviations

|                  |                                                  |
|------------------|--------------------------------------------------|
| Al               | Aluminium                                        |
| ATP              | Adénosine triphosphate                           |
| BAF              | Bioaccumulation Factor                           |
| BFC              | Bioconcentration Factor                          |
| BSA              | Sérum albumine bovine                            |
| CAT              | Catalase                                         |
| Chl a            | Chlorophylle a                                   |
| C°               | Degrès Celsius                                   |
| CL <sub>50</sub> | Concentration létale 50                          |
| Cu               | Cuivre                                           |
| DCE              | Directive Cadre sur l'Eau                        |
| DCF              | 2',7', dichlorofluorescéine                      |
| DCFH             | Dichlorofluorescéine                             |
| DCFH-DA          | Diacétate 2',7', dichlorofluorescéine diacetate  |
| DCSMM            | Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin   |
| DHTP             | Dose hebdomadaire tolérable provisoire           |
| DO               | Densité optique                                  |
| EDTA             | Ethylenediaminetetraacetic acid                  |
| EFSA             | European Food Safety Authority                   |
| EMR              | Energies marines renouvelables                   |
| ETMs             | Eléments traces métalliques                      |
| ETRmax           | Taux de transport maximum des électrons          |
| EPS              | Substances polymériques extracellulaires         |
| Fe               | Fer                                              |
| HSP70            | Protéines de choc thermique 70                   |
| GPX              | Glutathione peroxydase                           |
| GSH              | Glutathion                                       |
| GST              | Glutathione-S-transférases                       |
| In               | Indium                                           |
| IR               | Indice de réfraction                             |
| JECFA            | Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives |
| MEB              | Microscopie électronique à balayage              |
| MDA              | Malondialdéhyde                                  |
| Mn               | Manganèse                                        |
| MPB              | Microphytobenthos                                |
| MPS              | Molluscan Physiological Saline                   |
| MT               | Métallothionéines                                |
| NQE              | Norme de qualité environnementale                |
| OMS              | Organisation mondiale de la santé                |
| PAM              | Pulse-amplitude modulation                       |
| PBS              | Phosphate-buffered saline                        |
| PC               | Protection cathodique                            |
| PCAG             | Protection Cathodique par Anode Galvanique       |
| PCCI             | Protection Cathodique par Courant Imposé         |
| PE               | Courbe production énergie                        |
| PSI              | Photosystème I                                   |

|                |                                   |
|----------------|-----------------------------------|
| PSII           | Photosystème II                   |
| Q <sub>A</sub> | Quinone A                         |
| TBT            | Tributylétains                    |
| TRRN           | Test de rétention du rouge neutre |
| ROS            | Reactive Oxygen Species           |
| SOD            | Superoxyde dismutase              |
| Si             | Silicium                          |
| Zn             | Zinc                              |



# Liste des Figures

|                                                                                                                                             |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 1 : Schéma des processus de bioaccumulation, bioconcentration, biomagnification des contaminants.....                                | 3   |
| Figure 2 : Comparaison des avantages et inconvénients des biomarqueurs et des bioindicateurs à différents.....                              | 4   |
| Figure 3 : Schéma de la dissolution d'une anode galvanique à base d'aluminium dans le milieu marin (©Marie Kerou).....                      | 5   |
| Figure 4 : Anodes galvaniques installées sur la coque et le gouvernail de navires pour les protéger de la corrosion. ....                   | 6   |
| Figure 5 : Cycle biogéochimique de l'aluminium d'après Tria et al. (2007). Magnitude de l'aluminium dissoluble.....                         | 17  |
| Figure 6 : Cycle global du zinc dans l'océan d'après Roshan et al. (2018). Les flux particuliers de Zn, Si, et P sont .....                 | 24  |
| Figure 7 : Classification des différentes classes de mollusques sous forme de polytomie.....                                                | 32  |
| Figure 8 : Quelques éléments de l'anatomie de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> . © France Naissain - Vendée Naissain. ....          | 34  |
| Figure 9 : Observation en microscopie optique des hémocytes de <i>Crassostrea gigas</i> . Photo : © A. Levallois. ....                      | 35  |
| Figure 10 : Larves D normales d'huître creuse observées au microscope (X400) 24 heures après le début de la .....                           | 38  |
| Figure 11 : Cycle de vie de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> . Hpf : hours post fertilisation ; dpf : days post fertilisation..     | 38  |
| Figure 12 : Quelques éléments de l'anatomie de de l'ormeau <i>Haliotis tuberculata</i> . En période de maturation, la gonade -              | 40  |
| Figure 13 : Représentation de trois sous-populations hémocytaires chez <i>Haliotis diversicolor</i> à partir d'analyses .....               | 41  |
| Figure 14 : Cycle de vie de l'ormeau <i>Haliotis tuberculata</i> . D'après Gaume et al. (2011).....                                         | 43  |
| Figure 15 : Cultures mères des 4 espèces de microalgues étudiée et placées dans le sas à température contrôlée .....                        | 45  |
| Figure 16 : Étapes de la formation d'un biofilm (A). Temps caractéristique de la formation du biofilm en fonction .....                     | 50  |
| Figure 17 : Schéma récapitulatif de toutes les expérimentations réalisées chez les différents organismes marins. ....                       | 53  |
| Figure 18 : Schéma du dispositif expérimental simulant la dissolution d'une anode galvanique (A). Photo du dispositif...                    | 56  |
| Figure 19 : Comparaison entre une anode galvanique neuve (à gauche) et corrodée (à droite). ....                                            | 57  |
| Figure 20 : Schéma du protocole de l'analyse des métaux dans les différents organismes étudiés. Les huîtres, .....                          | 59  |
| Figure 21 : Schéma des réponses humorales et cellulaires impliquées dans les mécanismes de défense des bivalves .....                       | 65  |
| Figure 22 : Mécanisme de la peroxydation lipidique. La peroxydation lipidique conduit à la formation de produits .....                      | 67  |
| Figure 23 : Concept de tolérance au stress limitée par l'énergie. Vert = Maintenance de l'organisme. Jaune = Activité ....                  | 68  |
| Figure 24 : Schéma montrant les grandes étapes de l'étude de l'activité phagocytaire des hémocytes par la cytométrie. ....                  | 73  |
| Figure 25 : Schéma du protocole de dissection, de broyage et d'analyse des biomarqueurs biochimiques étudiés.....                           | 75  |
| Figure 26 : Photos de microscopie optique (x400) montrant la morphologie des stades de développement de.....                                | 78  |
| Figure 27 : Scheme of the electrochemical device consisting of a galvanostat and an aluminium galvanic anode .....                          | 86  |
| Figure 28 : Bioaccumulation kinetics of aluminium and zinc for the 84 days of exposure under the 4 experimental .....                       | 92  |
| Figure 29 : Bioconcentration factors of aluminium and zinc for the 84 days of exposure under the 4 experimental .....                       | 93  |
| Figure 30 : Immune parameters of oyster hemocytes after 84 days of exposure to metals released from the dissolution -                       | 94  |
| Figure 31 : MDA (malondialdehyde) levels in the digestive gland and gills after 84 days of exposure to metals released..                    | 95  |
| Figure 32 : Glycogen content for 84 days of exposure to metals released from the dissolution of an aluminum galvanic. -                     | 95  |
| Figure 33 : The principal components analysis (PCA) of the different variables (A) and individuals (B) of the study after..                 | 96  |
| Figure 34 : Net percentages of normal development (NPN <sub>e</sub> ) (± SEM) in <i>C. gigas</i> embryo-larvae observed after 24 h.....     | 116 |
| Figure 35 : The occurrence of the various types of abnormalities affecting embryo-larval development in <i>C. gigas</i> .....               | 118 |
| Figure 36 : Concentrations of aluminium (A) and zinc (B) in abalones for the 12 weeks of exposure and 4 weeks of. ....                      | 136 |
| Figure 37 : Bioconcentration factors of aluminium (A) and zinc (B) in abalones for the 16 weeks of exposure .....                           | 137 |
| Figure 38 : Evolution of the average weight growth rate (in % d <sup>-1</sup> ± SEM) (A), the average linear growth .....                   | 139 |
| Figure 39 : Depigmentation phenomenon observed in abalones for the C4 condition after 12 weeks of exposure .....                            | 140 |
| Figure 40 : Kinetics of the different biomarkers studied in abalones during 113 days of exposure including the .....                        | 165 |
| Figure 41 : Changes in the Mean gonad Index (MGI) of abalones along the 113 days of exposure (a) and percentages ...                        | 166 |
| Figure 42 : Comparaison des profils de bioaccumulation au cours du temps de l'aluminium et du zinc issus de la .....                        | 172 |
| Figure 43 : Organisation du photosystème II (PSII) avec visualisation de la chaîne de transport des électrons .....                         | 182 |
| Figure 44 : Exemple d'une courbe production énergie (PE) avec les différents indicateurs photosynthétiques .....                            | 184 |
| Figure 45 : Pourcentage d'inhibition de croissance par rapport au témoin chez la diatomée <i>Chaetoceros calcitrans</i> .....               | 188 |
| Figure 46 : Paramètres photosynthétiques de la diatomée <i>Chaetoceros calcitrans</i> après 144 heures d'exposition .....                   | 189 |
| Figure 47 : Répartition de l'aluminium (A) et du zinc (B) entre (i) les concentrations dans le milieu (µg L <sup>-1</sup> ), (ii) les ..... | 190 |
| Figure 48 : Pourcentage d'inhibition de croissance par rapport au témoin chez la diatomée <i>Chaetoceros calcitrans</i> .....               | 191 |
| Figure 49 : Répartition de l'aluminium (A) et du zinc (B) entre (i) les concentrations dans le milieu (µg L <sup>-1</sup> ),.....           | 192 |
| Figure 50 : Pourcentage d'inhibition de croissance par rapport au témoin chez <i>Tetraselmis suecica</i> après 72 heures.....               | 193 |
| Figure 51 : Pourcentage d'inhibition de croissance par rapport au témoin chez <i>Emiliana huxleyi</i> après 72 heures.....                  | 195 |
| Figure 52 : Pourcentage d'inhibition de croissance par rapport au témoin chez <i>Isochrysis galbana</i> après 72 heures .....               | 195 |
| Figure 53 : Concentrations en aluminium (mg kg <sup>-1</sup> ) dans les macroalgues <i>Laminaria digitata</i> (± SEM).....                  | 203 |
| Figure 54 : État physiologique (Fv/Fm) de <i>Laminaria digitata</i> après 42 jours d'exposition pour les 4 conditions. ....                 | 204 |
| Figure 55 : Concentrations en aluminium (A) et en zinc (B) dans la macroalgue <i>Palmaria palmata</i> après une semaine ..                  | 205 |
| Figure 56 : Photo du système mis en place pour la croissance de <i>Ceramium tenuicorne</i> dans les boîtes de Pétri .....                   | 207 |
| Figure 57 : Taux de croissance de <i>Ceramium tenuicorne</i> après 1 semaine d'exposition pour les différentes .....                        | 208 |

|                                                                                                                                        |       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Figure 58 : Évolution de la colonisation des plaques de PVC par le microphytobenthos dans la condition témoin .....                    | 212 - |
| Figure 59 : Scanning electron microscopy observations of microphytobenthos performed after the 13 days .....                           | 223 - |
| Figure 60 : Microphytobenthic photosynthetic parameters after 13 days of exposure for the 4 experimental. ....                         | 225 - |
| Figure 61 : EPS/Chl <i>a</i> ratio of proteins (A, B and C) and carbohydrates (D, E and F) fractions according to the molecular- ..... | 226 - |
| Figure 62 : Concentration en zinc par rapport à la concentration en aluminium lors de la dissolution de l'anode .....                  | 240 - |
| Figure 63 : Le transport de l'aluminium sous sa forme Al <sup>3+</sup> à travers les membranes biologiques au moyen de .....           | 243 - |
| Figure 64 : Schéma récapitulatif des résultats des travaux de thèse. Les différents organismes étudiés dans nos.....                   | 245 - |

## Liste des Tableaux

|                                                                                                                                                           |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Tableau I : Position systématique de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> et de l'orveau européen <i>Haliotis tuberculata</i> .....                   | 32 -  |
| Tableau II : Description des stades de gamétogenèse de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> .....                                                     | 37 -  |
| Tableau III : Description des stades de gamétogenèse de l'orveau <i>Haliotis tuberculata</i> .....                                                        | 42 -  |
| Tableau IV : Position systématique des différentes espèces de microalgues étudiées au cours du projet de thèse .....                                      | 45 -  |
| Tableau V : Position systématique des différentes espèces de microalgues étudiées au cours du projet de thèse .....                                       | 48 -  |
| Tableau VI : Composition de l'anode galvanique à base d'aluminium. ....                                                                                   | 56 -  |
| Tableau VII : Attribution des coefficients en fonction des stades de gamétogenèse chez l'huître et l'orveau pour .....                                    | 77 -  |
| Table VIII : Average metal concentrations in water during the exposure period for the 4 conditions. Metals levels.....                                    | 91 -  |
| Table IX : Bioaccumulation kinetics of different elements for 0 day and after 84 days of exposure for the 4.....                                          | 93 -  |
| Table X : Aluminium and zinc concentrations measured in seawater ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) at the beginning of the exposure.....                           | 115 - |
| Table XI : Ecotoxicological parameters calculated for the embryotoxicity tests (rates abnormalities in D-shaped larvae).....                              | 117 - |
| Table XII : Aluminium and zinc concentrations measured in water ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{SEM}$ ) during the exposure period.....                   | 136 - |
| Table XIII : Ecotoxicological parameters of the weight growth rate and the linear growth calculated in juveniles.....                                     | 138 - |
| Table XIV : Averages of aluminium and zinc concentrations measured in water ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{SEM}$ ) during the 85 days.....               | 162 - |
| Table XV : Results of the different indicators calculated from the biometric data after 85 days of exposure.....                                          | 162 - |
| Tableau XVI : Synthèse des effets rapportés chez les différents mollusques étudiés au cours des travaux de thèse .....                                    | 179 - |
| Tableau XVII : Concentrations des différents éléments nutritifs nécessaires à la réalisation des trois solutions mères ...                                | 185 - |
| Tableau XVIII : Concentrations totales en aluminium et en zinc pour les différentes conditions expérimentales.....                                        | 188 - |
| Tableau XIX : Concentrations totales en aluminium et en zinc pour les différentes conditions expérimentales.....                                          | 190 - |
| Tableau XX : $\text{Cl}_{50}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) calculées pour les différentes espèces de microalgues à l'aide de régressions non linéaires.....   | 191 - |
| Tableau XXI : Paramètres photosynthétiques ( $\pm \text{SEM}$ ) de la diatomée <i>Chaetoceros calcitrans</i> après 72 heures.....                         | 192 - |
| Tableau XXII : Paramètres photosynthétiques ( $\pm \text{SEM}$ ) de <i>Tetraselmis suecica</i> , <i>Emiliana huxleyi</i> et <i>Isochrysis galbana</i> ... | 194 - |
| Tableau XXIII : Concentrations en aluminium mesurées dans l'eau ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{SEM}$ ), concentrations en aluminium .....                | 203 - |
| Tableau XXIV : Concentrations en aluminium et en zinc mesurées dans l'eau ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{SEM}$ ) et dans les algues.....                 | 205 - |
| Tableau XXV : Solutions mères de nutriments pour le test AFNOR de <i>Ceramium tenuicorne</i> . ....                                                       | 206 - |
| Tableau XXVI : Concentrations en aluminium ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) mesurées dans l'eau de mer au cours des différents essais.....                        | 207 - |
| Table XXVII : Measured concentrations of total aluminium and zinc ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{SEM}$ ) in the water during the exposure .....          | 222 - |
| Table XXVIII : Bioaccumulation and bioconcentration factors (BCF) of aluminium in microphytobenthos after 13 days..                                       | 223 - |
| Tableau XXIX : Synthèse des effets rapportés chez les différents producteurs primaires étudiés au cours des travaux...                                    | 237 - |

## Liste des Supplementary data

|                                                                                                                    |       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Supplementary data 1 : Bioaccumulation kinetics and bioconcentration factors (BCF) of aluminium and zinc .....     | 103 - |
| Supplementary data 2 : Correlation matrix performed with Pearson tests between different biomarkers .....          | 104 - |
| Supplementary data 3 : Table gathering biometric data including length (mm), width (mm), thickness (mm).....       | 105 - |
| Supplementary data 4 : Non-linear regressions (using the Hill equation) realised with the Excel® macro REGTOX..... | 123 - |
| Supplementary data 5 : Synthesis of studies on the impact of aluminum and zinc on the larval phase.....            | 124 - |
| Supplementary data 6 : Concentrations and bioconcentration factors of aluminium and zinc in abalones .....         | 147 - |
| Supplementary data 7 : Concentrations of aluminium (A) and zinc (B), and BCFs (C and D) in the algae. ....         | 148 - |

# Table des matières

|                                                                                          |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Remerciements .....                                                                      | III    |
| Valorisations scientifiques / Vulgarisation / Enseignement / Formations .....            | V      |
| Liste des Abréviations.....                                                              | VIII   |
| Liste des Figures .....                                                                  | X      |
| Liste des Tableaux .....                                                                 | XI     |
| Liste des Supplementary data .....                                                       | XI     |
| INTRODUCTION GÉNÉRALE & OBJECTIFS DE LA THÈSE.....                                       | - 1 -  |
| CHAPITRE I - État de l'art.....                                                          | - 10 - |
| 1. Impact des Anodes Galvaniques .....                                                   | - 11 - |
| 2. L'Aluminium.....                                                                      | - 14 - |
| 2.1. L'Aluminium en tant qu'élément .....                                                | - 14 - |
| 2.2. Toxicité de l'aluminium chez les organismes marins .....                            | - 18 - |
| 3. Le Zinc.....                                                                          | - 23 - |
| 3.1. Le Zinc en tant qu'élément.....                                                     | - 23 - |
| 3.2. Toxicité du zinc chez les organismes marins .....                                   | - 26 - |
| 4. Biologie des modèles d'études.....                                                    | - 31 - |
| 4.1. Les Mollusques .....                                                                | - 31 - |
| 4.2. Les Producteurs primaires.....                                                      | - 43 - |
| 5. Objectifs de la thèse .....                                                           | - 50 - |
| CHAPITRE II – Démarches expérimentales & méthodologiques .....                           | - 54 - |
| 1. Dispositif expérimental simulant la dissolution d'une anode galvanique .....          | - 55 - |
| 2. Dosage des métaux dans l'eau de mer.....                                              | - 57 - |
| 3. Dosage des métaux dans le biote.....                                                  | - 58 - |
| 4. Analyses statistiques .....                                                           | - 60 - |
| CHAPITRE III – Effets d'une anode galvanique à base d'aluminium chez les mollusques..... | - 61 - |
| 1. Introduction.....                                                                     | - 62 - |
| 2. Biomarqueurs étudiés .....                                                            | - 63 - |
| 2.1. Biomarqueurs individuels.....                                                       | - 63 - |
| 2.2. Biomarqueurs d'immunité .....                                                       | - 64 - |
| 2.3. Biomarqueurs biochimiques.....                                                      | - 67 - |
| 2.4. Biomarqueurs histologiques.....                                                     | - 69 - |
| 2.5. Embryotoxicité .....                                                                | - 70 - |
| 3. Matériels et Méthodes.....                                                            | - 71 - |
| 3.1. Organismes.....                                                                     | - 71 - |
| 3.2. Biomarqueurs individuels.....                                                       | - 71 - |

|                                                                                                                                                                                                                                                          |         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 3.3. Biomarqueurs immunitaires.....                                                                                                                                                                                                                      | - 72 -  |
| 3.4. Biomarqueurs biochimiques.....                                                                                                                                                                                                                      | - 74 -  |
| 3.5. Biomarqueurs histologiques.....                                                                                                                                                                                                                     | - 77 -  |
| 3.6. Test d'embryotoxicité.....                                                                                                                                                                                                                          | - 78 -  |
| L'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> .....                                                                                                                                                                                                           | - 80 -  |
| Article 1: Effects of chronic exposure of metals released from the dissolution of an aluminium galvanic anode on the Pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i> .....                                                                                       | - 80 -  |
| 1. Introduction.....                                                                                                                                                                                                                                     | - 83 -  |
| 2. Materials and Methods .....                                                                                                                                                                                                                           | - 85 -  |
| 3. Results .....                                                                                                                                                                                                                                         | - 91 -  |
| 4. Discussion .....                                                                                                                                                                                                                                      | - 96 -  |
| 5. Conclusion .....                                                                                                                                                                                                                                      | - 101 - |
| Article 2: Comparative effects of trace metal elements released from dissolution of aluminum-based galvanic anodes, aluminum chloride, zinc chloride and their mixture on the development of the Pacific oyster D-larvae, <i>Crassostrea gigas</i> ..... | - 107 - |
| 1. Introduction.....                                                                                                                                                                                                                                     | - 110 - |
| 2. Material and Methods.....                                                                                                                                                                                                                             | - 112 - |
| 3. Results .....                                                                                                                                                                                                                                         | - 114 - |
| 4. Discussion .....                                                                                                                                                                                                                                      | - 118 - |
| 5. Conclusion .....                                                                                                                                                                                                                                      | - 122 - |
| L'ormeau <i>Haliotis tuberculata</i> .....                                                                                                                                                                                                               | - 126 - |
| Article 3: Effects on growth of juvenile abalones <i>Haliotis tuberculata</i> under chronic exposition to metals released from the dissolution of an aluminium-based galvanic anode .....                                                                | - 126 - |
| 1. Introduction.....                                                                                                                                                                                                                                     | - 129 - |
| 2. Materials and Methods .....                                                                                                                                                                                                                           | - 131 - |
| 3. Results .....                                                                                                                                                                                                                                         | - 135 - |
| 4. Discussion .....                                                                                                                                                                                                                                      | - 140 - |
| 5. Conclusion .....                                                                                                                                                                                                                                      | - 146 - |
| Article 4: Impact assessment of metals realeased by aluminium-based galvanic anode on the physiology of the abalone <i>Haliotis tuberculata</i> in a controlled environment .....                                                                        | - 150 - |
| 1. Introduction.....                                                                                                                                                                                                                                     | - 154 - |
| 2. Materials and Methods .....                                                                                                                                                                                                                           | - 156 - |
| 3. Results .....                                                                                                                                                                                                                                         | - 161 - |
| 4. Discussion .....                                                                                                                                                                                                                                      | - 166 - |
| 5. Conclusion .....                                                                                                                                                                                                                                      | - 170 - |
| Discussion : comparaison des effets des métaux relargués par une anode galvanique à base d'aluminium chez les mollusques .....                                                                                                                           | - 171 - |

|                                                                                                                                                    |         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1. Bioaccumulation.....                                                                                                                            | - 171 - |
| 2. Croissance.....                                                                                                                                 | - 173 - |
| 3. Hémocytes, activité phagocytaire et ROS .....                                                                                                   | - 174 - |
| 4. Système lysosomal .....                                                                                                                         | - 175 - |
| 5. MDA.....                                                                                                                                        | - 176 - |
| 6. Réserves énergétiques et reproduction .....                                                                                                     | - 176 - |
| 7. Phase larvaire .....                                                                                                                            | - 177 - |
| CHAPITRE IV – Effets d’une anode galvanique à base d’aluminium chez les producteurs primaires .....                                                | - 180 - |
| 1. Introduction.....                                                                                                                               | - 181 - |
| 1.1. La photosynthèse .....                                                                                                                        | - 181 - |
| 1.2. Principe du PAM et description des paramètres photosynthétiques .....                                                                         | - 182 - |
| 2. Le Phytoplancton.....                                                                                                                           | - 184 - |
| 2.1. Méthodologie .....                                                                                                                            | - 185 - |
| 2.2. Résultats .....                                                                                                                               | - 188 - |
| 2.3. Discussion .....                                                                                                                              | - 196 - |
| 3. Les Macroalgues.....                                                                                                                            | - 201 - |
| 3.1. <i>Laminaria digitata</i> .....                                                                                                               | - 201 - |
| 3.2. <i>Palmaria palmata</i> .....                                                                                                                 | - 204 - |
| 3.3. Tests normalisés AFNOR chez <i>Ceramium tenuicorne</i> .....                                                                                  | - 205 - |
| 3.4. Discussion .....                                                                                                                              | - 208 - |
| 4. Le Microphytobenthos .....                                                                                                                      | - 211 - |
| Article 5: Aluminium-based galvanic anode impacts the photosynthesis of microphytobenthos and supports the bioaccumulation of metals released..... | - 211 - |
| Abstract .....                                                                                                                                     | - 214 - |
| 1. Introduction.....                                                                                                                               | - 215 - |
| 2. Materials and Methods .....                                                                                                                     | - 217 - |
| 3. Results .....                                                                                                                                   | - 222 - |
| 4. Discussion .....                                                                                                                                | - 226 - |
| 5. Conclusion .....                                                                                                                                | - 232 - |
| Discussion : Comparaison des effets des métaux relargués par une anode galvanique à base d’aluminium chez les producteurs primaires.....           | - 234 - |
| 1. Bioaccumulation.....                                                                                                                            | - 234 - |
| 2. Croissance.....                                                                                                                                 | - 235 - |
| 3. Photosynthèse.....                                                                                                                              | - 235 - |
| CHAPITRE V – Discussion générale .....                                                                                                             | - 238 - |
| 1. L’intérêt d’étudier la toxicité des anodes galvaniques.....                                                                                     | - 239 - |

|                                                                           |         |
|---------------------------------------------------------------------------|---------|
| 2. Bioaccumulation des métaux .....                                       | - 241 - |
| 3. Sensibilité des organismes marins étudiés aux anodes galvaniques ..... | - 243 - |
| 4. Perspectives.....                                                      | - 246 - |
| Conclusion générale .....                                                 | - 249 - |
| Bibliographie.....                                                        | - 252 - |
| Webographie.....                                                          | - 275 - |
| Annexes .....                                                             | - 276 - |
| Annexe 1 : .....                                                          | - 277 - |
| Annexe 2 : .....                                                          | - 278 - |
| Annexe 3 : .....                                                          | - 279 - |
| Annexe 4 : .....                                                          | - 280 - |
| Annexe 5 : .....                                                          | - 282 - |

## INTRODUCTION GÉNÉRALE & OBJECTIFS DE LA THÈSE

Il est indéniable que les activités humaines entraînent des modifications importantes de l'environnement terrestre. Certains scientifiques sont allés jusqu'à nommer Anthropocène l'ère géologique actuelle, étant donné qu'elle se caractérise par des signes visibles de l'influence de l'être humain sur le climat et la biosphère. Parmi la grande diversité d'habitats, les écosystèmes côtiers présentent une riche biodiversité qui s'explique par la grande variabilité des paramètres environnementaux permettant d'offrir de nombreux biotopes à la faune et la flore. Cependant, ils constituent parmi les zones soumises aux pressions les plus importantes du fait de leur anthropisation. Le transport maritime, la pêche, la conchyliculture, l'aquaculture, le dragage des sédiments, la pollution sonore ainsi que la pollution chimique constituent les principaux impacts significatifs sur l'environnement (Gourlay-Francé et al., 2010). Né de la prise de conscience de la fragilité des écosystèmes aquatiques face à la pression chimique, l'écotoxicologie est une discipline récente à l'interface des domaines de l'écologie et de la chimie, qui a pour missions tant la caractérisation de l'effets des nombreux contaminants sur les êtres vivants, que l'estimation des risques de pollution environnementale. Depuis plus d'un siècle, l'essor des activités industrielles, agricoles et domestiques participe au déversement d'un nombre croissant de substances chimiques dans l'environnement. En avril 2021, c'est 250 millions de substances chimiques qui se sont vu attribuées un numéro CAS. Deux classes majeures de contaminants sont distinguées, les éléments traces métalliques (ETMs) et les polluants organiques. Les ETMs sont des éléments naturels extraits et/ou concentrés par les activités humaines mais qui constituent les principaux polluants des eaux côtières du monde entier. Ils proviennent principalement des effluents industriels et des drainages miniers mais leurs sources sont multiples. En raison de leur persistance dans l'environnement, certains ETMs comme le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le mercure (Hg), le nickel (Ni) et le plomb (Pb), peuvent être très toxiques pour les organismes marins, même à de très faibles concentrations (Pavlaki et al., 2016). Étant très préoccupants pour l'état de santé des écosystèmes, les effets de ces métaux ont globalement été très étudiés. À l'inverse, d'autres métaux dits essentiels comme le fer (Fe), le cuivre (Cu), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le zinc (Zn) sont indispensables pour les processus biologiques à faibles concentrations, mais à fortes doses ils peuvent être toxiques pour les organismes (Calabrese and Baldwin, 2003). Les risques écotoxicologiques liés aux métaux dépendent de leur concentration, de leur forme chimique (spéciation), des transformations de cette spéciation dans et entre les compartiments de l'environnement ainsi que de la toxicité de chacune de ces formes chimiques. Quant à eux, les contaminants organiques sont présents dans l'environnement uniquement par le biais des activités et des rejets anthropiques. Beaucoup sont considérés comme préoccupants du fait de leur toxicité et de leur forte persistance dans les milieux naturels (Shahidul Islam and Tanaka, 2004).



Ces contaminants sont de nature très variée : pesticides, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), résidus pharmaceutiques ou encore polychlorobiphényles (PCB).

Les nombreux polluants peuvent engendrer des effets variés chez les organismes, affectant différentes fonctions physiologiques (cytotoxiques, génotoxiques, reprotoxiques, neurotoxiques, immunotoxiques) et aboutissant à des conséquences néfastes en termes de services écosystémiques (Renault, 2015). Si les contaminants persistent dans l'eau ou le sédiment, les organismes peuvent être amenés à les bioconcentrer dans leurs tissus. La bioconcentration est le processus par lequel une substance chimique est absorbée par un organisme à partir du milieu ambiant, uniquement par ses surfaces respiratoires et cutanées (Arnot and Gobas, 2006). On emploie le terme de bioaccumulation pour inclure toutes les voies d'exposition, notamment l'alimentation. Lorsque des organismes de niveaux trophiques supérieurs présentent des concentrations en contaminants dans leurs tissus plus élevées que leur proie, on parle alors de biomagnification (Arnot and Gobas, 2006) (Figure 1). Dans ce contexte, la pollution aquatique est considérée comme une menace environnementale non seulement pour la biodiversité marine mais aussi pour les hommes en raison de la consommation de nombreux produits issus de la pêche et/ou de l'aquaculture (Hameed et al., 2020).

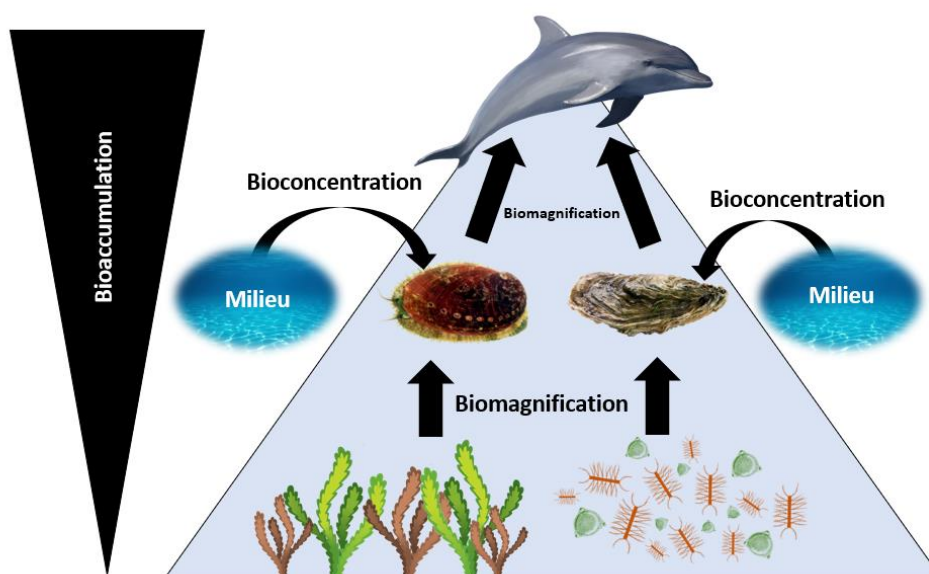


Figure 1 : Schéma des processus de bioaccumulation, bioconcentration, biomagnification des contaminants dans le milieu marin. ©A. Levallois.

La surveillance des masses d'eau implique la mise en place de descripteurs physico-chimiques et biologiques chez les espèces dites sentinelles, dont la sensibilité sert d'indicateur afin d'appréhender les changements d'un écosystème donné (Perez et al., 2000). Les réponses biologiques mesurées chez ces organismes sont appelés biomarqueurs et renseignent sur l'exposition à des contaminants ainsi que sur les potentiels effets nocifs engendrés (Galloway and Depledge, 2001). La pertinence ainsi que la sensibilité des biomarqueurs étudiés dépendent étroitement de leur échelle d'organisation ; à savoir

les niveaux infra-individuels (molécule, cellule, organe), individuels (comportement, développement, reproduction, mortalité), populationnels et communautaires (Figure 2). Les effets observables à un niveau d'organisation sont généralement précédés de changements plus précoces à un niveau inférieur. Le biomarqueur étudié doit préférentiellement être lié à des fonctions importantes comme la croissance, la reproduction ou le système immunitaire (Depledge and Fossi, 1994).

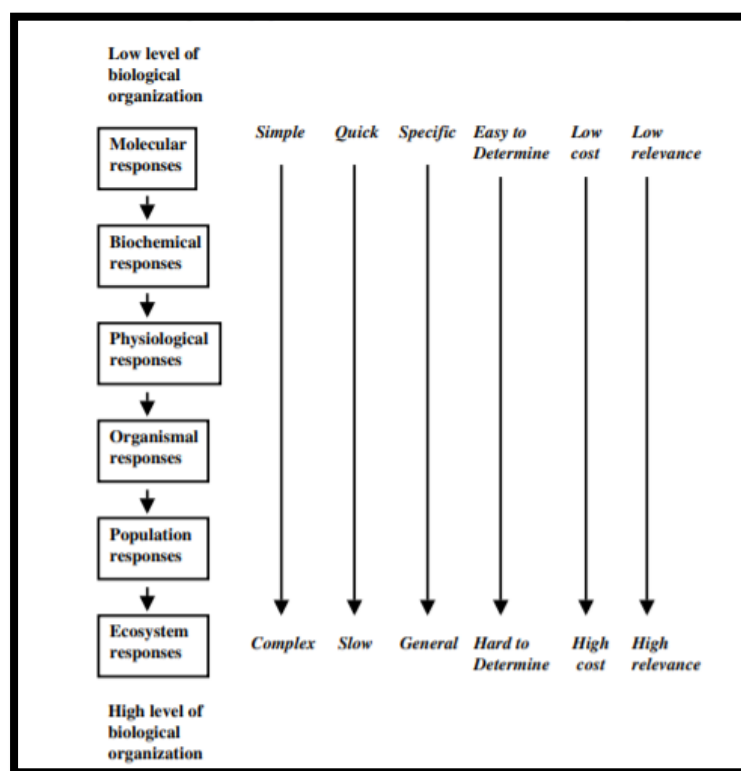


Figure 2 : Comparaison des avantages et inconvénients des biomarqueurs et des bioindicateurs à différents niveaux d'organisation biologiques. D'après Lam (2009).

**L'usage et l'intérêt des biomarqueurs sont devenus incontournables surtout depuis que l'Union Européenne a mis en place une politique de surveillance et de gestion des eaux continentales (Directive Cadre sur l'Eau) et marines (Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin) ayant pour objectif d'atteindre un bon état écologique des masses d'eau et des écosystèmes.** Afin de prévenir et de réduire la pollution des eaux, les concentrations dans le milieu sont comparées à une Norme de Qualité Environnementale (NQE), définie comme la « concentration d'un polluant ou d'un groupe de polluants dans l'eau, les sédiments ou le biote qui ne doit pas être dépassée, afin de protéger la santé humaine et l'environnement » (Chochois and Migné-Fouillen, 2011). Les NQE sont utilisés dans le cadre de l'évaluation de l'état chimique aussi bien au niveau européen qu'au niveau national.

Parmi les anthropo-constructions affectant la biodiversité, le fonctionnement et la résilience des milieux aquatiques, les structures en acier immergées en mer suscitent un intérêt particulier. En effet, l'environnement marin étant un milieu très corrosif, l'installation de structures métalliques

immergées en mer implique la mise en place de systèmes de protection cathodique (PC) afin de lutter contre la corrosion. La PC est une technique de contrôle de la corrosion d'une surface métallique qui transforme cette surface en la cathode d'une cellule électrochimique (Roche, 2015). Il s'agit d'un système de prévention électrochimique basé sur la diminution du potentiel de corrosion jusqu'à un niveau où la vitesse de corrosion du métal est réduite de manière significative. La protection cathodique est obtenue par l'application d'une tension capable de fournir un courant cathodique suffisant à la surface métallique pour diminuer son potentiel à un niveau correspondant à une vitesse de corrosion résiduelle suffisamment faible pour l'application concernée. Il existe deux types de PC pour prévenir de la corrosion dans l'environnement marin. La *Protection Cathodique par Courant Imposé* (PCCI) qui implique l'application d'un courant externe *via* un générateur de courant continu branché entre l'ouvrage à protéger et une ou des anodes auxiliaires utilisant tout matériau conducteur d'électricité (Roche, 2015). Ces anodes sont constituées d'acier ou de matériaux semi-inerte comme le graphite ou la magnétite ou encore de matériaux inertes comme le titane platiné. L'autre type de PC est la *Protection Cathodique par Anode Galvanique* (PCAG) impliquant des anodes faites d'un alliage métallique dont le potentiel électrochimique est inférieur à celui de l'ouvrage à protéger. L'anode galvanique est délibérément forcée de se corroder, elle subit une oxydation et libère divers métaux sous forme d'ions ou d'oxy-hydroxydes dans l'eau de mer ce qui interroge sur l'impact du relargage d'ETMs dans l'environnement (Figure 3). Les alliages métalliques constituant les anodes galvaniques sont constitués majoritairement d'un métal qui peut être l'aluminium, le zinc ou le magnésium.

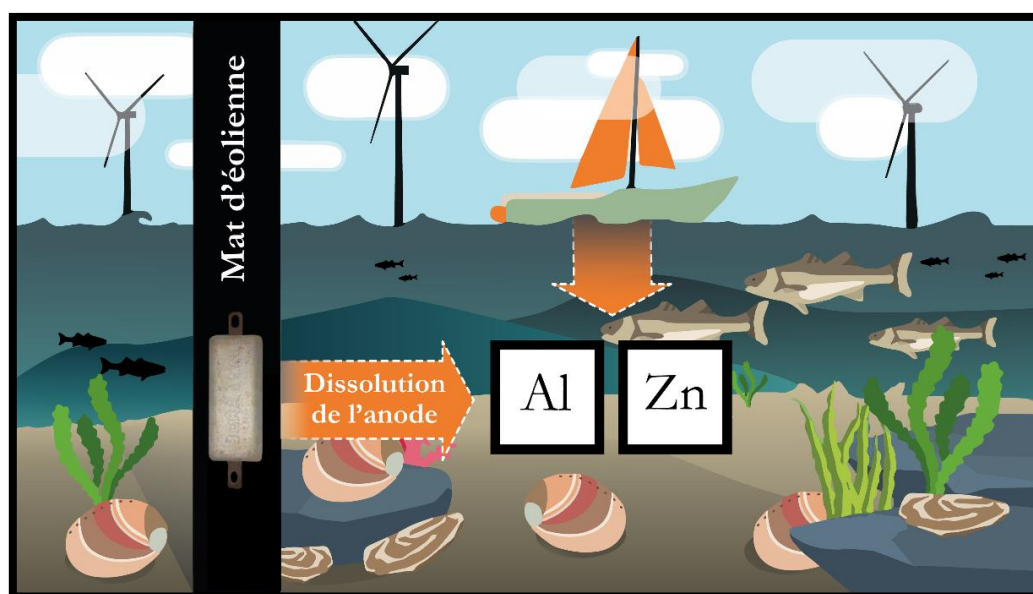


Figure 3 : Schéma de la dissolution d'une anode galvanique à base d'aluminium dans le milieu marin (©Marie Kerou).

Historiquement, le phénomène de corrosion métallique est décrit pour la première fois en 1792 par le chimiste Giovanni Fabbroni. Quelques années plus tard, le physicien Alessandro Volta décrit les principes de l'effet d'un courant électrique continu sur l'oxydation des métaux. La première

utilisation de PC est relatée par Humphrey Davy. Ce dernier témoigne des effets bénéfiques du zinc, de l'étain ou du fer sur la corrosion du cuivre dans l'eau de mer. C'est en 1824, sur un navire de l'Amirauté Britannique disposant d'un fond en cuivre que sont installées les premières anodes. Par la suite, dans les années 1920, les américains emploient des anodes pour protéger les pipelines enterrés et c'est seulement lors de la seconde Guerre Mondiale que commencent à émerger les véritables applications industrielles de la PC (Site internet : Cefracor : Les origines de la protection cathodique). L'utilisation d'anodes galvaniques à base d'aluminium est pratiquée depuis le début des années 1960 (Barbucci et al., 1997; Roy, 1968). L'aluminium est plus généralement utilisé en milieu marin et dans les ports pour protéger les structures en raison de son efficacité théorique supérieure et de ses propriétés, comme une faible densité, un grand équivalent électrochimique, sa disponibilité et son coût raisonnable (Roy, 1968). Selon l'alliage spécifique, le producteur et la norme appliquée, les anodes à base d'aluminium ( $\pm 95$  % d'aluminium) contiennent également du zinc (2,5 à 5,75 %) et de l'indium (In) (0,015 à 0,04 %). De par ses propriétés anticorrosion, l'indium est nécessaire pour l'activation de l'anode et pour éviter les films d'oxyde passifs à la surface des structures à protéger (Pourgharibshahi and Lambert, 2016). On retrouve également au sein des anodes d'autres métaux à l'état de traces comme le cadmium, le manganèse, le fer, le silicium, le plomb ou encore le cuivre qui sont des impuretés provenant de la fabrication (Smith and Goolsby, 1996). La durée de vie des anodes galvaniques est généralement estimée à 15 ans.

Le système PCAG est essentiel dans le bon fonctionnement des ports. Sans être obligatoire, il permet de réduire les coûts financiers de l'entretien des structures et limite les problèmes de sécurité liés à la dégradation des structures métalliques. La protection cathodique induit une diminution significative de la vitesse de corrosion puisque la durée de vie d'une structure portuaire est multipliée par 10 (Refait et al., 2015). Le système PCAG est aussi largement utilisé pour les gazoducs, les oléoducs, les canalisations, les piliers métalliques des jetées, les coques et les hélices de navire (Figure 4), les plateformes pétrolières ainsi que dans le cadre des énergies marine renouvelables (EMR), comme c'est le cas pour le mat des éoliennes offshore dont l'installation est en pleine expansion.



Figure 4 : Anodes galvaniques installées sur la coque et le gouvernail de navires pour les protéger de la corrosion.

En effet, les besoins énergétiques sans cesse croissants de l'humanité se sont traduits par une augmentation de l'exploitation des combustibles fossiles et des émissions de gaz à effet de serre entraînant des changements climatiques à l'échelle planétaire. Au cours des dernières décennies, l'accent a été mis sur la recherche et le développement de sources d'énergie renouvelables pour contrer cette tendance. L'Union européenne (UE) s'est fixé un objectif de 20 % de la consommation d'énergie d'origine renouvelable d'ici 2020 (Directive 2009/28/CE). Et d'ici la fin de l'année 2030, il est prévu que la capacité éolienne en Europe atteigne 76 GW (WindEurope, 2019), ce qui implique la mise en place de nombreux parcs éoliens. Afin de protéger les mats des éoliennes, cela signifie tripler les besoins en protection contre la corrosion. En 2017, le Royaume-Uni, l'Allemagne, le Danemark et les Pays-Bas abritent 98% des parcs éoliens marins notamment grâce à la mer du Nord peu profonde et bien ventée (Kirchgeorg et al., 2018). Une estimation prudente révèle un rejet annuel actuel d'environ 1 900 tonnes d'aluminium et 90 tonnes de zinc uniquement dans la mer du Nord. Avec plus de 11 millions de km<sup>2</sup> d'eau sous sa juridiction, la France possède un énorme potentiel naturel en EMR. Actuellement, la construction de six parcs éoliens offshore est prévue en France métropolitaine, dont trois dans le centre-est de la Manche : le parc éolien de Courseulles-sur-mer (~50 km<sup>2</sup>, 75 éoliennes), celui de Fécamp (~65 km<sup>2</sup>, 83 éoliennes) et celui de Tréport (~67 km<sup>2</sup>, 62 éoliennes). Ces parcs éoliens offshore seront intégrés dans un écosystème déjà confronté à de multiples perturbations anthropiques. Dans un parc éolien offshore de la taille de celui de Courseulles-sur-mer (75 éoliennes), les anodes galvaniques représentent une masse d'environ 15 tonnes par fondation ce qui correspond à un transfert de métaux dans l'eau estimé à 105 kg jour<sup>-1</sup> pour l'intégralité du parc. On estime donc qu'un tel parc éolien peut libérer annuellement 45 tonnes d'aluminium et 2 tonnes de zinc pendant les 25 ans de mise en service des anodes galvaniques, contribuant ainsi à l'enrichissement des écosystèmes côtiers en métaux (Kirchgeorg et al., 2018). Tous les futurs parcs éoliens n'ont pas choisi le système PCAG en guise de protection contre la corrosion étant donné que d'autres ont opté pour le système PCCI, qui certes n'engendre pas de rejets de métaux dans l'environnement marin mais libère néanmoins des ions d'oxygène, d'hydrogène et de chlore suite à la réaction d'électrolyse de l'eau de mer (Seine-Maritime.gouv, 2018). De façon surprenante, il n'existe que très peu d'études concernant l'impact environnemental des métaux libérés par la dissolution des anodes galvaniques à base d'aluminium.

C'est dans ce contexte qu'est né ce projet de thèse, dont le principal objectif est la caractérisation des effets du cocktail de métaux issus de la dissolution des anodes galvaniques à base d'aluminium sur les organismes marins. Dans le cadre d'une surveillance environnementale, l'interprétation d'un biomarqueur peut s'avérer délicate dans la mesure où des facteurs environnementaux ou d'autres contaminants peuvent interférer avec la réponse étudiée (Sheehan and Power, 1999). Il est alors nécessaire de mettre en place une approche complémentaire permettant de s'affranchir des facteurs

confondants pouvant interférer lors des études *in situ*. C'est pour ces raisons que les expérimentations réalisées dans le cadre de cette thèse se sont basées sur le suivi de la dégradation des anodes dans l'eau et l'impact sur le biote à partir d'une approche en milieu contrôlé. Des tests d'exposition ont été menés sur une gamme d'espèces marines côtières normandes représentantes de différents groupes taxonomiques et de plusieurs niveaux trophiques. Au total, 9 espèces ont été étudiées au cours des expérimentations. Deux espèces issues de deux classes de mollusques ont été sélectionnées, un bivalve l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, et un gastéropode l'ormeau, *Haliotis tuberculata*. Le choix du premier modèle d'étude s'est porté sur l'huître creuse car c'est l'espèce de bivalve la plus exploitée sur nos côtes dans le cadre des activités conchyliques. L'ormeau a été choisi étant une espèce d'importance économique à l'échelle mondiale, de plus cela permet de faire une comparaison entre l'impact des anodes galvaniques sur un bivalve filtreur et sur un gastéropode brouteur. Les producteurs primaires étant à la base des réseaux trophiques dans le milieu marin, nous avons également porté un intérêt tout particulier à l'impact des anodes galvaniques sur le phytoplancton, les macroalgues et le microphytobenthos. Chez tous les organismes étudiés, des mesures des concentrations en métaux (notamment l'aluminium et le zinc) ont été effectuées afin d'apporter des données importantes sur les processus de bioaccumulation et de bioconcentration. De nombreux indicateurs reflétant l'impact sur les grandes fonctions physiologiques des différentes espèces ont également été étudiés en profondeur. L'objectif final est d'apporter des connaissances sur le potentiel impact biologique du cocktail de métaux libéré par les anodes galvaniques à base d'aluminium. Ainsi, ce projet de thèse aborde une problématique importante concernant l'étude des contaminants métalliques dans le milieu marin et les effets potentiels sur les organismes qui y vivent, dans un contexte d'exploitation accrue du littoral Normand face à ces nouveaux enjeux. Afin de répondre au mieux à ces questions, ce manuscrit de thèse s'articule en 5 chapitres faisant suite à cette introduction :

- Le Chapitre I est consacré à la synthèse bibliographique du sujet. Il retrace les connaissances actuelles à propos de l'impact environnemental des anodes galvaniques. Dans ce contexte, il est également abordé en détails les effets de l'aluminium et du zinc (sous toutes leurs formes) sur les organismes marins. Le chapitre se termine par une description des différents modèles biologiques étudiés au cours de ces travaux de thèse ainsi que la présentation des objectifs.
- Le Chapitre II porte sur la démarche méthodologique commune mise en place pour les différentes expérimentations, à savoir le montage du dispositif expérimental simulant la dissolution d'une anode galvanique ainsi que le dosage des métaux.
- Le Chapitre III se focalise sur l'évaluation des effets chez les consommateurs primaires où deux espèces de mollusques ont été étudiées, l'huître creuse, *Crassostrea gigas* et l'ormeau, *Haliotis tuberculata*. Les stades de vie larvaires et adultes ont été étudiés chez l'huître creuse tandis

que les stades juvéniles et adultes ont été étudiés chez l'ormeau. L'évaluation des effets biologiques s'est centrée sur les mécanismes moléculaires et cellulaires associées à la défense des organismes (immunotoxicité) ainsi que sur les perturbations de fonctions physiologiques clés telles que la croissance, la reproduction et le développement embryo-larvaire. Par ailleurs, ces deux mollusques ont un régime alimentaire différent, filtreur pour l'huître et brouteur pour l'ormeau, ce qui a permis une étude comparative concernant la contamination par le cocktail aluminium/zinc en fonction du mode d'alimentation.

- Le Chapitre IV s'intéresse à l'évaluation des effets chez les producteurs primaires (macroalgues, phytoplancton et microphytobenthos) au moyen de trois indicateurs principaux que sont la croissance, la bioaccumulation des métaux et l'activité photosynthétique des organismes.
- Enfin, le Chapitre V offre une discussion générale des travaux de thèse, des perspectives futures vis-à-vis des études sur l'impact des anodes galvaniques à base d'aluminium, ainsi qu'une conclusion.

Au cours de mes 3 années au laboratoire BOREA, j'ai également eu l'occasion de participer activement au programme RIN ECUME financé par la Région Normandie. Ce travail de biosurveillance active de deux écosystèmes en manche que sont la bouée SMILE (zone subtidale) et la baie des Veys (zone intertidale), consistait en des prélèvements mensuels d'huîtres encagées sur les deux sites. L'objectif était de faire le lien entre la bioaccumulation des métaux et les paramètres physiologiques (immunité, reproduction, réserves énergétiques, état de santé général) des huîtres. Les biomarqueurs étudiés étaient les mêmes que ceux présentés dans l'article 1. Le rapport d'activité final de l'axe 4a (Analyser l'impact des contaminants d'origine anthropique au niveau de traits de vie des organismes) est présenté dans l'annexe 5 du manuscrit. Le suivi réalisé pendant plus d'un an a ainsi permis l'obtention de valeurs de référence des réponses biologiques étudiées et, d'autre part, de la contamination chimique avant la mise en place du parc éolien. Les anodes galvaniques utilisées dans le futur parc éolien libéreront une quantité d'ETMs non négligeable qui serait alors une source potentielle de contamination pour les organismes marins (Kirchgeorg et al., 2018). Une fois l'installation du parc éolien terminée, un suivi des niveaux de bioaccumulation en métaux des huîtres pourrait ainsi être réalisée pour suivre leur évolution par rapport aux valeurs de référence.

## CHAPITRE I - État de l'art



## 1. Impact des Anodes Galvaniques

À ce jour, les études portant sur les systèmes de protection cathodique se sont focalisées principalement sur la caractérisation des produits de corrosion formés à la surface de la cathode ou des anodes, ainsi que le transfert des éléments libérés par la dissolution des anodes métalliques dans la colonne d'eau et les sédiments. Les premières études ont permis de caractériser le dépôt calco-magnésien formé en surface du métal polarisé (cathode) de façon à mieux comprendre sa mise en place et optimiser son rôle de protection (Refait et al., 2015). Selon la valeur du pH, le dépôt sera composé majoritairement d'hydroxyde de magnésium ou de carbonate de calcium (Carre, 2017). La dissolution de l'anode libère quant à elle les éléments qui la constituent pour former un dépôt gélatineux constitué majoritairement de sulfate d'aluminium basique ( $\text{Na}_{0,1}[\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}](\text{SO}_4)_{3,55}$ ) (Deborde et al., 2015; Taline, 2018). La matrice amorphe (ou nanocristalline) fortement hydratée (gel) et poreuse de ce dépôt entoure le métal sans entraver la dissolution de l'anode favorisant la dispersion dans le milieu des éléments constitutifs de l'anode. Ces éléments passent dans la fraction dissoute et particulaire de la colonne d'eau pouvant enrichir le compartiment sédimentaire de milieux soumis à de faibles conditions hydrodynamiques (Caplat et al., 2020).

Dans les ports commerciaux, la charge des anodes galvaniques à base d'aluminium peut atteindre quelques centaines de tonnes (Kirchgeorg et al., 2018). Étant donné que les ports sont des zones confinées ou semi-fermées avec des eaux peu profondes et un faible renouvellement en eau de mer par la marée ou le courant, les apports de métaux provenant de la dissolution des anodes peuvent être importants, entraînant des dommages écologiques potentiels. Dans leurs travaux, Gabelle et al. (2012) ont montré qu'il n'y avait pas d'augmentation significative de la concentration en aluminium dans la colonne d'eau, *a contrario* de la concentration dans les sédiments prélevés à proximité des anodes (12,9 à 32,4 g kg<sup>-1</sup>). Un tel enrichissement est caractéristique des zones anthropiques utilisant des anodes galvaniques où aucun dragage n'est effectué. Une autre étude en conditions semi-naturelles, impliquant des anodes galvaniques à base de zinc, a mis en évidence l'enrichissement en zinc dans les sédiments directement en contact avec la phase aqueuse (Leleyter et al., 2007). Plus précisément, le zinc libéré est stocké majoritairement dans deux fractions labiles des sédiments : les fractions acido-solubles et réductibles. Lors d'une expérience à grande échelle, menée pendant 12 mois avec de l'eau de mer naturelle, les auteurs ont protégé des structures en acier au carbone à l'aide d'anodes galvaniques à base de zinc. Une augmentation significative de la concentration en zinc a été mesurée dans l'eau ainsi que dans les sédiments de surface qui sont alors devenus une source de pollution secondaire, pouvant remobiliser le zinc dans la colonne d'eau. Après 1 mois d'expérimentation, la concentration initiale en zinc de 40 µg L<sup>-1</sup> est passée à 1 090 µg L<sup>-1</sup> soit une augmentation de la concentration initiale par un facteur 27 (Rousseau et al., 2009). Les auteurs ont précisé que

l'enrichissement en zinc était plus faible en condition naturelle. Bird et al. (1996) estiment que l'augmentation locale des concentrations de zinc dissous près des marinas ouvertes peut se situer entre 2 et 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  amenant à un niveau environnemental de 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Des augmentations des concentrations de zinc dans les sédiments des marinas allant jusqu'au double des niveaux de fond (jusqu'à 200  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) ont également déjà été rapportées (Bird et al., 1996).

Dans le cadre du projet Taline, une étude chronique (42 mois), menée dans le port de Calais, a révélé que la dissolution des anodes galvaniques à base d'aluminium induisait un enrichissement en zinc plus important que l'aluminium dans les sédiments (Caplat et al., 2020). Cela contraste avec l'abondance de ces éléments dans la composition de l'anode et démontre que les enrichissements en métaux dans les sédiments dépendent de l'hydrodynamisme et de l'espèce métallique, mais pas de la proportion en métaux (% en masse) composant l'anode. Un tel enrichissement dans la couche superficielle peut entraîner une mobilisation potentielle des métaux à partir des sédiments lors de changements physico-chimiques se produisant dans le milieu (par exemple lors des opérations de dragage) (Caplat et al., 2020). La contamination élevée en ETMs comme le cuivre, le cadmium et le zinc dans les sédiments relevés dans les marinas et les grands ports le long de la côte d'Oman est attribuée aux anodes galvaniques à base de zinc étant donné leurs nombreuses utilisations à l'intérieur du bassin portuaire et sur les coques des pétroliers amarrés (Jupp et al., 2017). De plus, les auteurs ont constaté des niveaux élevés de ces métaux dans les huîtres et les balanes du port. Au début des années 2000, une étude s'est penchée sur la question de l'utilisation des anodes galvaniques à base de zinc dans les réservoirs d'eau de ballast des navires. Les auteurs ont constaté que les concentrations en zinc atteignaient 1,16  $\text{mg L}^{-1}$  pour un pH de 8,2 et 29  $\text{mg L}^{-1}$  pour un pH de 7,5. Comme nous le verrons plus loin, ces concentrations sont largement suffisantes pour engendrer 100 % de mortalité chez les premiers stades de vie de nombreux organismes aquatiques (Jelmert and Van Leeuwen, 2000).

Une partie de la communauté scientifique est d'avis qu'à une échelle régionale les flux de métaux engendrés par les anodes galvaniques sont négligeables par rapport aux flux des rivières et des eaux usées (Deborde et al., 2015). Il est très difficile d'évaluer l'impact de la dissolution des anodes galvaniques sur les concentrations en métaux dans le milieu naturel. C'est le cas pour l'aluminium qui est un élément majeur de la croûte terrestre et encore plus particulièrement pour les métaux présents à l'état de traces dans les anodes (Cu, Fe, In, Mn et Si). Néanmoins, il est indéniable que la topographie des ports favorise l'enrichissement en aluminium et en zinc issus de la protection cathodique et les résultats de ces différentes études témoignent de l'importance d'évaluer la toxicité du cocktail de métaux libéré par les anodes galvaniques. Or, à notre connaissance, très peu d'études se sont intéressées spécifiquement aux effets biologiques des anodes galvaniques à base d'aluminium chez les organismes marins. Une étude menée sur le pétoncle noir, *Mimachlamys varia*, dans le port de commerce et la marina de La Rochelle, a mis en évidence la complexité d'associer les effets observés

sur les biomarqueurs au laboratoire (SOD, GST, MDA, AChE et LAC) avec les anodes galvaniques déployées sur le terrain (Barbarin, 2023). Récemment Bell et al. (2020) ont étudié en laboratoire l'effet de l'anode galvanique à base d'aluminium lors d'une exposition aiguë chez une espèce d'amphipode, *Corophium volutator*, une diatomée, *Phaeodactylum tricornutum*, et une bactérie, *Aliivibrio fischeri*. L'étude n'a pas relevé de toxicité aiguë chez la bactérie et seulement de légers effets sur la croissance de la microalgue. En ce qui concerne les amphipodes, une augmentation significative de la mortalité a été observée pour une forte concentration d'aluminium ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) mais qui est très éloignée des maximums environnementaux. Dans la glande digestive de la moule *Mytilus edulis*, il a été mesuré une accumulation allant jusqu'à  $1\,706 \text{ mg kg}^{-1}$  de l'aluminium libéré par les anodes galvaniques, réversible après le transfert des organismes dans une eau non contaminée (Mao et al., 2011). Il est intéressant de noter que dans l'étude de Caplat et al. (2010), les auteurs ont démontré que l'aluminium et le zinc issus de la dissolution d'une anode galvanique étaient moins toxiques pour l'oursin *Paracentrotus lividus* que l'aluminium et le zinc sous leur forme sulfatée, classiquement utilisée dans les études écotoxicologiques. Cette différence de toxicité peut s'expliquer par une différence de spéciation des métaux entraînant une biodisponibilité dépendante de la forme chimique et de l'espèce biologique exposée. De plus, comme indiqué précédemment, la dissolution de l'anode engendre sur sa surface la précipitation d'hydroxydes métalliques due à une augmentation locale du pH ou à des associations de complexes métallorganiques qui pourraient réduire les niveaux des espèces ioniques libres Al (III) et Zn (II) et donc leur disponibilité. En conséquence, cela pourrait résulter en une toxicité plus faible des produits de dégradation des anodes galvaniques par rapport à l'aluminium et au zinc sous forme de sels sulfatés chez lesquels il existe une plus forte proportion de formes métalliques libres. L'utilisation de sels d'aluminium n'est donc pas la meilleure façon de reproduire une exposition aux métaux libérés par l'anode dans les études écotoxicologiques.

Dans leurs travaux, (Mottin et al., 2012) se sont focalisés spécifiquement sur l'impact des anodes galvaniques à base de zinc chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, en procédant à une exposition chronique à  $530 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (de zinc) pendant 10 semaines et une exposition aiguë à  $10\,200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  pendant 1 semaine. L'exposition aiguë a révélé un taux de mortalité de 81,8 %, tandis qu'aucune mortalité n'a été détectée lors de l'exposition chronique. De plus, tous les biomarqueurs du système immunitaire étudiés, à l'exception du nombre d'hémocytes circulants, ont été stimulés par un niveau modéré de zinc et inhibés par un niveau élevé. À partir de 48 heures d'exposition aiguë, des diminutions d'environ 16% et 36% ont été observées dans l'activité phagocytaire et l'activité non-spécifique de l'estérase, respectivement, et une diminution de 61% a été mesurée après 24 heures dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Concernant l'activité phénoloxydase une augmentation de 111% par rapport aux témoins a été enregistrée après 96 h d'exposition, suivie d'une diminution de 53% après 168 h d'incubation (Mottin et al., 2012). Cette expérience a donc montré la variabilité des

effets toxiques de la dissolution des anodes galvaniques à base de zinc en fonction du type d'exposition.

Dans la composition des anodes galvaniques à base d'aluminium, on relève également la présence d'indium qui est un élément trace non-essentiel et rare dans le milieu naturel. L'utilisation de l'indium (In) dans les produits semi-conducteurs a fortement augmenté ces dernières années et le rejet de cet élément dans les écosystèmes aquatiques est inévitable. Les effets de l'In sur les êtres vivants sont encore très méconnus et on recense très peu d'études écotoxicologiques. Une exposition de rats à l'indium a démontré des preuves d'effets cancérigènes dans des études d'inhalation à long terme sur des animaux de laboratoire (Tanaka et al., 2010). Chez la plante *Arabidopsis thaliana*, l'indium s'est principalement accumulé au niveau des racines et a engendré un retard de croissance, du stress oxydatif ainsi qu'une nutrition phosphorée déséquilibrée (Chang et al., 2020). En milieu aquatique, le pH est apparu comme un facteur déterminant de l'absorption de l'In par l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, principalement expliqué par une interaction compétitive des ions  $H^+$  avec les sites d'absorption de l'indium (Yang et al., 2019). À notre connaissance, aucune étude ne s'est portée sur les effets de l'indium chez les organismes marins.

Au regard de ces premiers résultats sur l'impact des anodes galvaniques, il apparaît primordial d'étudier l'impact du cocktail métallique issu de la dissolution des anodes galvaniques sur les organismes marins. L'aluminium et le zinc étant les métaux majoritaires constituant les anodes galvaniques, il semble nécessaire de faire un point sur l'état actuel des connaissances des effets de ces deux métaux chez les organismes marins.

## 2. L'Aluminium

### 2.1. L'Aluminium en tant qu'élément

L'aluminium est le 1<sup>er</sup> métal et le 3<sup>ème</sup> élément le plus abondant de la croûte terrestre, principalement présent sous forme de bauxite. L'homme l'utilise dans le secteur des transports, des emballages, des équipements électriques ainsi que dans le secteur médical où il est utilisé sous forme de phosphates, d'hydroxydes ou de sulfates comme adjuvant dans les vaccins humains et vétérinaires (Lindblad, 2004). En France, les concentrations d'aluminium dans l'eau potable sont réglementées, le code de la santé publique a fixé le seuil à  $200 \mu g L^{-1}$  selon les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé établies (OMS) en 1994, 1998 et 2004. Les sels d'aluminium ont longtemps été utilisés dans les stations de traitement de l'eau, comme agents de coagulation lors de l'étape dite de « coagulation-floculation ». Cette étape vise à réduire la présence de matière en suspension dites colloïdales dans l'eau pour éliminer la couleur et la turbidité afin d'obtenir une qualité d'eau garantissant l'efficacité de l'étape de désinfection ultérieure. L'utilisation de ces sels nécessitait des

conditions de mise en œuvre très précises afin que l'aluminium soit éliminé à l'issue du traitement de l'eau mais le non-respect de ces conditions est à l'origine de « fuites » d'aluminium soluble dans les eaux traitées. Aujourd'hui, ce sont des sels de fer qui sont utilisés en remplacement des sels d'aluminium jugés trop à risque pour la santé, notamment chez les personnes souffrant d'insuffisances rénales et traitées par dialyse (Seidowsky et al., 2018).

Concernant le milieu marin, il n'existe à l'heure actuelle aucun seuil de toxicité pour l'aluminium. Après une étude basée sur les résultats d'essais de toxicité de 11 espèces marines de différents niveaux trophiques, Golding et collaborateurs (2015) ont proposé une concentration sans effet de  $24 \mu\text{g L}^{-1}$  d'aluminium total (Golding et al., 2015). Les secteurs de la métallurgie et de la sidérurgie sont à l'origine de 97 % des émissions directes d'origine humaine. Bien que les sources anthropiques d'aluminium dans les systèmes aquatiques soient plus faibles que les sources naturelles à l'échelle mondiale (Rauch and Pacyna, 2009), on assiste à une augmentation des rejets anthropiques dans les écosystèmes aquatiques. Les apports fluviaux en aluminium dissous dans l'océan existent mais sont considérés comme négligeables car la majorité de cet élément se retrouve dans les sédiments estuariens ou est captée par les processus biologiques mis en jeu dans les eaux côtières (Tria et al., 2007). C'est en fait les apports de particules et de poussières atmosphériques (de diamètre inférieur à  $5 \mu\text{m}$ ) émis par les zones désertiques qui constituent la source majeure en aluminium dans les eaux de surface des océans (Hydes, 1983; Hydes et al., 1988; Kramer et al., 2004; Maring and Duce, 1987). En effet, ces particules présentent un temps de séjour dans l'atmosphère qui peut atteindre plusieurs jours, ce qui permet leur transport sur de longues distances et de les déposer très loin de leur source d'émission. Par exemple, les concentrations en aluminium sont jusqu'à 40 fois plus faibles dans l'océan Pacifique par rapport à l'océan Atlantique à cause des apports importants du vaste désert du Sahara auquel ce dernier est soumis, alors que la majeure partie de l'océan Pacifique n'a pas de sources terrestres très influentes (Tria et al., 2007). On peut également citer un autre exemple intéressant avec le cas de la mer Méditerranée qui présente des concentrations d'aluminium dissous plus élevées que les autres mers ouvertes en raison de sa forte exposition aux poussières de l'Afrique du Nord (Hydes et al., 1988). Les flux atmosphériques sont le principal facteur influant sur les concentrations de l'aluminium dans les écosystèmes aquatiques. Cependant, de manière générale les profils verticaux sont similaires avec des concentrations plus élevées dans les eaux de surface, des minima à mi profondeur et une augmentation à la base de la colonne d'eau liée à la dissolution des particules sédimentaires.

L'annexe 1 synthétise toutes les données relevées sur le terrain ces dernières années, que cela soit dans les eaux côtières ou en plein océan. La plus forte concentration d'aluminium ( $151 \mu\text{g L}^{-1}$ ) a été enregistrée dans les eaux de surface autour de Port Botany, le principal port de navigation de Sydney (Jahan and Strezov, 2017). Une concentration de  $132 \mu\text{g L}^{-1}$  a été relevée sur la côte nord du

Chili, plus précisément au niveau de la ville portuaire d'Antofagasta, une zone densément peuplée et soumise à de nombreuses activités économiques et industrielles, ainsi qu'aux déchets d'anciennes activités minières (Valdés et al., 2011). D'autres sites à travers le monde ressortent, comme la côte égyptienne avec un record de  $106 \mu\text{g L}^{-1}$  (Abdel Ghani, 2015). Une concentration record de  $1\,170 \mu\text{g L}^{-1}$  a même déjà été enregistrée dans le port de Yamba en Australie, sur ce même site les auteurs ont relevé une concentration moyenne de  $224 \mu\text{g L}^{-1}$  (Jahan and Strezov, 2017). Cependant, de manière générale, les concentrations d'aluminium dans les eaux côtières ne dépassent que rarement  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  tandis que les mesures effectuées en plein océan ont montré une gamme de concentrations d'aluminium dissous systématiquement plus faibles. En effet, les concentrations en haute de mer atteignent au maximum  $2,03 \mu\text{g L}^{-1}$  et ne dépassent que rarement  $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$  (Hydes, 1983; Hydes et al., 1988; Kramer et al., 2004). De telles variations temporelles et géographiques s'expliquent par une combinaison des processus d'élimination biologique ainsi que des sources d'origine naturelles (Moran and Moore, 1988). La plus faible concentration ( $0,085 \mu\text{g L}^{-1}$ ) a été mesurée dans la mer de Weddell (partie de l'océan Atlantique Sud proche de l'Antarctique), qui devrait être moins affectée par les pressions anthropiques que les autres sites.

L'aluminium est caractérisé par son temps de séjour relativement court (2 à 6 ans) dans les eaux de surface ce qui peut être attribué en grande partie à son hydrolyse rapide et à la très faible solubilité des produits issus de cette hydrolyse (Kramer et al., 2004). La chimie de l'aluminium a été très étudiée dans les eaux douces (Driscoll and Schecher, 1990; Gensemer and Playle, 1999; Ščančar and Milačič, 2006). La spéciation chimique aqueuse de l'aluminium regroupe des formes insolubles, comme les silico-aluminates (argiles) et l'hydroxyde  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , et des formes ioniques solubles tels que des hydroxydes  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ ,  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ ,  $\text{AlOH}^{2+}$ , la forme libre  $\text{Al}^{3+}$  et des complexes minéraux (avec  $\text{F}^-$  ou  $\text{SO}_4^{2-}$ ) et organiques (Gensemer and Playle, 1999). La solubilité de l'aluminium (indirectement sa toxicité) dépend essentiellement du pH et de la teneur en ligands organiques, de la force ionique et de la concentration en particules dans le milieu. L'aluminium est relativement insoluble à un pH circumneutre (entre 6 et 8). Sa solubilité augmente à des pH plus acides ou plus basiques, en présence de ligands complexant issus de la matière organique dissoute (MOD) et pour de faibles températures (Driscoll and Schecher, 1990). La limite de solubilité de l'aluminium se situe entre  $650 \mu\text{g L}^{-1}$  et  $800 \mu\text{g L}^{-1}$  pour une eau à  $28^\circ\text{C}$  (Trenfield et al., 2015). Dans leur étude, Golding et collaborateurs (2015) ont montré qu'à une concentration inférieure à  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  l'aluminium est principalement sous sa forme dissoute, tandis qu'au-dessus de cette concentration elle coexiste avec la forme particulaire qui devient ensuite prédominante au-delà de  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  (Golding et al., 2015). Une distinction importante entre la spéciation chimique de l'aluminium dans l'eau de mer et dans l'eau douce est l'absence d'espèces cationiques en mer ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$  et  $\text{AlOH}^{2+}$ ) qui vont dominer dans des conditions de pH acide (Tria et al., 2007). En milieu marin ( $\text{pH} = 8,2$ ) la spéciation de l'aluminium est dominée par l'anion

aluminate  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$  et dans une moindre mesure par l'hydroxyde d'aluminium neutre  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (Figure 5).

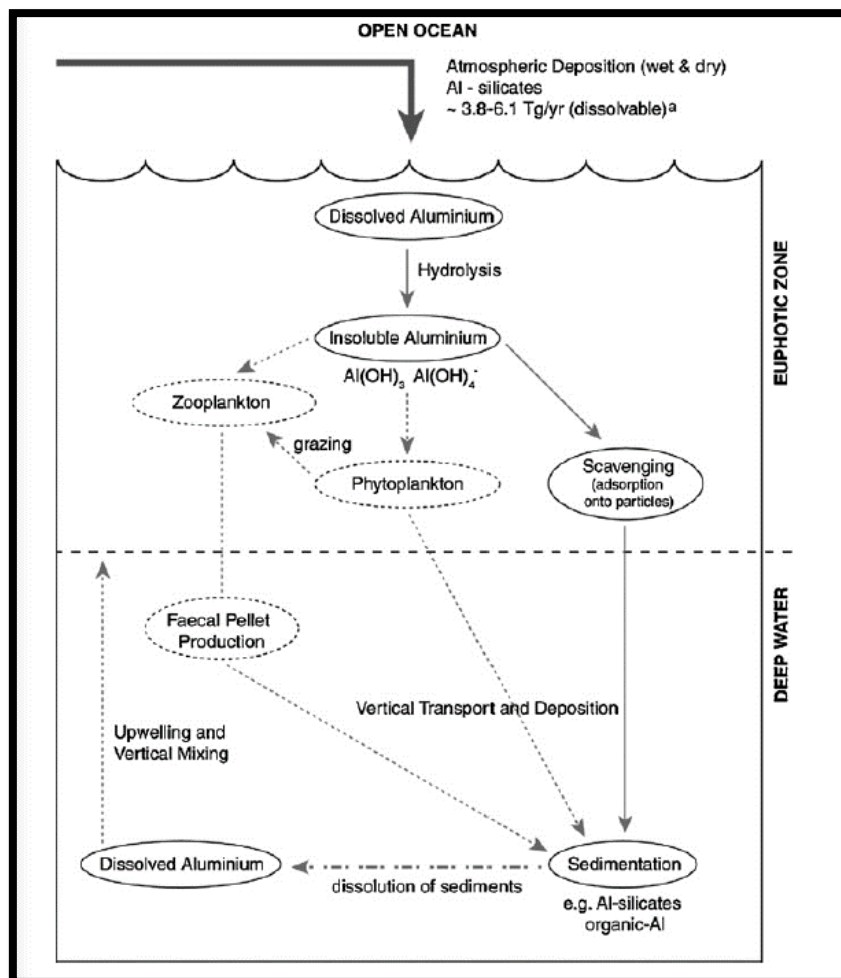


Figure 5 : Cycle biogéochimique de l'aluminium d'après Tria et al. (2007). Magnitude de l'aluminium dissoluble calculée à partir des valeurs données par Maring et Duce (1987).

D'après Millero et collaborateurs (2009), l'acidification des océans engendrée par l'absorption du  $\text{CO}_2$  d'origine anthropique aura pour conséquence de diminuer la concentration en anions tels qu' $\text{OH}^-$  (l'ion hydroxyde) et  $\text{CO}_3^{2-}$  (l'ion carbonate) de 82 à 77 % dans les eaux de surface (Millero et al., 2009). Or, les carbonates jouent un rôle majeur dans le rétrocontrôle du climat et des gaz à effet de serre *via* le cycle du carbone. Ils constituent, surtout sous forme de carbonate de calcium, l'essentiel des puits de carbone. Une telle diminution de ces ions devrait modifier la spéciation d'un certain nombre d'ions métalliques dans l'eau de mer, y compris l'aluminium. La plupart des particules organiques dans l'eau de mer sont chargées négativement et un abaissement du pH entraînera une baisse la disponibilité des sites de surface absorbant les métaux. Les métaux qui forment des complexes forts avec l'hydroxyde et le carbonate subiront des changements significatifs, ce qui est le cas pour l'aluminium. Il est estimé que le changement le plus important concernera la forme  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , qui augmentera de 36 % par rapport

au complexe soluble  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$  (Millero et al., 2009). Les modifications de la spéciation des métaux dues à la baisse du pH entraîneront des changements dans le comportement des métaux et les cycles biogéochimiques affectant la disponibilité et la toxicité des métaux pour les organismes marins. Dans l'eau de mer, les ions dissous des ETMs sont répartis entre les ions libres et ceux formant des complexes avec différents ligands, organiques ou inorganiques. Les ions libres sont couramment considérés comme étant la forme dissoute disponible et donc accumulée par les organismes, autrement appelée la fraction biodisponible (Rainbow and Phillips, 1993). Cette biodisponibilité varie en fonction de l'élément étudié, mais aussi en fonction de nombreux paramètres abiotiques comme le pH, la salinité, la température ou encore la concentration en matière organique dissoute. L'aluminium est notamment connu pour se lier au fluor et aux matières organiques dissoutes (Gensemer and Playle, 1999).

Selon la littérature, l'aluminium n'est pas un élément essentiel aux fonctions biologiques à la différence des oligoéléments tels que le zinc, le fer ou le cuivre. Cependant, malgré l'absence apparente de rôle biologique de l'aluminium, chez l'homme il est connu pour se substituer aux métaux essentiels au cours de processus biochimiques critiques (Exley and House, 2011). L'aluminium s'accumule dans le cerveau à tous les stades de développement. Il existe des cas d'intoxication aiguë ayant abouti à une encéphalopathie. Dans la plupart des cas, l'accent est mis sur l'intoxication chronique, car la toxicité aiguë de l'aluminium chez l'homme est extrêmement rare (Exley, 2016). L'aluminium affecte le métabolisme du stress oxydatif puisque la plupart des études montrent une augmentation significative de la peroxydation des lipides localisé au niveau du cerveau et il est connu pour provoquer des symptômes tels que des pertes de mémoire, des problèmes d'équilibre et de coordination ce qui a engendré de nombreux soupçons quant à sa responsabilité en ce qui concerne les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose en plaque, la maladie de Crohn ou les colopathies fonctionnelles (Krewski et al., 2007; Mohammadirad and Abdollahi, 2011). Les facteurs de risque sont liés à la vie dans des environnements poussiéreux, la nutrition sur le long terme, la diminution de la fonction rénale, l'hémodialyse, la consommation ou l'ingestion de substances à forte teneur en aluminium ainsi que le travail dans un environnement qui contient de fortes concentrations en aluminium. Actuellement le JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) recommande une dose hebdomadaire tolérable provisoire (DHTP) chez l'Homme de  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  et par semaine (confirmation en 2008 de l'European Food Safety Authority (EFSA)).

## 2.2.Toxicité de l'aluminium chez les organismes marins

La toxicité de l'aluminium a été particulièrement étudié dans les eaux douces, Gensemer et Playle (1999) ont notamment réalisé une revue exhaustive de toutes les études concernant les algues, les



angiospermes, les invertébrés et les poissons (Gensemer and Playle, 1999). Cependant, peu d'études se sont concentrées sur le milieu marin. Dans le cadre de cette thèse, une synthèse bibliographique des effets de l'aluminium sous toutes ses formes sur les organismes marins de différents groupes taxonomique a été réalisée. Un tableau synthétique en annexe 2 rassemble toutes données recueillis dans la littérature et nous tacherons ici d'en résumer les grandes lignes.

### 2.2.1. Le phytoplancton

Groupe très hétérogène d'un point de vue phylogénétique, le phytoplancton a fait l'objet de plusieurs études quant à sa sensibilité vis-à-vis de l'aluminium. Les microalgues sont reconnues comme sensibles à l'exposition aux métaux du fait qu'elles sont en contact direct avec le milieu ; et n'en sont séparées que par la membrane cytoplasmique et la paroi cellulaire (Anu et al., 2018, 2016; Dinesh et al., 2014; C. M. Monteiro et al., 2011). De manière générale, les microalgues d'eau douce sont plus sensibles à l'aluminium en raison des conditions légèrement acides (pH d'environ 6,0), leur milieu de vie entraînant une plus forte disponibilité du métal (Gensemer and Playle, 1999). La croissance est le principal indicateur utilisé dans les études écotoxicologiques sur les microalgues. Zhou et al. (2018) ont notamment réalisé une synthèse des différentes publications sur les effets de l'aluminium chez le phytoplancton marin (Zhou et al., 2018b). Il en ressort une grande interspécificité de la sensibilité des microalgues en fonction des groupes taxonomiques et de l'écologie des différentes espèces comme le souligne les concentrations d'aluminium rapportées causant une inhibition de croissance de 10 % ( $CI_{10}$ ) qui s'échelonnent sur plusieurs ordres de grandeur allant de 14 à 6 800  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Gillmore et al., 2016; Golding et al., 2015; Harford et al., 2011). Les diatomées constituent de loin le groupe qui a fait l'objet du plus d'études. La toxicité de l'aluminium pourrait être corrélée à la composition siliceuse de la paroi cellulaire, puisque *Minutocellus polymorphus* ( $CI_{10} = 540 \mu\text{g L}^{-1}$ ) et *Nitzschia closterium* ( $CI_{10} = 18 \mu\text{g L}^{-1}$ ) possèdent une paroi à haute composition siliceuse et étaient plus sensibles que *Phaeodactylum tricornutum* ( $CI_{10} = 2\,100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) qui présente une paroi cellulaire faiblement siliceuse (Gillmore et al., 2016). Il est établi que l'aluminium dissous dans le milieu peut être incorporé dans les frustules de diatomée comme mécanisme de détoxification (Dixit et al., 2001; Gehlen et al., 2002; Machill et al., 2013). Des communautés naturelles de diatomées prélevés en Antarctique exposées à 13,33  $\mu\text{g L}^{-1}$  d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) ont montré une inhibition de la solubilité et de la vitesse de dissolution de la silice, ce qui questionne sur l'implication de l'aluminium dans le métabolisme du silicium (Van Bennekom et al., 1991). Une étude révèle également les effets néfastes d'une exposition aiguë à l'aluminium (6 936  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ( $\text{AlCl}_3$ ) sur l'activité photosynthétique et le métabolisme protéique de *P. tricornutum*. Au final, l'aluminium a affecté 5 protéines liées au stress, 12 impliquées dans la photosynthèse, 6 dans le métabolisme énergétique, 4 dans le transport membranaire, 25 dans l'homéostasie des protéines, 12 dans la transduction du signal et 1 dans le remodelage du cytosquelette (Xie et al., 2015). La toxicité

de l'aluminium chez d'autres groupes taxonomiques de microalgues a également été étudiée. En ce qui concerne les Coccolithophores (classe des Prymnesiophyceae), la  $Cl_{50}$  ( $AlCl_3$ ) d'*Isochrysis galbana* a été évaluée à  $2\,570\ \mu g\ L^{-1}$  à  $24^\circ C$  (Trenfield et al., 2015). Chez les Chlorophytes, la  $Cl_{10}$  du genre *Tetraselmis* a été évaluée à  $3\,200\ \mu g\ L^{-1}$  et celle de *Dunaliella tertiolecta* à  $3\,200\ \mu g\ L^{-1}$  (Golding et al., 2015). Comme c'est le cas dans les eaux douces, il a également été démontré que la toxicité de l'aluminium augmentait quand le pH diminuait. Pour un pH de 8.2, l'aluminium est majoritairement présent sous forme chargé négativement ( $Al(OH)_4^-$ ) ou non chargé ( $Al(OH)_3$ ) ce qui constitue une faible affinité pour la paroi des cellules. Tandis que pour un pH de 6,2, l'aluminium est présent d'avantage sous forme cationique ( $Al^{3+}$ ,  $Al(OH)_2^+$  et  $AlOH^{2+}$ ). À cause de son affinité avec les groupes hydroxyles et carboxyles présents dans la structure de la membrane des cellules, les ions aluminium sont mobilisés à la surface des algues favorisant ainsi leur absorption intracellulaire (Türker Saçan and Akmeahmet Balcioğlu, 2001). Comme l'indique plusieurs auteurs, un facteur biotique comme la densité cellulaire initiale influence également la toxicité des métaux, puisqu'il a déjà été démontré que démarrer une exposition à une plus forte densité cellulaire réduisait la sensibilité des microalgues au cuivre, au zinc et au cadmium (Franklin et al., 2002; Moreno-Garrido et al., 2000). Une biomasse algale plus importante signifie une adsorption métallique globale plus élevée et par conséquent une diminution de la concentration du contaminant dans le milieu. Ajouté à cela la grande hétérogénéité de la toxicité de l'aluminium des différentes espèces microalgues, cela rend difficile de tirer des conclusions globales

#### 2.2.2. Macroalgues

Également diversifiées d'un point de vue taxonomique, les macroalgues ont fait l'objet d'une seule étude sur l'impact de l'aluminium à notre connaissance. Appartenant à la classe des phaéophycées, les deux espèces étudiées semblaient peu sensibles à l'aluminium, comme en témoigne l'absence d'effet sur le taux de germination des zygotes pour une concentration de  $9\,800\ \mu g\ L^{-1}$  chez l'espèce *Hormosira banksii* et une  $Cl_{10}$  déterminée à  $6\,800\ \mu g\ L^{-1}$  pour l'espèce *Ecklonia radiata* (Golding et al., 2015).

#### 2.2.3. Cnidares

Une seule étude s'est intéressée aux effets de l'aluminium chez les cnidaires. La  $Cl_{50}$  du corail *Acropora tenuis* d'aluminium ( $AlCl_3$ ) a été évaluée à  $2\,997\ \mu g\ L^{-1}$  pour la fécondation et à  $1\,945\ \mu g\ L^{-1}$  pour la métamorphose larvaire ce qui en fait un organisme relativement résistant (Negri et al., 2011).

#### 2.2.4. Annélides

Une seule étude semble s'être intéressée aux effets de l'aluminium sur les annélides polychètes. Une concentration de  $2\,000\ \mu g\ L^{-1}$  ( $AlCl_3$ ) n'a engendré aucun effet apparent chez les deux polychètes

*Capitella capitata* et *Neanthes arenaceodentata* tandis que la CL<sub>50</sub> a été évaluée à 480 µg L<sup>-1</sup> chez l'espèce *Ctenodrilus serratus*.

#### 2.2.5. Arthropodes

Chez les arthropodes, la plupart des études se focalisent sur les perturbations de l'osmorégulation des larves d'insectes en eau douce. En ce qui concerne le milieu marin, l'exposition d'embryons du crabe *Cancer anthonyi* à l'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) a révélé une faible sensibilité puisqu'après 7 jours, les auteurs ont mesuré une mortalité de 0% à 1 000 µg L<sup>-1</sup>, de 17,7 % à 10 000 µg L<sup>-1</sup> et de 100 % à 100 000 µg L<sup>-1</sup> (Macdonald et al., 1988). Chez le copépode *Nitocra spinipes*, la CL<sub>50</sub> sur 96 heures (Al<sup>3+</sup>) a été évaluée à 10 000 µg L<sup>-1</sup> ce qui laisse à penser que les crustacés marins présentent une faible sensibilité à l'aluminium (Bengtsson, 1978).

#### 2.2.6. Echinodermes

Au sein de l'embranchement des échinodermes, le développement embryonnaire d'*Heliocidaris turberculata* n'a pas été affecté de façon marquée à la plus forte concentration d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) testée (28 000 µg L<sup>-1</sup>) (Golding et al., 2015). Chez *Sphaerechinus granularis*, une inhibition significative du succès de la fécondation a été observée chez les spermatozoïdes exposés à 15 000 µg L<sup>-1</sup> d'aluminium (Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>) (Pagano et al., 1996).

#### 2.2.7. Mollusques

Comparativement à d'autres métaux, l'effet de l'aluminium a été peu étudié chez les mollusques marins. Les principaux indicateurs portent sur le développement embryo-larvaire et la bioaccumulation. Les CL<sub>50</sub> des larves de nombreuses espèces de bivalves (*Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Saccostrea echinata*, *Saccostrea glomerata*, *Crassostrea virginica*) ont été évaluées dans une gamme de concentrations allant de 100 à 1 000 µg L<sup>-1</sup> (Calabrese et al., 1973; Golding et al., 2015; Pagano et al., 1996; Wilson and Hyne, 1997). Récemment, une étude a testé la sensibilité des larves de 10 espèces de bivalves (*Crassostrea gigas*, *Saccostrea glomerata*, *Xenostrobus securis*, *Scaechlamys livida*, *Anadara trapezia*, *Fulvia tenuicostata*, *Hiatula alba*, *Barnea australasiae*, *Spisula trigonella*, *Irus crenatus*) à 10 métaux dont le chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) (Markich, 2021). Parmi les 10 espèces de bivalves étudiés, *C. gigas* apparaît comme l'espèce la plus sensible à l'aluminium avec une CL<sub>50</sub> déterminée à 195 µg L<sup>-1</sup> tandis que *I. crenatus* apparaît comme l'espèce la plus résistante avec une CL<sub>50</sub> déterminée à 498 µg L<sup>-1</sup>. Pour *C. gigas* la NOEC a été évaluée à 89 µg L<sup>-1</sup> tandis que pour *I. crenatus* elle était de 235 µg L<sup>-1</sup>. L'étude a également mis en évidence une relation entre phylogénie et sensibilité aux métaux. Les cinq espèces de bivalves de la sous-classe des Pteriomorphia (huîtres, les moules et Pectinidae) forment le groupe le plus sensible à l'aluminium comparativement aux bivalves de la sous-classe des Heteroconchia (coques et palourdes).

De par le même mécanisme qu'expliqué précédemment, le pH semble être une variable déterminante dans la toxicité de l'aluminium chez les larves de bivalve étant donné que des diminutions significatives du développement embryonnaire ont été observées lorsque les œufs fécondés étaient incubés dans de l'eau de mer à un pH inférieur à 6,75 (Wilson and Hyne, 1997).

À notre connaissance, aucune exposition à l'aluminium n'a pour l'instant été réalisée chez les gastéropodes marins. On recense seulement des données sur les concentrations d'aluminium tissulaires d'ormeaux échantillonnés sur le terrain (Bryan et al., 1977). Une étude réalisée en eau douce sur les lymnées, *Lymnea stagnalis*, a montré que la glande digestive agissait comme un puits pour l'aluminium, régulant ainsi l'exposition à d'autres tissus (Elangovan et al., 2000). C'est également un organe important pour le stockage et la régulation d'autres métaux comme le zinc chez les gastéropodes terrestres (Dallinger and Wieser, 1984).

#### 2.2.8. Poissons

C'est probablement au sein du groupe des poissons téléostéens que les effets de l'aluminium chez les animaux sont le mieux documentés. La plus forte concentration testée de 10 000  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $\text{AlCl}_3$ ) n'a eu aucun impact sur le bilan natatoire et la croissance des deux espèces *Lates calcarifer* et *Acanthochromis polyacanthus* (Golding et al., 2015). Une étude antérieure a établi une NOEC de 9 000  $\mu\text{g L}^{-1}$  ( $\text{AlCl}_3$ ) pour trois espèces de poissons (*Sciaenops ocellatus*, *Fundulus similis* et *Cyprinodon variegatus*) (Pulley, 1950). Des travaux *in situ* ont révélé que les concentrations en aluminium dans les organes des poissons diffèrent considérablement d'une espèce à l'autre en fonction de ses besoins écologiques, de son métabolisme, de ses habitudes alimentaires et de son habitat (Mziray and Kimirei, 2016). L'espèce qui a accumulé les plus grandes quantités d'aluminium, *Lethrinus harak*, est un poisson benthique qui se nourrit principalement d'invertébrés et habite les eaux côtières, les récifs, les fonds sableux et les herbiers marins où la pollution métallique est la plus élevée (Richmond, 2002). Chez *Rastrelliger kanagurta*, la bioaccumulation d'aluminium était plus faible d'un facteur 10, or, il s'agit d'une espèce pélagique et migratrice des eaux de surface côtières (Richmond, 2002). Cela est en accord avec la littérature comme quoi certains métaux s'accumulent davantage dans les espèces de poissons benthiques que dans leurs homologues pélagiques (Roméo et al., 1999).

L'impact de l'aluminium chez les salmonidae migrateurs a fait l'objet de nombreuses publications (Monette et al., 2008; Poléo and Hytterød, 2003; Staurnes et al., 1984). Chez les salmonidae, l'exposition à l'aluminium est connue pour induire augmentation de la concentration de glucose, une réduction de l'activité de la  $\text{NaK}^+$  ATPase dans les branchies et d'une baisse de l'abondance des protéines de co-transporteurs de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$ . Le développement de la tolérance à l'eau de mer s'en retrouve grandement impacté chez les smolts, comme l'indique la perte de la capacité à réguler les

niveaux de  $\text{Cl}^-$  plasmatique (Monette et al., 2008; Poléo and Hytterød, 2003). Ces perturbations peuvent compromettre la survie des saumons dans la nature puisque la perturbation de la tolérance à l'eau de mer est compensée par une réduction de la croissance et une diminution de l'évitement des prédateurs (Handeland et al., 2004). Ces résultats rejoignent les deux mécanismes de toxicité de l'aluminium décrits chez les poissons d'eau douce : d'une part les effets ionorégulateurs impliquant des pertes de chlorure plasmatique qui prédominent à pH faible, et d'autre part les effets respiratoires qui prédominent à pH plus élevé, comme le prouve la baisse de la tension d'oxygène plasmatique due à l'obstruction des branchiers par le mucus (Gensemer and Playle, 1999).

Les zones de mélange où l'eau acide, riche en aluminium, est neutralisée, comme cela peut être le cas au niveau des estuaires, sont considérées comme les plus toxiques pour les organismes aquatiques (Rosseland et al., 1992; Teien et al., 2006). Plusieurs études ont notamment démontré qu'une solution vieillie d'aluminium était bien moins toxique qu'une solution fraîchement produite (Gensemer and Playle, 1999; Teien et al., 2006; Witters et al., 1996), comme cela peut-être le cas au niveau des zones à l'interface terre-mer. Une solution d'aluminium subit des phénomènes rapides de précipitation et de polymérisation, alors que dans une solution d'aluminium vieillie ces réactions se sont déjà produites. Les polymères d'aluminium, de formation récente, sont plus toxiques et s'insinuent plus facilement dans la couche de mucus des branchies des animaux pour s'y polymériser. Le temps entre la préparation de la solution et l'exposition est donc un facteur primordial de la toxicité de l'aluminium, et qui peut expliquer la variabilité des résultats observés chez une même espèce dans la littérature.

### 3. Le Zinc

#### 3.1. Le Zinc en tant qu'élément

Le zinc est le 27<sup>ème</sup> élément le plus abondant de la croûte terrestre où il est principalement trouvé sous forme de sulfure de zinc ( $\text{ZnS}$ ), également appelé sphalérite. Le zinc entre naturellement dans l'atmosphère *via* le vent, à partir de particules du sol, des éruptions volcaniques, des feux de forêts et des émissions d'aérosols marins. L'homme utilise le zinc dans le secteur de la sidérurgie, de la métallurgie, de la galvanisation pour l'automobile, de la construction, de l'électroménager et des équipements industriels à des fins de protection contre la corrosion. Bien que moins importants, les rejets d'origines urbaines (trafic routier, incinération d'ordures) et agricoles (alimentation porcine, engrais) sont également significatifs (IREP, 2010). Les sources de zinc à l'origine de la pollution marine comprennent les crèmes solaires, les peintures antisalissures ainsi que les rejets d'eaux usées. Néanmoins une grande partie du zinc qui pénètre dans les océans du monde provient des dépôts aériens particuliers (entre 11 000 et 60 000 tonnes chaque année) (Jickells, 1995).

La spéciation du zinc dans le compartiment aquatique est un phénomène très complexe qui dépend de nombreux facteurs abiotiques tels que la température, la concentration en matière organique dissoute ainsi que le pH. Dans le milieu marin, en l'absence de matière organique dissoute, le zinc est majoritairement sous sa forme hydratée  $\text{Zn}(\text{OH})_2$  ce qui le rend particulièrement biodisponible pour les organismes marins (Hogstrand et al., 2012). Pour un pH plus faible (inférieur à 7,5), il est d'avantage présent sous sa forme divalent  $\text{Zn}^{2+}$ . La majeure partie du zinc des eaux de surface des rivières est transportée jusque dans les estuaires et dans les zones côtières où il se lie aux particules inorganiques et organiques. Le cycle interne du zinc dans les océans est pendant longtemps resté un mystère. Il existe une forte corrélation entre le zinc et les ions silicates  $\text{SiO}_4^{4-}$ . Il a notamment été démontré que le plancton de l'océan austral est responsable de  $62 \pm 32\%$  de l'absorption mondiale de zinc (Roshan et al., 2018). Le cycle géochimique du zinc dans l'océan Atlantique est schématisé sur la Figure 6.

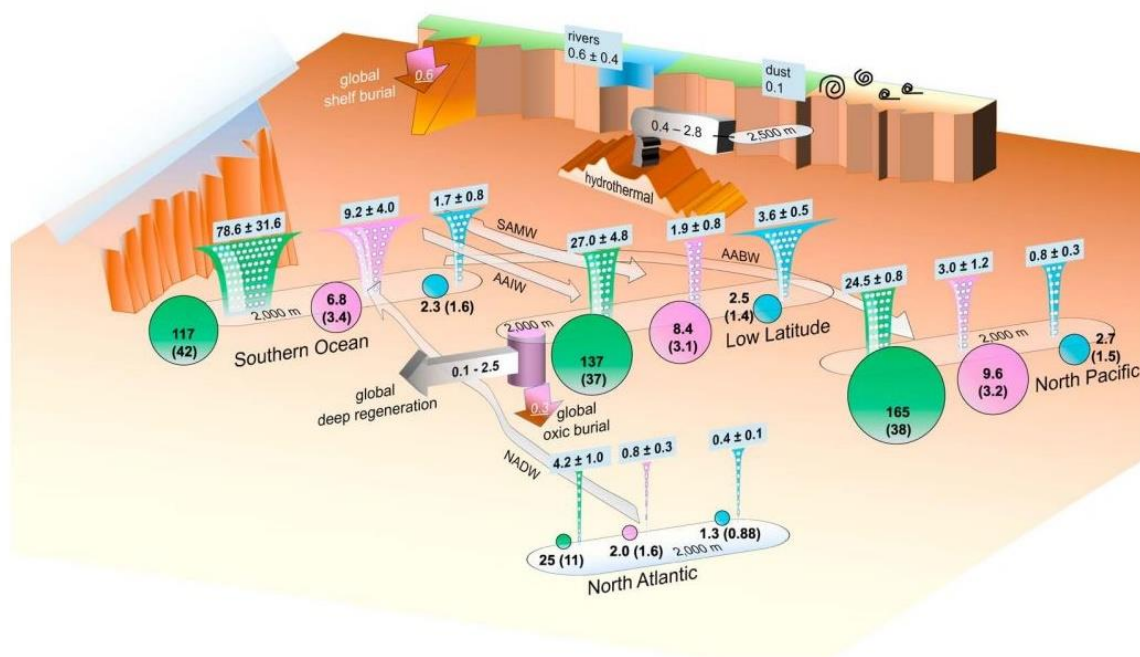


Figure 6 : Cycle global du zinc dans l'océan d'après Roshan et al. (2018). Les flux particuliers de Zn, Si, et P sont représentés comme des entonnoirs roses, verts, et cyan, respectivement, avec des valeurs au-dessus de chacun d'eux montrant leurs exportations hors de l'océan de surface sous forme de particules (les unités sont Gmol an<sup>-1</sup> pour Zn et Tmol an<sup>-1</sup> pour Si et P). La taille des cercles indique la concentration moyenne relative de Zn total et préformé (entre parenthèses) (rose ; nmol kg<sup>-1</sup>), SiO<sub>4</sub><sup>4-</sup> (vert ; μmol kg<sup>-1</sup>), et PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (cyan ; μmol kg<sup>-1</sup>) en dessous de 2 000 m dans chacune des régions. Les taux d'entrées et de sorties de Zn aux frontières (soulignés) sont également indiqués en Gmol an<sup>-1</sup>. On y voit également un schéma des flux de masse d'eau, notamment l'eau profonde de l'Atlantique Nord (NADW), l'eau de fond de l'Antarctique (AABW), l'eau intermédiaire de l'Antarctique (AAIW) et l'eau du mode subantarctique (SAIW).

L'annexe 3 rassemble les données rapportées dans la bibliographie sur les concentrations en zinc mesurées dans les eaux côtières et en plein océan. Dans ce dernier, le zinc est présent à de très faibles concentrations, entre 0,006 et 0,12 μg L<sup>-1</sup> dans les eaux surface de l'Atlantique Nord et du Pacifique

Nord, et jusqu'à  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  dans les eaux profondes (Bruland et al., 1994; Pohl et al., 1993). Les concentrations en zinc plus élevées mesurées dans les eaux de l'Antarctique proviennent de la remontée d'eaux profondes riches en zinc (Löscher, 1999). Plus on se rapproche des côtes, plus les concentrations ont tendance à augmenter. Elles sont fréquemment beaucoup plus élevées dans les estuaires et les eaux côtières qu'en plein océan, avec des concentrations qui dépassent souvent  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  (Bird et al., 1996; Law et al., 1994; Morse et al., 1993; Sheahan et al., 2007; Trefry et al., 1996). En Manche, sur les côtes anglaises, les concentrations moyennes sont toujours inférieures à  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  mais un maximum de  $23 \mu\text{g L}^{-1}$  a été enregistré dans la baie de Poole Harbour (Bird et al., 1996). Dans le Nord Cotentin (Normandie, France), les concentrations relevées sont de l'ordre de 3 à  $12 \mu\text{g L}^{-1}$ . Dans le bassin de la Seine, la contamination en zinc a atteint son apogée dans les années 1960 ( $800 \text{ mg kg}^{-1}$ ) et depuis elle est en diminution (Agence de l'eau Seine Normandie, 2008). Des analyses ont montré que le zinc fait partie des composés toujours détectés et présents à des concentrations supérieures à  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  en entrée et en sortie de stations d'épuration (INERIS, 2010). Cependant, les concentrations peuvent être beaucoup plus élevées :  $38 \mu\text{g L}^{-1}$  dans les eaux de surface de l'estuaire urbanisé de Sydney (Jahan and Strezov, 2017),  $56,55 \mu\text{g L}^{-1}$  dans la baie de Jinzhou en Chine (Wan et al., 2008),  $1\,800 \mu\text{g L}^{-1}$  dans certains cas extrêmes comme pour la baie de Sepetiba au Brésil (Barcellos, 1995),  $1\,500 \mu\text{g L}^{-1}$  dans l'estuaire de Derwent en Tasmanie (Bloom and Ayling, 1977), ou encore  $6\,980 \mu\text{g L}^{-1}$  à Ulsan en Corée du Sud (Jeong et al., 2019). Les rivières fortement polluées le long desquelles il y a beaucoup d'industries ainsi que les ports et les marinas fermées avec de faible renouvellement d'eau semblent être des facteurs importants de l'enrichissement en zinc. Concernant le sédiment, les concentrations en zinc dans les ports français sont de l'ordre de  $155 \text{ mg kg}^{-1}$  (Agence de l'eau Seine Normandie, 2008). L'arrêté du 30 juin 2020 a établi un premier seuil (N1 GEODE) à  $276 \text{ mg kg}^{-1}$  de sédiment sec analysé sur une fraction inférieure à 2 mm.

À la différence de l'aluminium, le zinc est un élément essentiel pour les êtres vivants. Il participe à plusieurs fonctions : facteurs de transcription, immunorégulation, croissance, cytoprotection, rôles antioxydants, anti-apoptotiques et anti-inflammatoires (Salgueiro et al., 2000). Dans la majorité des cas, l'ion  $\text{Zn}^{2+}$  est un cofacteur indispensable au bon fonctionnement des métalloenzymes. Il peut jouer un rôle catalytique (e.g. anhydrases carboniques, carboxypeptidases, phosphatases alcalines), co-catalytique (e.g. phospholipase C, nucléase P1, leucyl aminopeptidase) ou structurel (e.g. aspartate carbamoyltransferase, doigts de zinc). Chaque organisme possède une gamme de concentrations optimales pour les éléments essentiels comme le zinc, il ainsi peut réguler ses concentrations internes afin de satisfaire les exigences de son métabolisme. Le dépassement des limites peut entraîner des effets défavorables pour l'organisme concerné. En milieu naturel, les phénomènes de carence sont relativement rares étant donné les concentrations en zinc.

Chez l'homme, l'intoxication aiguë au zinc est extrêmement rare. Les comités de l'OMS, JECFA et EFSA recommandent une dose hebdomadaire tolérable (DHT) à ne pas dépasser de  $7 \mu\text{g kg}^{-1}$  de poids corporel. En revanche, la carence en zinc est plus répandue et induit un impact négatif sur la croissance, le développement neuronal et l'immunité. Dans les cas les plus graves les conséquences sont mortelles. La carence en zinc, causée par la malnutrition, les aliments à faible biodisponibilité, le vieillissement, ainsi que par certaines maladies, constitue un risque beaucoup plus important pour la santé humaine comparé à l'intoxication (Plum et al., 2010).

### 3.2. Toxicité du zinc chez les organismes marins

Comme précisé précédemment, le zinc est le deuxième élément majoritaire dans la constitution des anodes galvaniques à base d'aluminium (environ 5%), d'où l'importance de réaliser cette courte synthèse sur les effets du zinc chez les organismes marins. Dans l'ensemble, le zinc a été d'avantage étudié que l'aluminium. Malgré son rôle essentiel dans la physiologie des êtres vivants, à des niveaux élevés, le zinc peut être hautement toxique pour les organismes marins (Dinesh et al., 2014; Nadella et al., 2013; Wong et al., 2010). Le tableau synthétique en annexe 4 rassemble toutes les données recueillies dans la littérature et nous tacherons ici d'en résumer les grandes lignes. Pour le domaine maritime de l'Union Européenne (2019), les NOEC pour les invertébrés, les poissons et les algues ont été déterminées respectivement à 40, 40 et  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  et la valeur seuil d'exposition du milieu marin a été évaluée à  $7,8 \mu\text{g L}^{-1}$  (INERIS, 2019).

#### 3.2.1. Phytoplancton

Chez les microalgues, la concentration en zinc est un facteur déterminant de la composition des communautés en empêchant la prolifération des espèces côtières dans les environnements océaniques à faible teneur en zinc (Sunda and Huntsman, 1992). Bien que la carence en zinc soit néfaste pour le phytoplancton, de fortes doses se révèlent également toxiques. Les  $\text{CI}_{50}$  des deux diatomées *Chaetoceros calcitrans* et *Thalassiosira weissflogii* ont été évaluées à respectivement 1 240 et  $520 \mu\text{g L}^{-1}$  (Anu et al., 2018). Cependant, ces CI étaient bien plus basses lorsque le milieu était pauvre en azote ou en phosphates. La limitation en sels nutritifs facilite l'accumulation de zinc dans les organites cellulaires, ce qui entraîne une toxicité accrue chez les microalgues. Chez la diatomée *Nitzschia closterium*, la  $\text{CI}_{50}$  a été déterminée à  $65 \mu\text{g L}^{-1}$  avec une absence d'effets significatifs sur la photosynthèse et la respiration mais une stimulation de la synthèse de GSH indiquant la mise en place d'une réponse de détoxification (Stauber and Florence, 1990). Cette réponse se fait au détriment de la croissance expliquant le faible taux de division observé ce qui démontre une certaine sensibilité de l'espèce aux métaux. Wong et collaborateurs ont comparé les effets du nano oxyde de zinc (nZnO) et de l'oxyde de zinc (ZnO) chez 5 organismes marins dont deux espèces de diatomées, *Thalassiosira*



*pseudonana* et *Skeletonema costatum*. Les  $CI_{50}$  pour le ZnO étaient respectivement  $6\,650\ \mu\text{g L}^{-1}$  et  $2\,970\ \mu\text{g L}^{-1}$ , tandis qu'elles étaient de  $4\,560\ \mu\text{g L}^{-1}$  et de  $2\,360\ \mu\text{g L}^{-1}$  pour le nZnO, ce dernier s'avérant plus toxique (Wong et al., 2010). Comme le nZnO possède une solubilité plus élevée que le ZnO, il pourrait avoir libéré d'avantages d'ions  $\text{Zn}^{2+}$  pour se fixer à la surface des diatomées, entraînant ainsi une plus grande toxicité. À noter qu'en eau douce, la quantité de zinc dissous pour une même concentration de nZnO et de ZnO est similaire, mais en milieu marin la solubilité des deux molécules est modifiée par le changement de pH ce qui explique la différence de toxicité. Tout comme l'aluminium, il est établi que les diatomées sont capables d'incorporer le zinc dans leurs frustule (Ellwood and Hunter, 2000, 1999; Jaccard et al., 2009). Chez *Thalassiosira pseudonana*, les niveaux de zinc dans la paroi cellulaire ont augmenté proportionnellement à la concentration de  $\text{Zn}^{2+}$  dans le milieu de culture ce qui a conduit les auteurs à suggérer que la teneur en zinc des frustules piégés dans le sédiment pourrait être utilisée afin de suivre les changements passés des concentrations océaniques de  $\text{Zn}^{2+}$  (Ellwood and Hunter, 2000, 1999). Cinq espèces marines de cinq groupes taxonomiques différents (*Chlorella marina* de la classe des Trebouxiophycées, *Isochrysis galbana* de la classe des Prymnesiophycées, *Tetraselmis* sp de la classe des Chlorodendrophycées, *Nannochloropsis* sp de la classe des Eustigmatophycées et *Dunaliella salina* de la classe des Chlorophycées) ont montré une inhibition de croissance importante en réponse à  $50\,000\ \mu\text{g L}^{-1}$  de zinc (Dinesh et al., 2014). Seule, *Tetraselmis* a continué de croître à  $250\,000\ \mu\text{g L}^{-1}$  tandis que les cellules de *Dunaliella salina* n'ont pas survécu à une concentration supérieure à  $5\,000\ \mu\text{g L}^{-1}$ .

### 3.2.2. Macroalgues

Concernant les macroalgues marines, la bioaccumulation et la tolérance au zinc ont été étudiées chez 6 espèces de différents groupes taxonomiques (*Ulva lactuca*, *Enteromorpha flexuosa*, *Padina gymnospora*, *Sargassum filipendula*, *Hypnea musciformis* et *Spyridia filamentosa*) cultivés en laboratoire avec 5 concentrations croissantes de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ) pendant 21 jours (Amado Filho et al., 1997). Toutes les espèces sont mortes à la concentration la plus forte de  $5\,000\ \mu\text{g L}^{-1}$ , deux espèces (*U. lactuca* et *E. flexuosa*) sont mortes à  $1\,000\ \mu\text{g L}^{-1}$ , et seule *H. musciformis*, est morte à  $100\ \mu\text{g L}^{-1}$ . La plus faible concentration de zinc ayant présenté une inhibition de la croissance chez les six espèces était de  $20\ \mu\text{g L}^{-1}$ . À la concentration de  $100\ \mu\text{g L}^{-1}$ , l'algue brune *P. gymnospora* présentait le plus haut niveau d'accumulation ( $6\,488 \pm 659\ \mu\text{g g}^{-1}$ ) et *H. musciformis* le plus bas niveau ( $148 \pm 252\ \mu\text{g g}^{-1}$ ). Une autre étude a rapporté qu'une concentration de  $100\ \mu\text{g L}^{-1}$  ( $\text{ZnSO}_4$ ) avait induit une augmentation des pools de GSH chez *Enteromorpha prolifera* et *Enteromorpha linza* entraînant une diminution du rapport d'oxydoréduction, ce qui est un indicateur de la production de ROS (Malea et al., 2006; Tripathi and Gaur, 2004).

### 3.2.3. Arthropodes

L'effet du zinc chez les crustacés est bien documenté. Chez le crabe *Cancer magister*, une  $CL_{50}$  de  $456 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $\text{ZnSO}_4$ ) a été rapportée pour les larves zoé (Martin et al., 1981). Pour *Rhithropanopeus harrisi*, une concentration de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  a entraîné un retard significatif du développement larvaire à partir du stade zoé (Benijts-Claus and Benijts, 1975). Enfin, chez *Paragrapsus quadridentatus*, la  $CL_{50}$  ( $\text{ZnCl}_2$ ) de  $1\,230 \mu\text{g L}^{-1}$  rapportée pour les larves était neuf fois plus faible que pour les adultes après 96 heures d'exposition (Ahsanullah and Arnott, 1978). En effet, il semble que les adultes soient très peu sensibles au zinc étant donné les fortes doses nécessaires pour observer des effets comparativement au stade larvaire. La  $CL_{50}$  de la crevette *Pandalus montagui* a été établi à  $10\,000 \mu\text{g L}^{-1}$  tandis qu'elle était de  $100\,000 \mu\text{g L}^{-1}$  pour *Crangon crangon* (Portmann, 1968). Chez la crevette *Palaemon elegans*, la  $CL_{50}$  a été évaluée à  $166\,000 \mu\text{g L}^{-1}$  après 48 heures d'exposition et à  $26\,300 \mu\text{g L}^{-1}$  après 96 heures d'exposition. Au niveau physiologique, le zinc ( $\text{ZnCl}_2$ ) a provoqué une diminution du nombre d'hémocytes après seulement 8 heures d'exposition (Lorenzon et al., 2001). De plus, les crevettes ont montré des variations de la glycémie dépendantes de la concentration en zinc. L'activité phénoloxydase du crabe *Charybdis japonica* a également été fortement inhibée en réponse à l'exposition de  $326\,000 \mu\text{g L}^{-1}$  de zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) (Liu et al., 2006). Les crustacés non décapodes, souvent de plus petite taille, semblent plus sensibles au zinc. Chez le copépode *Nitocra spinipes*, la  $CL_{50}$  ( $\text{Zn}^{2+}$ ) après 96 heures d'exposition a été déterminée à  $1\,450 \mu\text{g L}^{-1}$  (Bengtsson, 1978). Pour le copépode *Tigriopus japonicus* et l'amphipode *Elasmopus rapax*, les  $CL_{50}$  ( $\text{ZnO}$ ) ont été évaluées à respectivement  $430 \mu\text{g L}^{-1}$  et  $370 \mu\text{g L}^{-1}$  (Wong et al., 2010). Des concentrations supérieures à  $0,13 \mu\text{g L}^{-1}$  ont réduit le taux de ponte du copépode *Acartia tonsa* et la survie des nauplii a également été affecté négativement dès  $1,3 \mu\text{g L}^{-1}$  avec 100 % de mortalité à  $13 \mu\text{g L}^{-1}$  (Sunda et al., 1987). *Acartia tonsa* étant une espèce estuarienne, certains sites pollués présentent des concentrations en zinc suffisantes pour affecter la survie et la reproduction de l'espèce.

### 3.2.4. Echinodermes

Chez l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus*, la  $CL_{50}$  ( $\text{ZnSO}_4$ ) des larves a été rapportée à  $151 \mu\text{g L}^{-1}$  (Nadella et al., 2013). Chez la même espèce, l'exposition des larves à  $117 \mu\text{g L}^{-1}$  de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ) pendant 96 heures a entraîné une inhibition des taux d'absorption du calcium incluant une inhibition de l'activité de la  $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$  (Tellis et al., 2014). Une exposition de 96 heures à seulement  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $\text{ZnCl}_2$ ) a suffi à baisser significativement la mobilité des spermatozoïdes et le développement précoce des œufs de l'oursin *Abracia lixula* (Castagna et al., 1981). En revanche, les individus adultes maintenus dans des aquariums avec une concentration de  $1\,000 \mu\text{g L}^{-1}$  n'ont pas été affectés après 20 jours d'exposition.

### 3.2.5. Mollusques

Parmi les mollusques, on recense de nombreuses études sur l'effet du zinc chez les ostreidae et les mytilidae. Une concentration de  $125 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $\text{ZnSO}_4$ ) a entraîné un retard dans la fixation des larves de *Crassostrea gigas* (Boyden et al., 1975). Une  $\text{CL}_{50}$  de  $119 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $\text{ZnSO}_4$ ) a été rapportée pour le développement larvaire de *C. gigas* (Martin et al., 1981), et chez une espèce proche, *Crassostrea virginica*, la  $\text{CL}_{50}$  ( $\text{ZnCl}_2$ ) a été déterminée à  $205 \mu\text{g L}^{-1}$  (MacInnes, 1981). Dans une autre étude,  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $\text{ZnSO}_4$ ) ont engendré une hausse de la mortalité et de l'incidence des anomalies larvaires de *C. gigas* (Brereton et al., 1973). Les  $\text{CL}_{50}$  ( $\text{ZnSO}_4$ ) des premiers stades larvaires de *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis* et *Mytilus trossolus* ont été établies respectivement à 175, 172 et  $135 \mu\text{g L}^{-1}$  (Martin et al., 1981; Nadella et al., 2013). Parmi les 10 espèces de bivalves étudiés, Markich (2021) a constaté que *C. gigas* était l'espèce la plus sensible avec une  $\text{CL}_{50}$  de  $46 \mu\text{g L}^{-1}$  et *I. crenatus* était l'espèce la plus résistante avec une  $\text{CL}_{50}$  de  $190 \mu\text{g L}^{-1}$ . Pour *C. gigas* la NOEC a été évaluée à  $11,2 \mu\text{g L}^{-1}$  et pour *I. crenatus* à  $47,4 \mu\text{g L}^{-1}$ . Les cinq espèces de bivalves de la sous-classe des Pteriomorphia (huîtres, les moules et Pectinidae) se sont avérées être le groupe le plus sensible au zinc comparativement aux bivalves de la sous-classe des Heteroconchia (coques et palourdes) (Markich, 2021). Watling et collaborateurs (1982) ont évalué les  $\text{CL}_{50}$  de *C. gigas*, *Saccostrea cucullata* et *Striostrea margaritacea* à respectivement 80, 45 et  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  pour des larves de 3-6 jours et à 95, 85 et  $85 \mu\text{g L}^{-1}$  pour des larves de 13-16 jours, ce qui suggère une tolérance accrue au zinc pour les stades larvaires plus avancés (Watling, 1982).

Concernant des stades de vie plus avancées, des concentrations de 250 et  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  ont réduit la croissance des naissains de *C. gigas* à plus de 50 % (Boyden et al., 1975). Dans une autre étude, la  $\text{CL}_{50}$  a été évaluée à  $497 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $\text{ZnCl}_2$ ) après 10 semaines d'exposition entraînant une surexpression des gènes des métallothionéines, signifiant la mise en place d'une réponse de détoxification (Devos et al., 2012). Chez les bivalves adultes, des  $\text{CL}_{50}$  de l'ordre de 5 000 et 6 000  $\mu\text{g L}^{-1}$  ont été rapportées chez *Mytilus edulis* et *Perna viridis* ce qui démontre la résistance au zinc développée par rapport au stade larvaire (Amiard-Triquet et al., 1986; Chan, 1988). Parmi les effets recensés, on peut citer une inhibition de l'activité de la  $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$  de la membrane plasmique des cellules branchiales de *M. galloprovincialis* ou encore une inhibition de l'activité de la glutathion réductase et une régulation à la hausse des défenses antioxydantes chez *Perna perna* (Franco et al., 2006; Viarengo et al., 1993). Pour de faibles doses de zinc (0,13 et  $1,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ), l'activité phagocytaire des hémocytes de *Mya arenaria* a été stimulée mais à des niveaux d'exposition plus élevés (13 et  $130 \mu\text{g L}^{-1}$ ), l'activité phagocytaire des hémocytes a significativement diminué (Brousseau et al., 1999). Mazorra et al. (2002) ont également démontré une diminution de l'activité phosphatase acide chez *Scrobicularia plana* exposé pendant 48 heures à de fortes concentrations ( $\text{Zn}^{2+}$ ) de l'ordre de  $30 \text{ mg L}^{-1}$  (Mazorra et al., 2002).

Chez le gastéropode *Haliotis tuberculata*, l'exposition des hémocytes *in vitro* pendant 24 heures à du zinc sous la forme de  $\text{ZnCl}_2$  a engendré une diminution significative du nombre d'hémocytes viables, une réduction significative de l'activité de la phosphatase acide et de l'activité phagocytaire ainsi qu'une production de ROS (Mottin et al., 2010). Les concentrations en zinc sans effet sur les embryons de *Haliotis rufescens* ont été rapportées à  $39 \mu\text{g L}^{-1}$  pour une exposition de 48 heures et à  $19 \mu\text{g L}^{-1}$  pour une exposition de 9 jours, et les  $\text{CL}_{50}$  ont été respectivement évaluées à  $68 \mu\text{g L}^{-1}$  et  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  (Hunt and Anderson, 1989). Dans une autre étude, l'exposition au zinc a montré que *Haliotis discus hannai* avait un faible potentiel d'accumulation du métal. De plus, les auteurs n'ont pas constaté d'impact sur la croissance à une concentration de  $300 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $\text{ZnCl}_2$ ), mais l'induction significative de métallothionéine a indiqué que l'ormeau était capable de détoxifier efficacement le zinc (Guo et al., 2013).

La classe des céphalopodes a également fait l'objet d'une étude dans laquelle les premiers stades de vie de la seiche, *Sepia officinalis*, ont été exposées à plusieurs concentrations en zinc ( $\text{ZnCl}_2$ ). Après deux semaines d'exposition, la  $\text{CL}_{50}$  a été évaluée entre 230 et  $442 \mu\text{g L}^{-1}$ , avec l'observation de réductions significatives de la croissance associées à des perturbations enzymatiques et du comportement de prédation après 5 semaines d'exposition à partir d'une concentration de  $108 \mu\text{g L}^{-1}$  (Le Pabic et al., 2015). Cette perturbation du comportement est cohérente avec la forte accumulation de zinc au niveau de la tête, précédemment mise en évidence avec du  $^{65}\text{Zn}$  chez la seiche adulte et qui suggère une perturbation du système nerveux central et/ou des organes de la vision induite par le zinc (Bustamante et al., 2002).

### 3.2.6. Poissons

Chez les poissons téléostéens, la plupart des études se sont penchées sur les teneurs en zinc des espèces commerciales pêchées pour la consommation humaine (Celik and Oehlenschläger, 2005; Mziray and Kimirei, 2016; Roméo et al., 1999; Willis and Sunda, 1984). Willis et al. (1984) ont étudié le transfert trophique du  $^{65}\text{Zn}$  pour mesurer la contribution de l'alimentation dans la bioconcentration du zinc chez les deux espèces *Gambusia affinis* et *Leiostomus xanthurus*. Pour cela, ils ont nourri les poissons avec des *Artemia* sp, eux-mêmes nourris avec des *Chlamydomonas* sp exposés au zinc en continue. Au final, la nourriture a représenté près de 80% de l'accumulation totale de zinc par les poissons mettant en avant le rôle de l'alimentation dans les processus de biomagnification du zinc (Willis and Sunda, 1984). L'injection de zinc chez la plie, *Pleuronectes platessa*, a induit une hausse des niveaux de métallothionéines hépatiques (Overnell et al., 1987). L'exposition du poisson *Oryzias melastigma* à  $4\,000 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $\text{ZnO}$ ) a induit une régulation significative des métallothionéines, de la superoxyde dismutase (SOD) et la production de protéines de choc thermique 70 (HSP70) a été

multipliée par deux ou par quatre dans tous les essais, témoignant d'un stress cellulaire élevé (Wong et al., 2010).

Ainsi, pour résumer, les 2 principaux métaux contenus dans une anode galvanique à base d'aluminium montrent une grande diversité d'effets biologiques en fonction des concentrations touchant diverses activités physiologiques. Ces activités pouvant être variés en fonction des espèces étudiées. Les premiers stades de vie des mollusques apparaissent comme relativement sensibles au zinc avec des effets observées dès 100 µg L<sup>-1</sup>.

## 4. Biologie des modèles d'études

Nous tacherons dans cette partie de décrire la biologie des différents modèles biologiques étudiés au cours de ces travaux de recherche.

### 4.1. Les Mollusques

En termes de diversité, les mollusques sont le deuxième embranchement du règne des métazoaires derrière les arthropodes. Le nombre total d'espèces n'est pas connu avec précision et oscille entre 81 000 et 92 000 selon les estimations (MolluscaBase). Grâce à l'innovation évolutive qu'est la coquille de carbonate de calcium, les mollusques sont l'un des groupes les mieux représentés dans le registre fossile (plus de 100 000 espèces décrites). Les plus anciennes traces de mollusque datent de plus de 600 millions d'années. C'est un groupe ancien qui s'est diversifié très vite à l'échelle des temps géologiques puisque dès l'ordovicien moyen il y a 460 millions d'années, toutes les classes actuelles sont présentes. Les mollusques sont des triploblastiques, bilatéraux, protostomiens et lophotrochozoaires, ces derniers étant caractérisés par un stade larvaire de type trochophore. On dénombre huit classes distinctes dont la plus diversifiée est de loin celle des gastéropodes (Figure 7). Les relations entre les différentes classes sont complexes et quelque peu controversées, bien que des études moléculaires aient permis d'en résoudre certaines il subsiste plusieurs théories concurrentes sur les relations évolutives entre les groupes, c'est pourquoi le choix a été fait ici de présenter un arbre sous forme de polytomie.

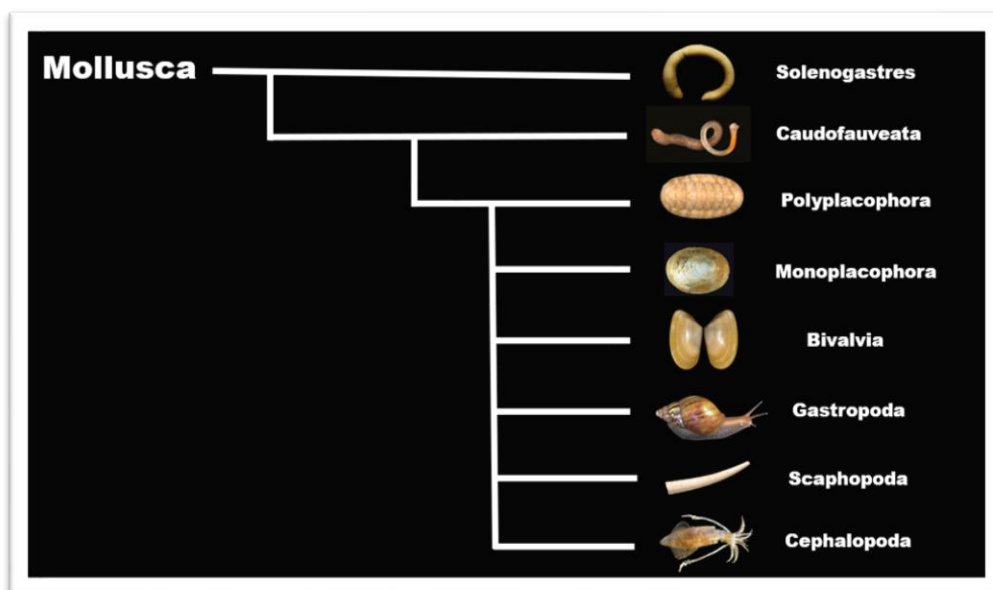


Figure 7 : Classification des différentes classes de mollusques sous forme de polytomie.

Les Mollusques se caractérisent par la présence d'un pied ventral musculaire prenant différentes formes en fonction des classes, d'une masse viscérale dorsale contenant les organes internes, d'un manteau constitué d'un épiderme capable de sécréter une coquille de carbonate de calcium ainsi que d'un organe râpeur servant à l'alimentation dans la partie antérieure du tube digestif nommé la radula (absent chez tous les bivalves et certaines groupes gastéropodes). Dans le cadre de ces travaux, nous nous intéressés à deux espèces de mollusques, un bivalve avec l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) et un gastéropode avec l'ormeau européen, *Haliotis tuberculata* (Linnaeus, 1758) (Tableau I).

Tableau I : Position systématique de l'huître creuse *Crassostrea gigas* et de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata* d'après World Register of Marine Species.

|               | Huître creuse                             | Ormeau européen                              |
|---------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Embranchement | Mollusca                                  | Mollusca                                     |
| Classe        | Bivalvia                                  | Gastropoda                                   |
| Sous-classe   | Pteriomorpha                              | Vetigastropoda                               |
| Ordre         | Ostreoida                                 | Lepetellida                                  |
| Super-famille | Ostreidea                                 | Haliotoidea                                  |
| Famille       | Ostreidae                                 | Haliotidae                                   |
| Genre         | <i>Crassostrea</i>                        | <i>Haliotis</i>                              |
| Espèce        | <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1793) | <i>Haliotis tuberculata</i> (Linnaeus, 1758) |

Les gastéropodes et les bivalves marins sont principalement benthiques une fois adultes et présentent la plupart du temps des stades larvaires planctoniques afin de disperser (Waller, 1981). La première forme larvaire, la larve trochophore, nage avec une bande de grandes cellules ciliées appelée prototroche (Nielsen, 2005). La larve trochophore sécrète ensuite les matériaux de la coquille,

se transforme en larve véligère, et nage avec le vélum dérivé du prototroche, avant de se fixer pour une métamorphose en adulte benthique.

#### 4.1.1. L'huître creuse *Crassostrea gigas*

##### 4.1.1.1. Généralités

L'huître creuse, *Crassostrea gigas*, est originaire du Nord-Ouest Pacifique. Elle est élevée depuis plusieurs siècles au Japon puisque les premières traces d'ostréiculture remontent au XVI<sup>ème</sup> siècle dans la baie d'Hiroshima (Miossec et al., 2009). À partir des années 1920, l'huître creuse est introduite dans certains pays et c'est à la fin des années 1960 qu'elle arrive en France à des fins d'aquaculture (Mann et al., 1991). Sa capacité d'adaptation à diverses conditions environnementales et aux fluctuations de température, associée à sa croissance rapide et à sa résistance aux zones fortement perturbées, ont fait de l'huître creuse une espèce idéale d'un point de vue économique. De nos jours, elle représente la grande majorité de la production conchylicole sur le territoire et la France est le premier producteur, consommateur et exportateur d'huîtres en Europe (Gilbert and Duret, 2014). De la Manche à la Méditerranée, la production ostréicole française est évaluée à 130 000 tonnes en moyenne. La production normande est estimée à 25 000 tonnes d'huîtres creuses lors de la campagne 2020-2021 (soit 20 % de la production nationale).

De par leur mode d'alimentation impliquant la filtration de grands volumes en continue, les bivalves sont amenés à concentrer les contaminants de l'environnement dans leur organisme. La plupart des espèces sont considérées comme bioaccumulatrices. Cette particularité fait des bivalves des organismes très étudiés pour l'évaluation et le suivi des milieux en écotoxicologie. Les bivalves sont essentiels au développement, au fonctionnement et à la durabilité des écosystèmes marins côtiers, et leur disparition compromet l'intégrité des écosystèmes (Vaughn and Hoellein, 2018). Étant un modèle d'étude d'intérêt écologique et économique, l'huître creuse est une espèce très étudiée dans la bibliographie, notamment pour estimer les concentrations en métaux dans le milieu marin (Geffard et al., 2001). En France depuis 2008, le Réseau d'Observation de la Contamination Chimique du littoral (ROCCH) a pris la suite du Réseau National d'Observation (RNO) qui existait depuis 1974. La surveillance du ROCCH s'effectue sur trois matrices que sont l'eau, le sédiment et les bivalves dont l'huître creuse. Dans la communauté scientifique, le nom de genre de l'espèce est sans cesse disputé entre *Crassostrea* et *Magallana*. Dans la suite de ce manuscrit le nom de *Crassostrea gigas* sera employé pour plus de clarté.

#### 4.1.1.2. Anatomie et nutrition

Comme la majorité des bivalves, l'huître creuse possède un muscle adducteur qui lui permet de s'ouvrir et de se fermer afin de se protéger des prédateurs et des périodes d'exondation (Figure 8). De plus, elle est dotée d'un manteau qui recouvre sa chair et assure un rôle de protection.

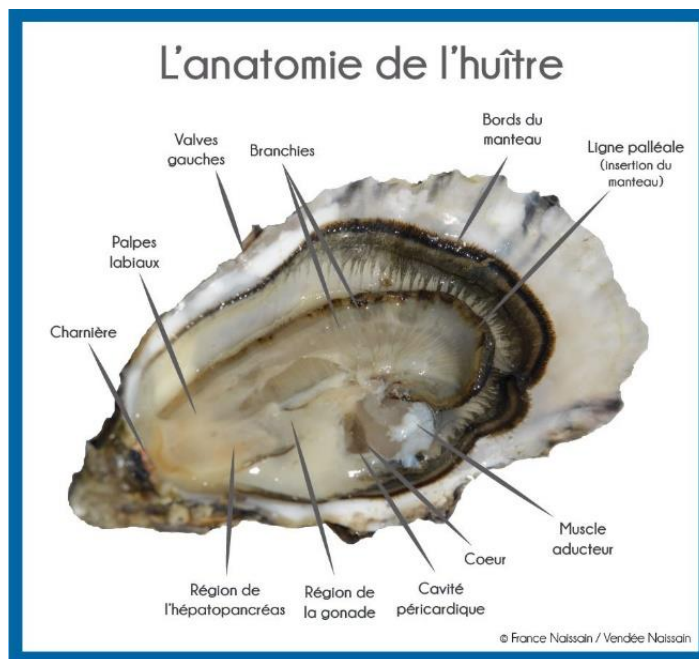


Figure 8 : Quelques éléments de l'anatomie de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. © France Naissain - Vendée Naissain.

L'huître creuse vit dans les écosystèmes littoraux dont les différentes sources de matière organiques sont caractérisées par une importante variabilité spatiale et temporelle conditionnée par l'hydrodynamisme. La période de l'année, sa localisation sur le littoral, sa position dans la colonne d'eau et son temps d'immersion par rapport à la zone de balancement des marées sont des facteurs régulant la disponibilité de nourriture pour le bivalve (Ruesink et al., 2003). L'huître est un filtreur microphage qui retient les particules entre 5 et 100  $\mu\text{m}$  grâce à ses deux paires de branchies qui effectuent une double fonction d'alimentation et de respiration *via* l'extraction de l'oxygène (Barillé et al., 1993). Un premier tri grossier est effectué au niveau du bord du manteau puis les particules ayant franchies cette première barrière sont triées et enrobées de mucus au niveau des branchies. Les particules sont alors acheminées jusqu'à la bouche, elle-même bordée de quatre palpes labiaux impliqués dans le triage. Si les particules ne conviennent pas d'un point de vue de la taille ou de la nature, elles sont enrobées de mucus et rejetées le long du sillon alimentaire puis éliminées sous forme de pseudo-fèces (Gosling, 2015). Le système digestif commence au niveau de la bouche et se poursuit par un court œsophage qui conduit jusqu'à l'estomac. La matière non assimilée est ensuite rejetée sous forme de fèces qui résultent des processus de digestion, en fonction d'une efficacité d'absorption, mais aussi en fonction du temps de transit intestinal et du volume stomacal (Barillé, 1995).



L'utilisation de traceurs isotopiques révèle que le phytoplancton pur constitue une source de nourriture préférentielle pour les jeunes huîtres alors que les plus âgées ont accès à une alimentation plus variée présente dans les eaux à forte charge particulaire (phytoplancton, microphytobenthos remis en suspension, bactéries, protistes flagellés, matière organique détritique et microzooplancton) (Malet, 2005).

#### 4.1.1.3. Système immunitaire

Comme pour tous les invertébrés, les bivalves ne possèdent pas de système immunitaire acquis permettant la production d'anticorps, l'absence d'immunoglobulines ne permet pas la mémorisation qui fait suite à une première rencontre avec un pathogène. L'immunité est donc seulement de type inné, non-adaptable, et basé sur un ensemble de facteurs cellulaires et humoraux. L'immunité innée est principalement assurée par les cellules circulantes de l'hémolymphe, les hémocytes (Figure 9), qui sont qualifiées de cellules « immuno-compétentes » de par leur forte implication dans divers processus comme la phagocytose avec l'encapsulation des particules étrangères, l'infiltration au sein de tissus infectés ou lésés, la sécrétion de peptides anti-microbiens, la réparation des lésions tissulaires et coquillères, le transport des nutriments, la digestion, la production de ROS et enfin la cascade phénoloxydase (Galloway and Depledge, 2001; Pollero et al., 1985; Suzuki et al., 1991).

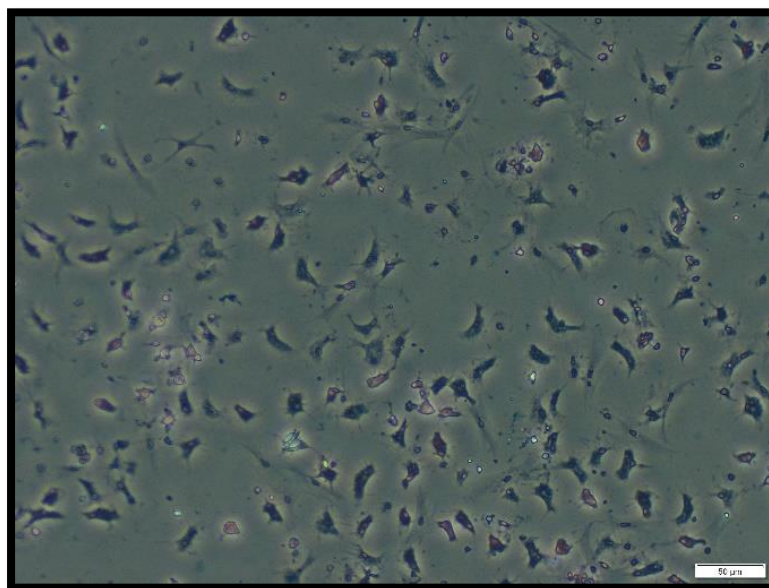


Figure 9 : Observation en microscopie optique des hémocytes de *Crassostrea gigas*. Photo : © A. Levallois.

La classification des types cellulaires d'hémocytes chez les mollusques bivalves a fait l'objet de multiples études depuis le début des années 1970 et la recherche sur les hémocytes a été entravée par l'absence de consensus sur leur classification. En se basant sur des critères morphologiques, enzymatiques, physicochimiques et de fonctions biologiques, on classifie désormais les hémocytes en

trois grandes catégories en fonction de leur taille et de leur granulosité : (i) les granulocytes qui constituent une population cellulaire homogène ; (ii) les hyalinocytes qui ne présentent pas de granules au sein de leur cytoplasme ; (iii) et enfin les hémocytes de type blaste qui présentent un rapport N/C (noyau/cellule) élevé, qui sont de petite taille et possèdent des faibles niveaux d'activité biologique (De la Ballina et al., 2022). Les cellules blastiques peuvent être considérées comme des précurseurs d'hémocytes en raison de leurs paramètres morphométriques et de leur faible contenu en organelles. Chez les bivalves comme *C. gigas*, les granulocytes sont généralement considérés comme le type cellulaire le plus abondant. En fonction des espèces de mollusque, pour chacune des catégories, un nombre variable de sous-types hémocytaires peut être déterminé en fonction de l'affinité des cellules pour des colorants spécifiques (Hine, 1999). Chez l'huître, les granulocytes qui contiennent des enzymes hydrolytiques et oxydatives, sont sous-classés en acidophiles/éosinophiles, basophiles et neutrophiles. Cheng a suggéré que l'apparition de divers types de granules pourrait être liée à des processus de différenciation et de maturation ; en particulier, les granules basophiles qu'on a supposé être des granules immatures qui une fois mures devenaient acidophiles (Cheng, 2013).

La relative simplicité du système immunitaire des bivalves en fait un moyen sensible et accessible pour surveiller les effets des contaminants environnementaux, ainsi que les interactions complexes qui affectent la résistance des hôtes (Galloway and Depledge, 2001). Et pour cela, les hémocytes sont des cibles privilégiées pour visualiser les effets des polluants sur le système immunitaire. Ainsi, la mesure de l'activité phagocytaire des hémocytes a largement été utilisée en tant que biomarqueur d'immunotoxicité (Bresler et al., 1999; Brousseau et al., 1999).

#### 4.1.1.4. Reproduction et cycle de vie

L'huître creuse est hermaphrodite successif à tendance protandre (Guo et al., 1998). Comme chez tous les ostreidae, la gonade est non différenciée, diffuse et se compose de tubules recouvrant la face externe de la glande digestive. La différenciation des gamètes est centripète, avec des cellules germinales en périphérie et des gamètes matures refoulées vers la lumière des tubules. Au cours de la gamétogenèse, le tissu de réserve situé entre les tubules gonadiques se résorbe, du fait de son soutien important dans ce processus coûteux en énergie (Berthelin et al., 2000; Franco et al., 2008). La reproduction est régulée par une combinaison de facteurs abiotiques (température, salinité, ressources alimentaires, lumière) et de facteurs endogènes (génotype, réserves énergétiques, sécrétions neuroendocrines). La température de l'eau et la disponibilité de la nourriture dans la colonne d'eau sont les 2 principaux paramètres qui régulent le processus de reproduction des huîtres. La température accélère ou retarde le développement des gonades tandis que la disponibilité de la nourriture détermine principalement la qualité et la quantité des gamètes (Kang et al., 2000). La maturation des gamètes commence à la fin de l'hiver, généralement pour des températures d'eau

avoisinant les 8 à 11°C. Habituellement, on définit plusieurs stades de gamétogenèse pour chaque individu afin de suivre les changements cycliques des tissus reproducteurs. Dans ce travail de thèse, les stades ont été déterminés comme décrit dans le Tableau II : stade 0 : repos sexuel ; stade I : Début de gamétogenèse ; stade II : Gamétogenèse active ; stade IIIa : Maturité sexuelle ; stade IIIb : début de ponte ; stade IIIc : Ponte avancée.

Tableau II : Description des stades de gamétogenèse de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

| Chiffre | Nom                                    | Description des stades                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|---------|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0       | Repos sexuel                           | Ilots peu discernables<br>Sexe impossible à déterminer<br>Présence de tissu conjonctif                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| I       | Début de gamétogenèse                  | Mitoses goniales<br>Sexe souvent difficilement déterminable<br>1 seule catégorie de cellule (ovogonies ou spermatocytes)                                                                                                                                                                                                                                      |
| II      | Gamétogenèse active                    | Présence de tous types de cellules (spermatocytes, spermatides, spermatozoïdes ou ovogonies, ovocytes)<br>Moins de 50% de gamètes matures<br>Sexe facilement distinguable                                                                                                                                                                                     |
| IIIa    | Maturité sexuelle                      | Tubules gonadiques avec un volume maximal<br>Grande partie des gamètes matures                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| IIIb    | Maturité sexuelle<br>+ début de pontes | Grande majorité des gamètes matures (90% de la surface)<br>Début de ponte (les gamètes se dédensifient au niveau des canaux déférents)                                                                                                                                                                                                                        |
| IIIc    | Pontes avancées                        | Au moins 50% des gamètes expulsés<br>Région gonadique déstructurée (comme dégonflée)<br>Absence de tissu conjonctif<br>Sexe parfois difficile à déterminer → chercher les gamètes résiduels (les spermatozoïdes s'évacuant mieux que les ovocytes, si on ne retrouve absolument pas de gamètes en stade IIIc c'est qu'il y a des chances que ce soit un mâle) |

Une fois la maturation arrivée à son terme vers le mois de juillet, une température minimale de 20°C est nécessaire pour induire l'émission des gamètes des mâles et des femelles (Kang et al., 2000). Généralement, on observe plusieurs pics de pontes au cours de l'été. La fécondation est externe et se fait directement dans la colonne d'eau après l'émission des gamètes. Les premières divisions cellulaires débutent avec l'émission des globules polaires ce qui signifie le bon déroulement de la fécondation. Les embryons se développent rapidement en larve trochophore (6 heures après la fécondation) avec un mode de vie pélagique, puis en larve-D (24 heures après la fécondation) nommée ainsi en raison de sa forme (Figure 10).

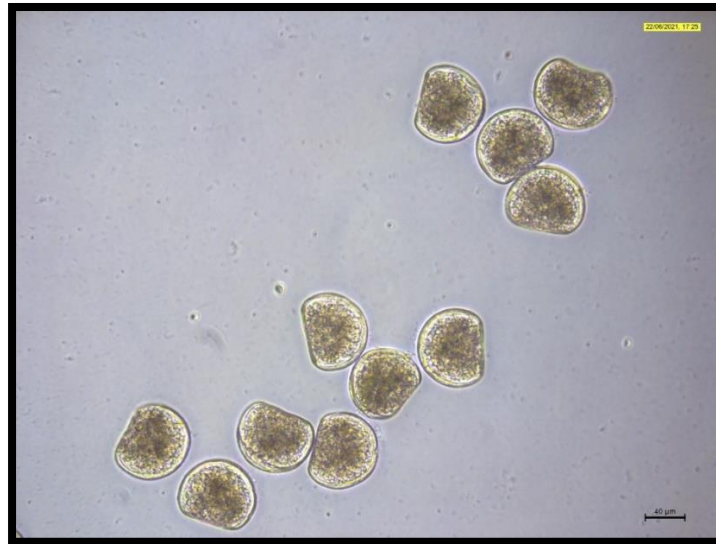


Figure 10 : Larves D normales d’huître creuse observées au microscope (X400) 24 heures après le début de la fécondation. Photo : © A. Levallois.

La phase larvaire pélagique se déroule entre 15 et 25 jours après quoi l’huître se métamorphose en se fixant à un substrat et adopte un mode de vie de benthique qu’on appelle naissain au début de sa croissance. Les huîtres deviendront ensuite matures à leur tour en un peu moins de deux ans. La Figure 11 schématise le cycle de vie complet de l’huître creuse. La phase larvaire est généralement le stade de vie le plus sensible aux contaminants c’est pourquoi beaucoup d’études se sont intéressées à l’effet des contaminants sur le développement des larves, la fixation et la métamorphose (Boyden et al., 1975; Brereton et al., 1973; Watling, 1982).

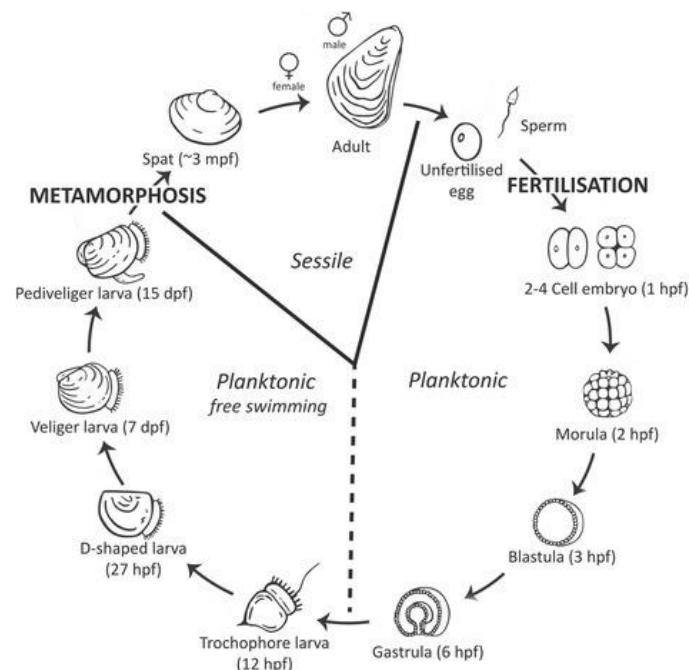


Figure 11 : Cycle de vie de l’huître creuse *Crassostrea gigas*. Hpf : heures post fertilisation ; dpf : days post fertilisation ; mpf : month post fertilisation. Modifié d’après (Vogeler et al., 2016).

#### 4.1.2. L'Ormeau Européen *Haliotis tuberculata*

##### 4.1.2.1. Généralités

Les Ormeaux forment la famille des Haliotidae au sein de la classe des gastéropodes. Ils appartiennent à la sous-classe des Vetigastéropodes caractérisés par une unique paire de tentacules céphaliques et par une coquille percée d'ouvertures secondaires et un corps asymétrique, avec une coquille possédant une ouverture généralement ovale. Il existe une soixantaine d'espèces à travers le monde et leur nom générique *Haliotis*, donné par Linné en 1758, signifie oreille de mer (Bevelander, 1988; Geiger, 1999). De par leur taille, les ormeaux sont depuis longtemps une source de nourriture pour les populations humaines. Sa chair étant très prisée, notamment en Asie, une pêche intensive a conduit au déclin des stocks d'ormeaux et à la réduction de leur aire de répartition. Désormais, l'élevage d'ormeaux est développé dans de nombreux pays et une quinzaine d'espèces sont commercialisées. La seule espèce d'Haliotidae présente en Europe est l'ormeau européen *Haliotis tuberculata*. Sa zone de répartition s'étend de la mer du Nord à la Méditerranée. Les densités sont importantes dans la région du Cotentin ainsi qu'autour des îles anglo-normandes mais on constate des mortalités dans les années 2000 en raison d'une bactérie. Adhérent fortement aux rochers et aux anfractuosités par son pied musculeux très puissant, on le retrouve dans les zones rocheuses depuis la zone de balancement des marées jusqu'à une quinzaine mètres de profondeur (Clavier and Chardy, 1989). La coquille de l'ormeau européen peut atteindre 100 mm de long et 65 mm de large. Son espérance de vie est estimée à plus de 15 ans.

Les ormeaux ont fait l'objet de nombreuses études. Certaines visent à suivre l'évolution des populations des différentes espèces et à réglementer la pêche en conséquence, d'autres ont pour objectif d'augmenter la productivité des élevages et enfin, une partie de la recherche s'intéresse aux processus de biominéralisation des ormeaux ainsi qu'à leur valeur bioindicatrice en tant que modèle en écotoxicologie. France Haliotis est l'une des seules sociétés sur le territoire à avoir pérennisé l'élevage de l'ormeau.

##### 4.1.2.2. Anatomie et nutrition

Tous les Haliotidae sont aplatis avec une grande ouverture ovale. La couleur externe de la coquille est dépendante de leur régime alimentaire en macroalgue (Bevelander, 1988). Une des caractéristiques principales de l'ormeau est sa coquille perforée de trous permettant la circulation de l'eau de mer pour la respiration, l'excrétion et l'émission des gamètes. L'ormeau grandit progressivement tout au long de sa vie mais sa croissance ralentit à partir d'une certaine taille. Sur sa coquille on peut noter la présence d'un certain nombre de stries appelées anneaux de croissance (Sakai, 1960). Ces anneaux résultent d'une interruption de la croissance de la coquille provoquée par

des changements de la température de l'eau ou de la disponibilité de la nourriture. La coquille est formée par des cellules spécialisées du manteau qui sécrètent les précurseurs des composants minéraux et organiques de la coquille. La couche interne (nacrée) est composée d'aragonite et la couche externe (prismatique) de cristaux de calcite. Sur la couche nacrée on note la présence de deux marques bien visibles qui sont les points d'ancrage des muscles adducteurs.

L'ormeau possède un pied musculaire particulièrement développé et lubrifié permettant le déplacement sur tout type de surface. Lorsque l'animal se déplace, on observe ses tentacules céphaliques ainsi que ses nombreux organes sensoriels parcourant l'épipodium, une extension sensorielle du pied (Bevelander, 1988). La masse viscérale de l'ormeau est protégée par l'ensemble de la coquille et du pied. On y retrouve les branchies, le cœur, l'intestin ainsi que la gonade et la glande digestive étroitement imbriquées (Figure 12). Les deux branchies sont composées de lamelles qui partent de l'axe central nommé le rachis. Elles assurent les fonctions de transport de l'hémolymphe et d'échanges gazeux.

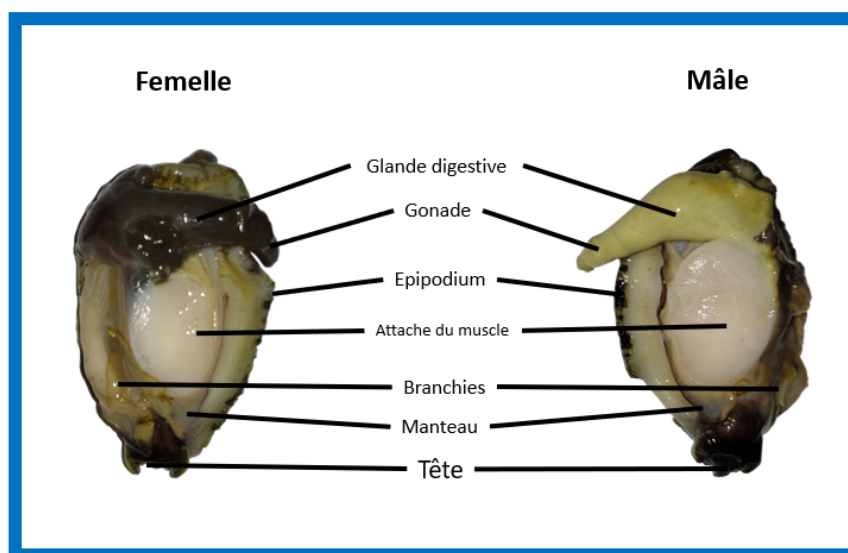


Figure 12 : Quelques éléments de l'anatomie de de l'ormeau *Haliotis tuberculata*. En période de maturation, la gonade est claire chez le mâle, alors qu'elle est plus foncée (verdâtre) chez la femelle.

Les ormeaux sont des herbivores strictes, les juveniles se nourrissent de biofilms de diatomées en raclant le substrat tandis que les adultes broutent les macroalgues à l'aide de leur radula, avec une préférence pour les rhodophytes. Dans les élevages, *Haliotis tuberculata* est généralement nourri avec *Palmaria palmata* qui permet d'accélérer la croissance (Basuyaux, 1997). Lorsqu'il ne se nourrit pas ou ne se déplace pas, l'ormeau est rétracté et fixé à un substrat où sa coquille le protège entièrement des prédateurs.

#### 4.1.2.3. Système immunitaire

L'analyse microscopique et en cytométrie en flux des hémocytes de *H. tuberculata* révèle que la grande majorité sont de type hyalinocyte présentant de nombreuses vacuoles, de grands dépôts de glycogène, des inclusions lipidiques et des compartiments acides (Travers et al., 2008). Les auteurs ont également mis en évidence la présence d'hémocytes de type blaste avec des rapports nucléocytoplasmique élevés (Hine, 1999). De plus, leur faible activité phagocytaire et l'absence de glycogène ou de dépôts lipidiques indiquent que ce sont des cellules immatures. Chez l'espèce proche, *Haliotis diversicolor*, la cytométrie en flux et la microscopie optique ont également révélé les trois types hémocytaires : granulocytes, hyalinocytes et cellules blastiques (Figure 13). Les hyalinocytes sont les cellules les plus étalées et les plus abondantes, tandis que les granulocytes sont de taille intermédiaire et contiennent de nombreux granules dans le cytoplasme (Hong et al., 2019). Ces derniers s'avèrent être les plus impliqués dans les processus de phagocytose et d'activité oxydative.

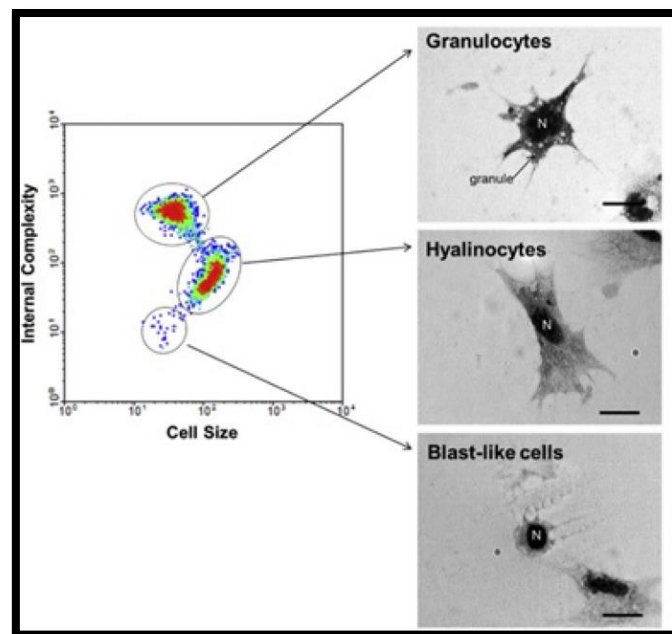


Figure 13 : Représentation de trois sous-populations hémocytaires chez *Haliotis diversicolor* à partir d'analyses en microscopie optique et en cytométrie de flux. Barre d'échelle de 10 µm. D'après (Hong et al., 2019).

Depuis 1997, les stocks naturels d'ormeaux connaissent des épisodes de mortalité massive (60 à 80%) le long des côtes françaises, attribués à des virus du genre *Vibrio* (Nicolas et al., 2002; Travers et al., 2008). Il a été mis en évidence que le statut immunitaire diminuait parallèlement aux processus de ponte et de maturation gonadique. Sa sensibilité aux maladies a ainsi été mise en corrélation avec la baisse du profil hémocytaire associée à une allocation de l'énergie dans les mécanismes de reproduction (Travers et al., 2008). En 2000, des ormeaux sains placés sur deux sites le long des côtes bretonnes sont morts, et l'agent pathogène *Vibrio carchariae* a pu être isolé sur des individus morts,



l'agent pathogène étant probablement la cause de la maladie de l'ormeau qui sévit depuis 1997 en Bretagne (Nicolas et al., 2002). Ce virus est similaire à celui responsable de mortalités chez l'ormeau japonais, *H. diversicolor*, mais des caractères phénotypiques différencient les deux souches.

#### 4.1.2.4. Reproduction et cycle de vie

Contrairement à l'huître, l'ormeau est gonochorique même si de rares cas d'hermaphrodisme ont pu être constatés (Girard, 1972). La gonade se développe sur le côté droit du corps et chez l'adulte elle forme une grande partie de la région superficielle de la masse viscérale. Elle est rattachée à la surface externe de la glande digestive. Pour sexer les individus, il faut regarder la couleur de la gonade en période de maturation. Là où elle est claire chez le mâle, elle est plus foncée (verdâtre) chez la femelle (Figure 12) (Bevelander, 1988; Stephenson, 1924). La maturité sexuelle est atteinte vers l'âge de 2 ans pour les mâles et de 3 ans pour les femelles. Le cycle reproduction est caractérisé par une gamétogenèse entre décembre et avril et une période de ponte s'étendant de mi-juin jusqu'à novembre avec des pics d'émission des gamètes en août (Bilbao et al., 2010; Girard, 1972). Les différents stades de gamétogenèse sont décrits dans le Tableau III.

Tableau III : Description des stades de gamétogenèse de l'ormeau *Haliotis tuberculata*.

| Numéro stade | Nom de stade     | Description du stade                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|--------------|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I            | Préprolifération | La gonade est essentiellement immature et se caractérise par un épithélium germinal faible ou inexistant entre l'épiderme externe et la glande digestive. Le sexe est indéterminable à l'examen histologique.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| II           | Prolifération    | Les cellules spermatogonies se développent à partir des tubules de tissu conjonctif. Les spermatogonies et les spermatocytes primaires sont caractérisés par un noyau ovale.<br>Les cellules d'oogonie se développent à partir des trabécules et forment des grappes sur les parois des trabécules. La gonade présente des espaces vides.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| III          | Maturation       | Le testicule contient un grand nombre de spermatocytes et de spermatides mais peu de spermatozoïdes (queue orientée vers la glande digestive). Les spermatocytes sont abondants près des parois du testicule et autour des tubules. La vitellogenèse est initiée à ce stade.<br>Un ovaire à maturation précoce est caractérisé par des ovocytes nouvellement pédonculés mesurant environ 25 µm. Un ovaire à maturation tardive présente des ovocytes de plus de 50 µm qui s'étendent des trabécules vers la glande digestive. Sous grossissement, les ovocytes apparaissent ronds, parfois irréguliers et transparents, chacun étant attaché par un pédoncule et ayant la forme d'une larme. |
| IV           | Mûr              | La coupe transversale de l'appendice conique ne laisse apparaître que peu de zone de glande digestive. Le testicule est densément rempli de spermatozoïdes disposés radialement avec leur queue tournée vers la zone de la glande digestive. Quelques stades de gamétogenèse précoces peuvent être présents, mais sont limités autour des tubules.<br>L'ovaire contient beaucoup d'ovocytes matures de plus de 150 µm de diamètre. La plupart des ovocytes sont de forme polygonale, avec un noyau distinct et un nucléole rond. Une légère prolifération d'ovocytes de moins de 25 mm est fréquente, surtout près de la paroi périphérique de la gonade.                                    |
| V            | Ponte partielle  | Le testicule présente des espaces évidents autour des tubules où les spermatozoïdes ont quitté les lieux. D'autres zones semblent mûres.<br>L'ovaire contient des densités réduites d'ovocytes matures par rapport aux gonades mûres. La lumière de la gonade est partiellement effondrée avec des trabécules repliées. Ovocytes mûrs et densément compactés encore présents dans certaines zones. Infiltrations hémocytaires visibles dans les espaces inter trabéculaires.                                                                                                                                                                                                                 |
| VI           | Ponte avancée    | Une gonade usée est caractérisée par la quasi absence de gamètes mûrs et une faible activité de gamétogenèse. Macroscopiquement, la gonade est fortement réduite. La lumière de la gonade est effondrée, avec des trabécules ou des tubules repliés. On peut toutefois observer des gamètes résiduels de la ponte précédente comme des ovocytes opaques, désintégrés et des spermatozoïdes de couleur foncée.                                                                                                                                                                                                                                                                                |



Plusieurs facteurs participent au déclenchement de la ponte comme le degré de maturation, la présence de gamètes dans l'eau, des facteurs hormonaux ou encore la disponibilité en nourriture (Mgaya, 1995). Le cycle de vie de l'ormeau est décrit dans la Figure 14.

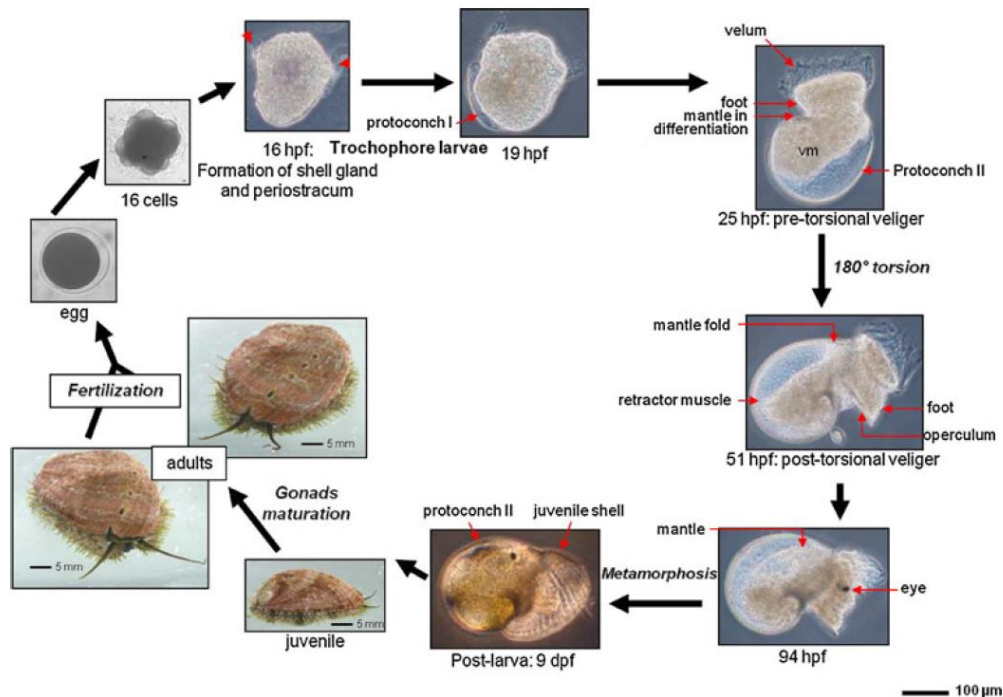


Figure 14 : Cycle de vie de l'ormeau *Haliotis tuberculata*. D'après Gaume et al. (2011).

La fécondation est externe et a lieu dans la colonne d'eau après l'émission des gamètes mâles suivi des gamètes femelles. La fécondation donne naissance à un œuf sphérique qui subit des divisions successives de segmentation et gastrulation. Environ 16 h après la fécondation, une larve trochophore ciliée est formée, elle nage activement dans la colonne d'eau puis se transforme en larve véligère qui sera dispersée sur de grandes distances (Forster, 1967; Forster et al., 1982; Gaume et al., 2011; Hayashi, 1980). Après une courte vie pélagique (5 à 6 jours), les larves s'attachent à un substrat pour entamer leur vie benthique (Mgaya, 1995). L'ormeau ne vit plus sur ses réserves et commence alors à se nourrir de microphytobenthos. Les juvéniles vivent généralement sur des algues du genre *Lithothamnium* qui permettent un développement optimal (Morse and Morse, 1984). Les animaux développent à terme leur système digestif, leur tentacule, leurs yeux, leurs branchies leur épipodium et leur coquille.

## 4.2. Les Producteurs primaires

Les producteurs primaires rassemblent une grande diversité d'organismes autotrophes vis-à-vis du carbone. Ils constituent un stock de carbone organique produit par unité de temps et de surface, suite à la fixation du carbone inorganique grâce à la photosynthèse. La production primaire marine est la source principale de carbone organique pour les organismes hétérotrophes que sont les animaux.

C'est le maillon à la base des réseaux trophiques océaniques et côtiers. De plus, l'absorption du gaz carbonique et la séquestration du carbone organique dans l'océan profond par les producteurs primaires participe au cycle du carbone et constitue un outil important dans l'étude du changement climatique (Geider et al., 2001). Cette production primaire est également essentielle pour les activités humaines puisqu'elle influence les activités de pêche et de conchyliculture (Chassot et al., 2010). La compréhension du fonctionnement des organismes photosynthétiques est donc primordiale dans l'étude et la préservation des écosystèmes marins. Trois principaux facteurs influencent la production primaire : la lumière, la température et la disponibilité en nutriments qui sont directement dépendants de la saisonnalité (Anning et al., 2000; Claquin et al., 2008; Cullen et al., 1992). Ces apports nutritifs sont associés aux eaux fluviales mais également à la turbidité des masses d'eau. Au cours d'une année, on assiste à une succession de différents taxons qui vont être plus ou moins dominants en fonction des concentrations en nutriments. Cependant, des perturbations anthropiques de l'environnement, comme une contamination élevée en ETMs par exemple, peuvent engendrer des modifications physiologiques et moléculaires chez les producteurs primaires affectant la photosynthèse et donc la biomasse produite (Clijsters and Van Assche, 1985; Pfeiffer et al., 2017; Suresh Kumar et al., 2014). Ces altérations peuvent avoir des répercussions sur les compartiments trophiques supérieurs, on parle alors de cascades dites « bottom-up ». On peut diviser la production primaire en plusieurs compartiments biologiques que sont le phytoplancton, les macroalgues et le microphytobenthos.

#### 4.2.1. Le Phytoplancton

Le phytoplancton rassemble les organismes unicellulaires autotrophe vis-à-vis du carbone et constitue l'essentiel de la production primaire en milieu marin. D'un point de vue systématique, le phytoplancton est un taxon polyphylétique, c'est-à-dire un assemblage d'organismes de différents groupes excluant leur ancêtre commun le plus récent. Cela signifie que le terme phytoplancton n'a pas de réelle valeur au regard de la phylogénie. En revanche, c'est un terme pratique pour définir l'ensemble des organismes unicellulaires photosynthétiques pélagiques formant ainsi un groupe fonctionnel. Dans le cadre de ces travaux de thèse, plusieurs espèces de microalgues d'importance écologique et/ou économique ont été ciblées. Certaines peuvent être considérées comme des espèces clés de voûte des réseaux trophiques en Baie de Seine et joue un rôle important dans la séquestration du carbone inorganique. Dans l'objectif d'avoir une vision la plus globale possible de l'impact des anodes galvaniques sur les organismes photosynthétiques, 4 espèces (*Chaetoceros calcitrans*, *Emiliana huxleyi*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*) appartenant à différents groupes taxonomiques ont été sélectionnées (Figure 15).

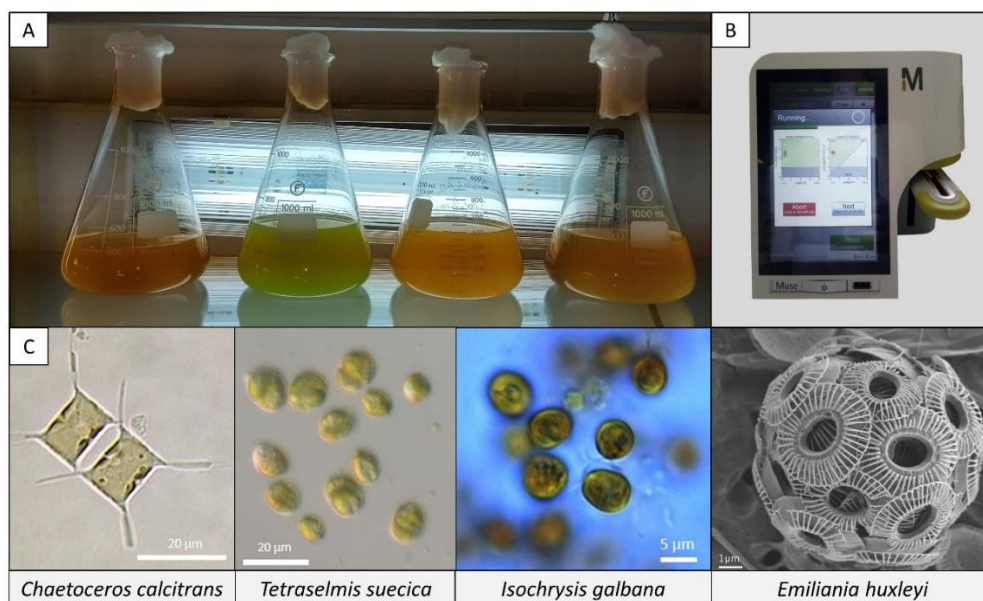


Figure 15 : Cultures mères des 4 espèces de microalgues étudiées et placées dans le sas à température contrôlée avec dans l'ordre *Chaetoceros calcitrans*, *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana* et *Emiliania huxleyi* (A). Cytomètre en flux (MUSE Celle Analyser, Millipore Sigma®) ayant servi au suivi de la croissance du phytoplancton (B). Représentation de *C. calcitrans*, *T. suecica*, *I. galbana* en microscopie optique et de *E. huxleyi* en microscopie électronique (C).

La classification taxonomique des 4 espèces de microalgues étudiées dans le cadre de ces travaux de thèse est décrite dans le Tableau IV.

Tableau IV : Position systématique des différentes espèces de microalgues étudiées au cours du projet de thèse. D'après World Register of Marine Species.

| Embranchement | Ochrophyta                                       | Haptophyta                                 | Haptophyta                                 | Chlorophyta                                   |
|---------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Classe        | Baccillariophyceae                               | Prymnesiophyceae                           | Prymnesiophyceae                           | Chlorodendrophyceae                           |
| Ordre         | Chaetocerotanae                                  | Isochrysidales                             | Isochrysidales                             | Chlorodendrales                               |
| Famille       | Chaetocerotaceae                                 | Noelaerhabdaceae                           | Isochrysidaceae                            | Chlorodendraceae                              |
| Genre         | <i>Chaetoceros</i>                               | <i>Emiliana</i>                            | <i>Isochrysis</i>                          | <i>Tetraselmis</i>                            |
| Espèce        | <i>Chaetoceros calcitrans</i><br>(Paulsen, 1968) | <i>Emiliana huxleyi</i><br>(Lohmann, 1967) | <i>Isochrysis galbana</i><br>(Parke, 1949) | <i>Tetraselmis suecica</i><br>(Butcher, 1959) |

#### 4.2.1.1. *Chaetoceros calcitrans*

*Chaetoceros calcitrans* appartient au grand groupe des diatomées (classe des Baccillariophyceae), ces microalgues sont caractérisées par un squelette externe siliceux appelé frustule. Ce groupe constitue une part importante du phytoplancton participant à près de 50 % de la production primaire océanique globale (Nelson et al., 1995). Le genre *Chaetoceros* est probablement le plus diversifié parmi les diatomées avec plus de 400 espèces décrites. Ce sont des diatomées centrales, c'est-à-dire avec une symétrie radiale, et un frustule de forme plus ou moins cylindrique à la différence des diatomées pennées qui présentent une symétrie bilatérale et un frustule plus ou moins allongé. L'espèce *C. calcitrans* présente une morphologie rectangulaire et est pourvue de soies.

Grâce à sa croissance rapide et sa haute valeur nutritionnelle, c'est une algue très utilisée en aquaculture pour nourrir les bivalves et crustacés d'importance commerciale que cela soit pour les adultes ou les larves. Elle est notamment utilisée dans l'alimentation de *C. gigas* (Helm and Millican, 1977; Tredici et al., 2009).

Dans la baie de Seine, les diatomées représentent 70 à 90 % des espèces lors des efflorescences phytoplanctoniques importantes du début du printemps jusqu'à la fin de la période estivale (20 à 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  de chlorophylle a), et *Chaetoceros* est l'un des genres majoritairement représentés.

#### 4.2.1.2. *Emiliana huxleyi*

*Emiliana huxleyi* est une espèce d'haptophyte appartenant à la classe des coccolithophores (Prymnesiophyceae). Les coccolithophores font partie du nanoplancton, c'est-à-dire le plancton d'une taille inférieure à 20  $\mu\text{m}$  et supérieure à 2  $\mu\text{m}$ . Ils sont principalement caractérisés par la sécrétion de plaques calcaires ornementées appelées coccolithes, qui servent de protection extracellulaire (coccosphère) (Young et al., 2005). Les coccolithophores présentent des caractéristiques pertinentes dans le cadre des changements environnementaux. En effet, ils sont considérés comme les organismes calcifiants les plus productifs sur terre, et ils jouent un rôle important dans le cycle du carbone marin de par leurs processus physiologiques de photosynthèse et de calcification (Field, 1998). À la mort de la cellule algale, le squelette calcaire sédimente sur les fonds marins formant ainsi la craie. Les coccolithophores sont responsables d'environ la moitié de la production océanique des carbonates ( $\text{CaCO}_3$ ) (Broecker and Clark, 2009). Ainsi, les coccolithophores participent au cycle biogéochimique du carbone et constituent le principal puits de carbone dans l'océan de surface (Rost and Riebesell, 2004). Il faut savoir que près de 25% du carbone fixé par le phytoplancton est exporté vers l'océan profond, alors que les 75% restant sont minéralisés par les microorganismes et restent sous forme minérale dans l'océan de surface (Falkowski et al., 2000).

*E. Huxleyi* est l'espèce la plus étudiée de la famille des Noerlaerhabdaceae qui sont des coccolithophores caractérisés par une calcification au cours d'une seule phase de leur cycle de vie. Sa physiologie et sa distribution sont étudiées de façon importante depuis les années 60 (Paasche, 1964). C'est une petite espèce parmi les coccolithophores avec une taille moyenne de 5  $\mu\text{m}$  (Paasche, 2001). *E. Huxleyi* est pélagique, cosmopolite, eurytherme (1 à 30°C), euryhaline (11 à 40 PSU), l'espèce peut même croître à la limite de la couche photique (Winter et al., 1994). De plus, cette microalgue se caractérise par une forte tolérance à de larges gammes de concentrations en nutriments allant des zones eutrophiques à oligotrophes. Grâce aux propriétés optiques des coccolithes permettant de réfléchir la lumière, les observations satellite montrent régulièrement des efflorescences, liées aux thermoclines d'été, pouvant s'étendre sur plus de 100 000 kilomètres carrés (Brown and Yoder, 1994).

L'espèce s'avère également un meilleur compétiteur face à des conditions limitantes en nutriment par rapport aux autres espèces de microalgues comme les diatomées et les dinoflagellés. Dans l'Atlantique-Nord, les efflorescences d' *E. Huxleyi* ont montré une capacité à augmenter la pCO<sub>2</sub> dans les eaux surface et donc à réduire le flux de CO<sub>2</sub> entre terre et mer jusqu'à 6 mois après l'efflorescence (Shutler et al., 2013). Les auteurs ont estimé que les efflorescences d' *E. Huxleyi* peuvent réduire de 3 à 28 % le puits net de CO<sub>2</sub> dans l'Atlantique-Nord.

Il est maintenant démontré que le métabolisme d' *E. Huxleyi* nécessite des métaux traces dont le zinc (Paasche, 2001; Zondervan, 2007). Mais ses besoins sont plus faibles que chez d'autres groupes de microalgues ce qui permet à *E. Huxleyi* de croître dans des zones où le développement des diatomées est limité par la faible concentration d'oligo-éléments. Sunda et Huntsman (2000) ont d'ailleurs montré que le zinc peut être substitué par le cobalt dans le cas d'une limitation en zinc (Sunda and Huntsman, 2000). La distribution cosmopolite, l'adaptation à de nombreuses variables environnementales et la facilité de maintien d' *E. Huxleyi* en laboratoire en font une espèce modèle pour les études expérimentales (Westbroek et al., 1993; Winter et al., 1994).

#### 4.2.1.3. *Isochrysis galbana*

Également du groupe des cocolithophores, *Isochrysis galbana* est couramment utilisé en aquaculture pour nourrir les larves de bivalves. Sa haute teneur en acides gras polyinsaturés tels que l'acide docosahexaénoïque (DHA), l'acide stéaridonique et l'acide alpha-linolénique en font une espèce de choix dans les écloséries.

#### 4.2.1.4. *Tetraselmis suecica*

Appartenant à la classe des Chlorodendrophyceae, *Tetraselmis suecica* est nommé ainsi de par ses quatre flagelles disposés en deux paires opposées. *T. suecica* possède un seul grand chloroplaste qui occupe la majeure partie du compartiment cytoplasmique. Le chloroplaste contient un pyrénioïde central entouré d'une enveloppe d'amidon. Le cycle de vie de *Tetraselmis* comprend trois stades de développement : un stade flagellé, un stade végétatif non mobile et un stade de kyste. Le stade végétatif non mobile est le stade de développement dominant de la plupart des espèces. La seule différence structurelle entre le stade flagellé et le stade végétatif est le nombre de couches calcaires puisque le stade flagellé ne possède jamais plus d'une couche, alors que l'état végétatif en possède deux ou plus. Les cellules au stade du kyste perdent leur flagelle, et elles produisent une thèque pour se protéger. C'est une espèce qui tolère de grandes variations de salinité.

C'est une espèce utilisée mondialement en aquaculture, servant d'alimentation pour la microfaune, particulièrement les rotifères, les bivalves et les larves des crevettes, notamment car elle possède un large spectre d'activité antimicrobienne (Austin and Day, 1990), et un potentiel élevé en

tant que probiotiques (Irianto and Austin, 2002). Elle est également présente dans le milieu cosmétique grâce à ses propriétés antioxydantes. De plus, elle a beaucoup été étudiée dans la recherche en biologie cellulaire, notamment pour l'étude des cycles de croissance. Étant des microalgues d'intérêt économique, il nous est apparu pertinent d'analyser les effets potentiels des métaux issus de la dégradation des anodes galvaniques sur *I. galbana* et *T. suecica*.

#### 4.2.2. Les Macroalgues

Tout comme le phytoplancton, les macroalgues rassemblent des espèces appartenant des taxons variés. Par définition, ce sont des organismes aquatiques pluricellulaires macroscopiques photosynthétiques. Les macroalgues remplissent également le rôle de producteurs primaires des écosystèmes marins d'où l'importance d'étudier l'effet des produits de dégradations des anodes galvaniques sur ce compartiment biologique. Au cours de ces travaux de thèse, des premières investigations ont été réalisées sur trois espèces de macroalgues que sont : *Palmaria palmata*, *Laminaria digitata*, et *Ceramium tenuicorne* dont la position systématique est décrite dans le Tableau V.

Tableau V : Position systématique des différentes espèces de microalgues étudiées au cours du projet de thèse. D'après World Register of Marine Species.

| Embranchement | Ochrophyta                                            | Rhodophyta                                     | Rhodophyta                                       |
|---------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Classe        | Phaeophyceae                                          | Florideophyceae                                | Florideophyceae                                  |
| Ordre         | Laminariales                                          | Palmariales                                    | Ceramiales                                       |
| Famille       | Laminariaceae                                         | Palmaraceae                                    | Ceramaceae                                       |
| Genre         | <i>Laminaria</i>                                      | <i>Palmaria</i>                                | <i>Ceramium</i>                                  |
| Espèce        | <i>Laminaria digitata</i><br>(Hudson) Lamouroux, 1813 | <i>Palmaria palmata</i><br>(Weber & Mohr) 1805 | <i>Ceramium tenuicorne</i><br>(Kütz) Waern, 1952 |

- *Laminaria digitata* est une grande espèce d'algue brune pérenne mesurant jusqu'à 3 mètres de long. Elle cesse de croître de la fin de l'été jusqu'à la fin de l'hiver. La fronde de l'algue est découpée en de nombreuses lanières de couleur vert brun foncé. Cette espèce vit typiquement dans la zone infralittorale des estrans rocheux moyennement battus où elle forme de véritables forêts sous-marines.
- *Palmaria palmata* est une algue rouge pérenne qui peut atteindre 50 cm de long. Son thalle, de couleur rouge plus ou moins foncé, se divise en lobes allongés comme les doigts d'une main ce qui est à l'origine de son nom. On retrouve *P. palmata* sur les estrans rocheux, accrochée aux pierres, ou bien en épiphyte sur les stipes des grandes laminaires et des fucus au niveau de l'étage infralittoral ainsi que dans la partie inférieure de l'étage médiolittoral. C'est une espèce très consommée par l'homme, elle est mangée crue dans des salades dans certains pays comme l'Irlande ou le Canada.

- *Ceramium tenuicorne* a été sélectionné dans le cadre de nos expérimentations en raison de sa croissance rapide et de son utilisation dans de nombreux tests de toxicité. C'est une petite algue qui n'excède pas une trentaine de centimètres de long. Elle possède un thalle filamenteux avec une ramification dichotomique irrégulière. L'apex de ces ramifications est très caractéristique avec deux pointes en formes de pinces. C'est une espèce typique des zones intertidales de l'hémisphère nord qu'on retrouve dans les cuvettes ou en épiphyte sur de grandes algues. Sa large aire de répartition en fait un organisme modèle idéal.

#### 4.2.3. Le Microphytobenthos

Le microphytobenthos rassemble une grande variété d'organismes photosynthétiques eucaryotes et microscopiques, principalement dominée par les diatomées et les cyanobactéries. Ces espèces se développent dans les quelques millimètres de la couche superficielle des sédiments éclairés ou des supports durs, n'apparaissant généralement que sous la forme d'un subtil biofilm brunâtre ou verdâtre (MacIntyre et al., 1996; Paterson, 1989a). Ce compartiment benthique est abondant dans de nombreux habitats aquatiques comme les estuaires, les mers peu profondes, les plaines de récifs coralliens ainsi que les lacs et les rivières. Tout comme le phytoplancton, le développement du biofilm est soumis à des paramètres environnementaux et biologiques, notamment les brouteurs et la disponibilité en nutriments (Hillebrand et al., 2000; Jenkins et al., 2001; Thompson et al., 2005, 2004; Underwood, 1984). Il est estimé que le microphytobenthos peut contribuer jusqu'à 50 % de la production autotrophe totale dans certains écosystèmes.

Le microphytobenthos est très important pour l'apport d'énergie à l'écosystème intertidal, notamment grâce à la haute valeur nutritionnelle des diatomées, et il joue donc un rôle significatif dans le transfert de matière et d'énergie à travers les réseaux trophiques benthiques (MacIntyre et al., 1996). De plus, il constitue aussi un assemblage pionnier pour la succession des communautés benthiques et facilite la colonisation des macroalgues et des invertébrés (Huang and Boney, 1984; Hung et al., 2007). Dans ce processus de colonisation, les substances polymériques extracellulaires (EPS) jouent un rôle essentiel pour permettre aux cellules d'adhérer au substrat et fonder une architecture biologique complexe (Figure 16) (Orvain et al., 2003). De plus, elles permettent de protéger les cellules contre les stress environnementaux tels que les substances toxiques, les agents microbiens, l'excès de lumière et la dessiccation (Bharti et al., 2017; Decho, 2000; Morelle et al., 2017; Orvain et al., 2014; Staats et al., 2000; Steele et al., 2014). Les EPS sont principalement composés de polysaccharides (hydrates de carbone) et de protéines, mais aussi de macromolécules telles que l'ADN et les lipides (Flemming and Wingender, 2010). Ils sont divisés habituellement en deux grands types, les molécules de bas poids moléculaire, et celles de haut poids moléculaire. La production respective de ces fractions dépend de plusieurs facteurs comme la migration des cellules (Shnyukova and

Zolotarova, 2015), le processus de photosynthèse (Morelle et al., 2017) ou la disponibilité des nutriments (Staats et al., 2000).

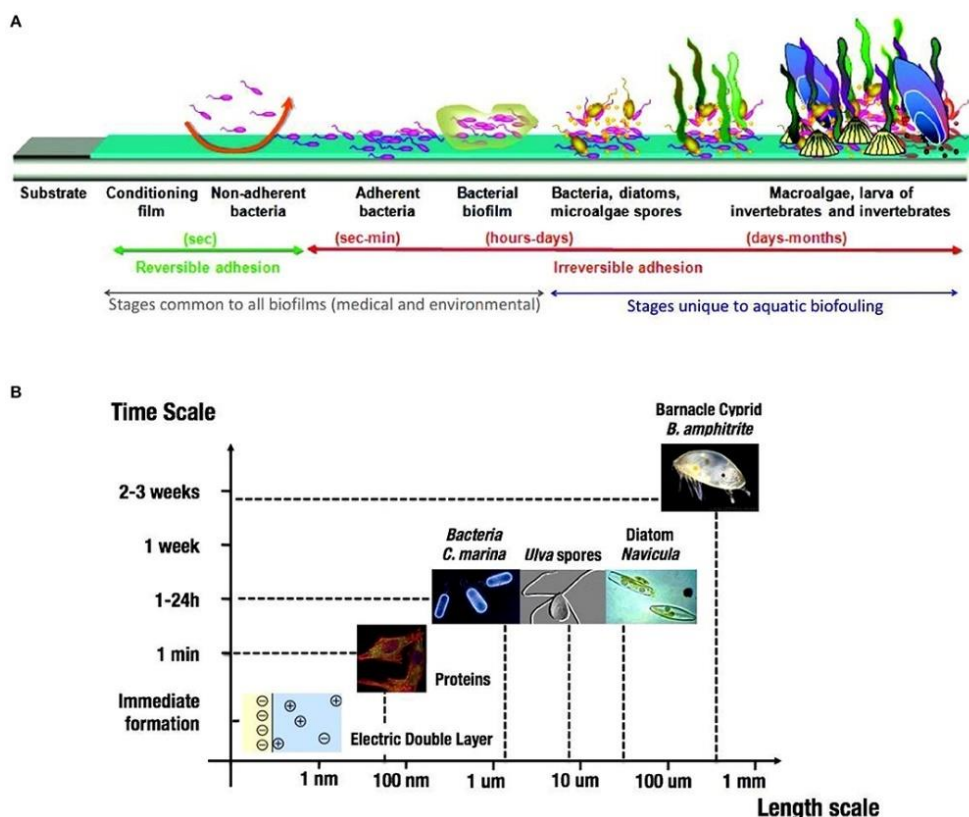


Figure 16 : Étapes de la formation d'un biofilm (A). Temps caractéristique de la formation du biofilm en fonction de l'échelle de longueur de la colonie de l'organisme (B). D'après (Grzegorzczuk et al., 2018).

Dans de nombreux écosystèmes peu profonds, la biomasse du microphytobenthos dépasse souvent celle du phytoplancton des eaux sus-jacentes (Araújo et al., 2010). Néanmoins, la plupart des études écotoxicologiques se sont focalisées sur les algues planctoniques et le compartiment microphytobenthique est souvent délaissé d'où l'intérêt qu'il lui ait porté dans ces travaux de thèse.

## 5. Objectifs de la thèse

Les objectifs de ces travaux de thèse sont de caractériser l'impact d'une anode galvanique à base d'aluminium sur les écosystèmes marins et de déterminer les concentrations à partir desquelles les organismes présentent une sensibilité aux ETMs libérés. Pour cela, plusieurs organismes appartenant à différents groupes taxonomiques et différents niveaux trophiques ont été sélectionnés afin de comparer leur sensibilité vis-à-vis du cocktail d'aluminium et de zinc libéré dans la colonne d'eau par l'anode galvanique. Au total, des tests d'exposition ont été menés sur 9 espèces : 2 mollusques, 4 microalgues, 3 macroalgues, ainsi qu'une communauté de plusieurs espèces du microphytobenthos. Chez tous ces organismes étudiés, des mesures de concentrations des métaux constitutifs de l'anode galvanique à base d'aluminium ont été effectuées dans les eaux contaminées et les tissus biologiques



afin d'acquérir des données sur les processus de bioaccumulation et de bioconcentration. La démarche méthodologique commune aux différentes expérimentations est décrite dans le **Chapitre II**. Tous les indicateurs évalués sont présentés dans le schéma récapitulatif de la Figure 17.

Nous nous sommes tout d'abord focalisés sur l'évaluation des effets chez les consommateurs primaires avec les deux espèces de mollusques, l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, et l'ormeau, *Haliotis tuberculata*. Les différents biomarqueurs étudiés ainsi que la méthodologie spécifique aux mollusques sont décrits au début le **Chapitre III**. Une exposition chronique (3 mois) sur des huîtres adultes à différentes concentrations d'aluminium a permis la rédaction de l'**article 1** publié dans Aquatic Toxicology. Plusieurs biomarqueurs individuels, immunitaires, biochimiques et de la reproduction ont été évalués en réponse à différentes concentrations de métaux issus de la dissolution d'une anode galvanique à base d'aluminium. Après cette première expérimentation, il est apparu intéressant de mettre en place un test d'embryotoxicité afin d'évaluer l'impact sur la phase larvaire de l'huître, ce qui a fait l'objet de l'**article 2** soumis dans Environmental Science and Pollution Research. Après fécondation, les larves ont été exposées à 4 contaminants (métaux de l'anode galvanique à base d'aluminium, chlorure d'aluminium, chlorure de zinc ainsi que le mélange de chlorure d'aluminium et de chlorure de zinc) afin de calculer des CE<sub>50</sub> et de comparer leur toxicité. Une exposition chronique avec un mollusque brouteur, l'ormeau, a également été réalisée sur le stade juvénile et le stade adulte. Le suivi des paramètres individuels tel que la croissance et le taux d'ingestion, associé à la bioaccumulation des métaux chez les juvéniles, ont été valorisés dans l'**article 3** publié dans Archives of Environmental Contamination and Toxicology. Chez les ormeaux adultes, le suivi des paramètres biologiques tels que ceux étudiés chez l'huître, a fait l'objet de l'**article 4** soumis dans Ecotoxicology. Le chapitre se termine par une discussion qui compare les effets observés chez les deux mollusques lors de nos expérimentations ainsi qu'avec les résultats de la littérature.

À la suite de ces premières expérimentations, nous nous sommes intéressés à l'évaluation des effets de la dissolution de l'anode galvanique chez les producteurs primaires en étudiant trois compartiments biologiques que sont le phytoplancton, les macroalgues et le microphytobenthos. Les différents biomarqueurs étudiés ainsi que la méthodologie spécifique aux producteurs primaires sont décrits au début du **Chapitre IV**. Les expositions réalisées sur 4 espèces de microalgues (*C. calcitrans*, *E. huxleyi*, *I. galbana*, *T. suecica*) et 3 espèces de macroalgues (*L. digitata*, *P. palmata*, *C. tenuicorne*) ont permis l'acquisition de résultats préliminaires qui seront complétés en 2023 par d'autres expérimentations pour pouvoir être valorisés sous forme de publications. Pour ces raisons, ces parties sont rédigées en français dans le manuscrit. L'impact de l'anode galvanique sur le phytoplancton et les macroalgues a été étudié au moyen de trois indicateurs principaux que sont la croissance, la bioaccumulation et l'activité photosynthétique des organismes. Profitant des expositions chroniques

sur les mollusques, une expérimentation a été mise en place en parallèle afin d'étudier l'impact de l'anode galvanique sur la colonisation de supports par le microphytobenthos. Nous avons mesuré les effets de la dissolution de l'anode galvanique sur les biofilms à l'aide du dosage de la chlorophylle a et des EPS, de l'évaluation de plusieurs paramètres photosynthétiques, d'observations microscopiques ainsi que des mesures des concentrations en métaux dans les cellules. Ces résultats ont été valorisés dans l'**article 5** soumis dans Aquatic Toxicology.

Enfin, le manuscrit de thèse se termine par le **Chapitre V** qui offre une discussion générale sur les travaux menés, des perspectives futures à mettre en oeuvre sur l'impact des anodes galvaniques à base d'aluminium ainsi qu'une conclusion.

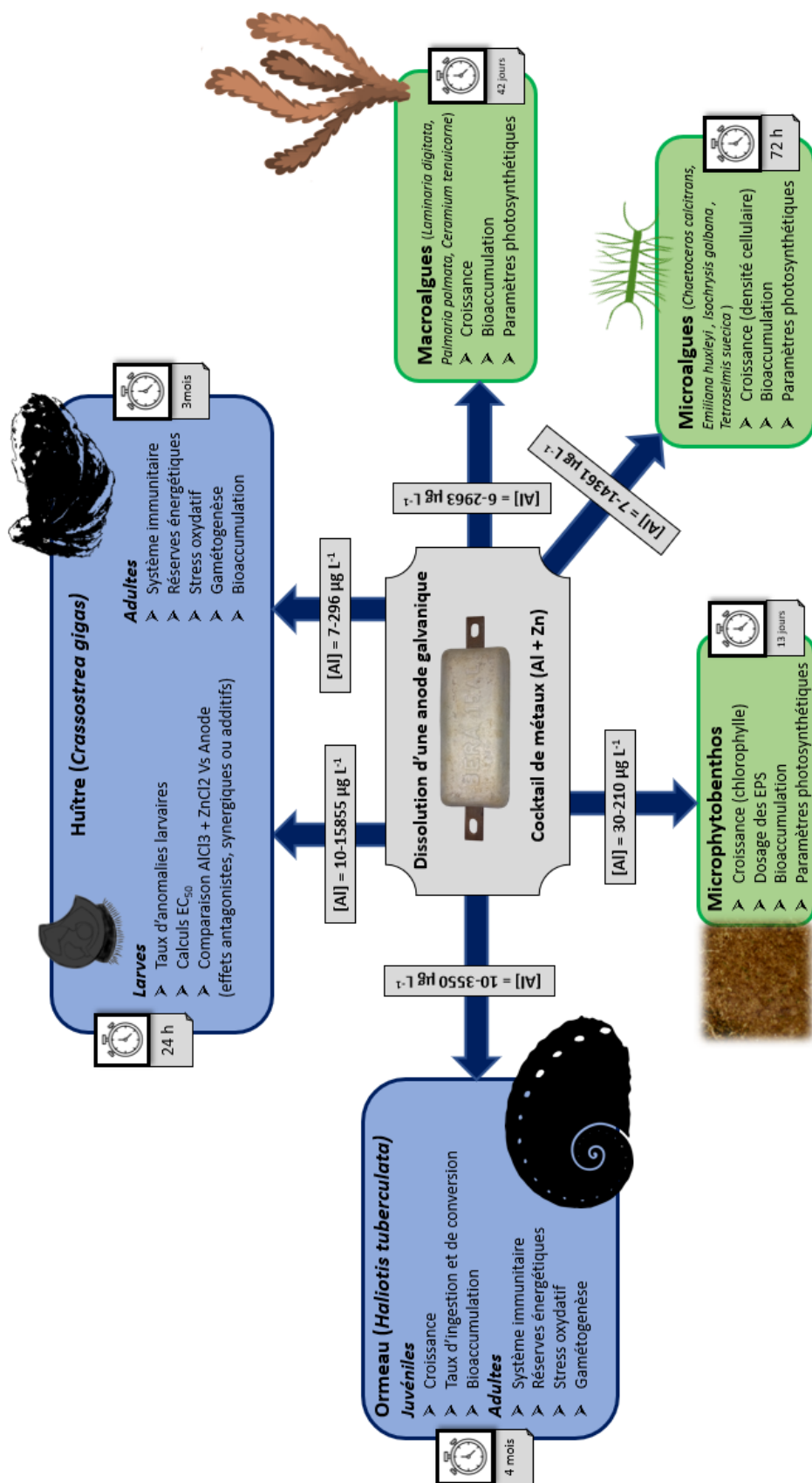


Figure 17 : Schéma récapitulatif de toutes les expérimentations réalisées chez les différents organismes marins étudiés.

## CHAPITRE II – Démarches expérimentales & méthodologiques

Dans ce Chapitre II, seule la méthodologie commune à toutes les expérimentations est détaillée. Le protocole expérimental associé spécifiquement aux mollusques et aux producteurs primaires est décrit dans les Chapitres III et IV.

## 1. Dispositif expérimental simulant la dissolution d'une anode galvanique à base d'aluminium

Afin de réaliser les différentes expérimentations, il était nécessaire dans un premier temps de se procurer une eau contaminée reflétant au plus proche la contamination du milieu marin par les anodes galvaniques. L'eau contaminée doit être composée du même cocktail de métaux avec la même spéciation chimique que dans l'environnement. C'est le facteur primordial à respecter dans la mesure où il a déjà été démontré que l'aluminium et le zinc sous leur forme sulfatée présentaient une toxicité plus importante que l'aluminium et le zinc issus de la dégradation des anodes galvaniques (Caplat et al., 2010). Il est difficile d'extrapoler les résultats d'études écotoxicologiques sur l'impact du chlorure ou du sulfate d'aluminium et l'objectif principal de ces travaux thèse est d'apporter des réponses précises sur l'impact de l'anode galvanique à base d'aluminium.

L'option de récupérer de l'eau contaminée sur le terrain pose plusieurs inconvénients, notamment l'absence de contrôle sur les paramètres abiotiques et sur les quantités de métaux relarguées. Certes, les expériences menées avec des anodes galvaniques sur le terrain sont plus proches de la réalité mais l'hydrodynamisme et les mouvements de la houle peuvent également disperser une fraction des métaux rendant difficile la mise en œuvre d'une contamination importante comme cela a déjà pu être observé en milieu portuaire à proximité des anodes (Caplat et al., 2020; Gabelle et al., 2012). De plus, on ne peut pas exclure la présence de contaminants additionnels tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) si cette eau est prélevée dans un port. Pour répondre à cette problématique, un dispositif expérimental simulant la dissolution d'une anode galvanique à base d'aluminium dans le milieu marin a été mis en place (Figure 18).

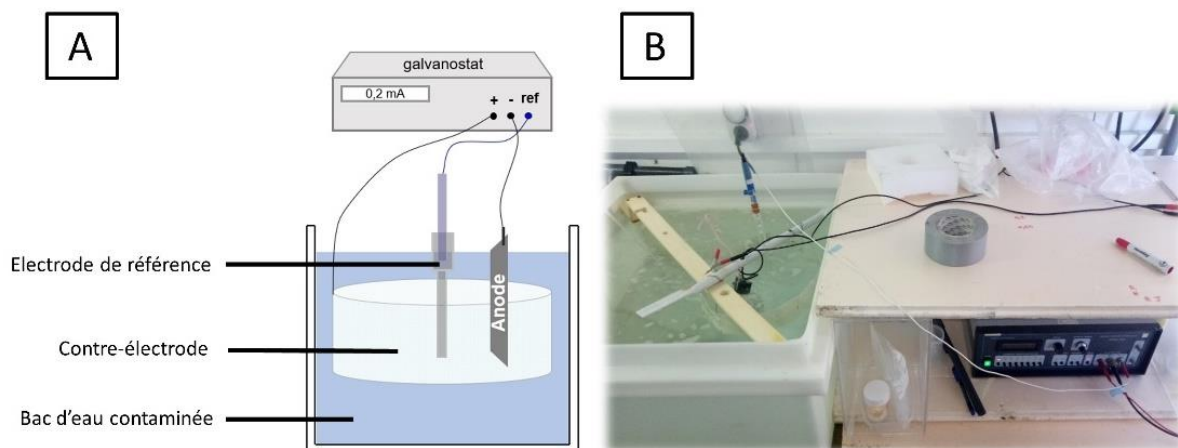


Figure 18 : Schéma du dispositif expérimental simulant la dissolution d'une anode galvanique (A). Photo du dispositif expérimental installée dans une salle (B).

Le dispositif est équipé d'une électrode de référence (électrode au calomel saturé – SCE) et d'une contre-électrode (CE) constituée d'un alliage platine-titane ainsi que d'une anode galvanique à base aluminium de 800 g pour une surface de 450 cm<sup>2</sup> (Al Bera15, Bac Corrosion® Control). Afin d'accélérer la dissolution de l'anode, l'ensemble a été connecté électriquement à un galvanostat sur une intensité de 200 mA comme déjà réalisé dans d'autres études menées au laboratoire (Caplat et al., 2012, 2010; Mao et al., 2011; Mottin et al., 2012). L'anode galvanique à base d'aluminium est principalement composée de sept éléments (Al, Zn, Fer (Fe), Silicium (Si), Indium (In), Manganèse (Mn) et Cuivre (Cu)) et les pourcentages massiques de chaque métal ont été donnés par le fournisseur comme suit : 93,2% à 97,1% de Al, 2,5% à 6,5% de Zn, 0,13% max de Fe, 0,1% max de Si, 0,01% à 0,03% de In, 0,01% max de Mn et 0,006% max de Cu (Tableau VI).

Tableau VI : Composition de l'anode galvanique à base d'aluminium.

| Élément | Pourcentage |
|---------|-------------|
| Al      | 93,2-97,1 % |
| Zn      | 2-6,5 %     |
| In      | 0,01-0,03 % |
| Fe      | 0,13 % max  |
| Si      | 0,1 % max   |
| Mn      | 0,01 % max  |
| Cu      | 0,006 % max |

L'anode est placée dans un grand bac (le litrage a varié entre 50 L et 140 L en fonction des expérimentations) rempli avec de l'eau de mer préalablement passée sur filtre à sable et dont le

brassage est assuré par un diffuseur d'air. Ce dispositif permet d'obtenir un grand volume d'eau contaminée à une forte concentration en métaux de l'ordre de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  d'aluminium et de  $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de zinc. Les concentrations dans l'eau des autres constituants de l'anode étaient toutes inférieures à la limite de détection. La durée de fonctionnement du galvanostat est contrôlée par un programmeur afin de faire varier la concentration finale souhaitée dans le volume expérimental. À la fin du cycle de contamination, l'anode galvanique présente une surface corrodée recouverte d'une fine couche blanche (dépôt gélatineux de sulfate d'aluminium basique décrit dans le Chapitre 1). L'état de l'anode galvanique avant et après sa corrosion est illustré sur la Figure 19.



Figure 19 : Comparaison entre une anode galvanique neuve (à gauche) et corrodée (à droite).

L'eau contaminée fraîche est laissée à décanter pendant 24 heures de façon à ce que les métaux sous forme particulaire sédimentent au fond du bac. Le surnageant de cette solution concentrée (que l'on appellera solution brute) a servi à préparer les solutions d'expositions par dilution avec de l'eau de mer naturelle. Les concentrations diluées obtenues ont alors été dosées par spectrométrie d'absorption atomique (SAA).

## 2. Dosage des métaux dans l'eau de mer

Des échantillons d'eau mer ont été prélevés pour suivre l'évolution hebdomadaire de toutes les concentrations d'expositions réalisées au cours de ces travaux, que cela soit pour l'eau de mer brute contaminée directement par l'anode galvanique, les différentes dilutions ou l'eau de mer naturelle non contaminée afin de connaître les concentrations totales en aluminium et en zinc. Toutes les analyses ont été effectuées par spectrométrie d'absorption atomique (SAA). L'aluminium a été analysé par un spectromètre d'absorption atomique Zeeman Z-AAS (AA240Z - Varian) équipé d'un atomiseur à tube graphite (FTA 120, Varian) et d'un distributeur d'échantillons programmable (PSD 120, Varian). Les analyses ont été réalisées avec une solution de modificateur de matrice ( $2 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ).

Chaque échantillon digéré ou d'eaux de mer a été analysé cinq fois, et la moyenne des valeurs a été utilisée pour l'évaluation. Le zinc a été analysé par spectrométrie d'absorption atomique à flamme air-acétylène (F-AAS) en utilisant un appareil Varian AA240F équipé d'une lampe à deutérium pour corriger les absorptions non spécifiques. Les analyses ont été effectuées sur chaque échantillon en triplicat, et les valeurs moyennes ont été utilisées pour l'évaluation. La limite de détection pour la détermination de chaque concentration métallique a été définie comme la moyenne de séries d'analyses d'un blanc plus trois fois l'écart type (ET) de ces séries d'analyses. Les limites de détection pour le zinc et l'aluminium étaient respectivement de  $3,1 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $n = 30$ ) et de  $6,6 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $n = 45$ ).

### 3. Dosage des métaux dans le biote

Tous les organismes ont la capacité de bioconcentrer les contaminants dans leur organisme. Cette accumulation de contaminants peut se faire *via* le milieu environnant ou *via* l'alimentation. Pour chacune des espèces biologiques étudiées, les analyses de plusieurs métaux ont été effectuées dans les tissus après dosage par spectrométrie d'émission atomique (Figure 20). La masse totale fraîche des mollusques et des algues a été pesée puis placée dans une étuve à  $80^{\circ}\text{C}$  (ormeaux et macroalgues) ou dans un lyophilisateur (huîtres, phytoplancton et microphytobenthos) afin de déshydrater les échantillons. Ces derniers ont ensuite été broyés à l'aide de billes en téflon puis minéralisés à l'aide d'une digestion acide préalable par micro-ondes (Multiwave ECO, Anton Paar, Les Ulis, France) (10 mL de  $\text{HNO}_3$  69% pour 200 mg de poids sec). Les concentrations totales de treize éléments (Al, Ag, As, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, Pb et Zn) ont été mesurées soit par spectroscopie d'émission atomique à plasma induit (ICP-AES, Vista MPX, Agilent Technologies Santa Clara, USA), soit par spectrométrie d'émission couplée à la masse et à haute résolution (HR ICP-MS Thermo Scientific™ Element 2™, Bremen, Allemagne et Element XR™, sur la plateforme PLATIN de l'université de Caen Normandie). Les résultats finaux sont exprimés  $\mu\text{g g}^{-1}$  de poids sec. De façon à évaluer la qualité de la procédure de traitement du biote, un matériau de référence standard SRM NIST-1566b de tissu d'huître (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) a été analysé en même temps que les échantillons. Les erreurs relatives étaient inférieures à 10% pour toutes les concentrations de métaux enregistrées dans le matériau de référence, à l'exception des concentrations de Pb et d'Al qui étaient comprises entre 10% et 40%.



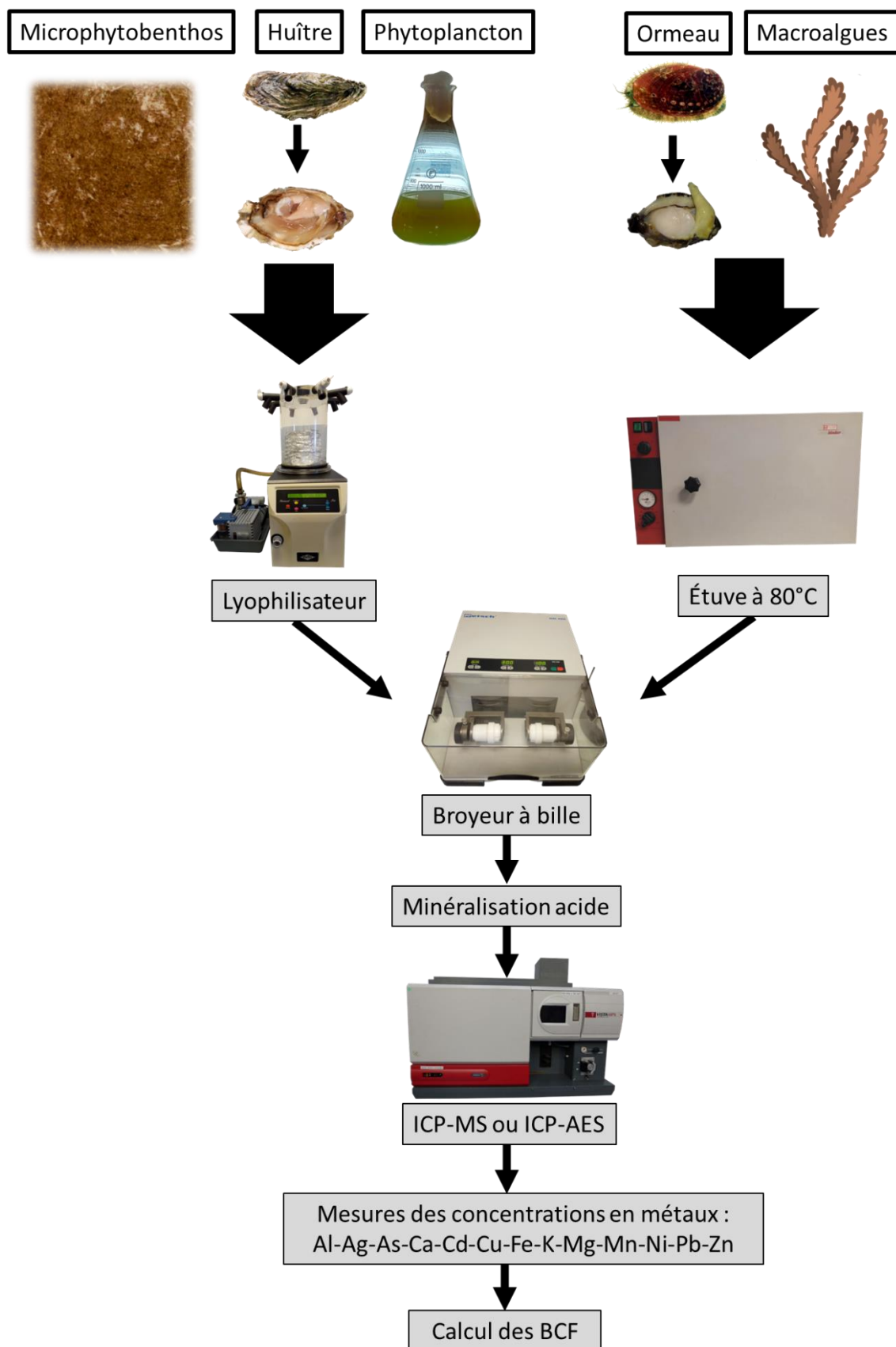


Figure 20 : Schéma du protocole de l'analyse des métaux dans les différents organismes étudiés. Les huîtres, le phytoplancton et le microphytobenthos ont été déshydratés à l'aide d'un lyophilisateur tandis que les ormeaux et les macroalgues ont été déshydratés à l'aide d'une étuve à 80°C.

En général, la bioaccumulation est déterminée par le facteur de bioconcentration (BCF), qui se définit comme le rapport entre la concentration de l'élément dans les tissus de l'espèce à l'équilibre et la concentration libre de l'élément dans l'eau. Le BCF est égal au rapport entre les constantes cinétiques d'absorption et d'épuration (Adams et al., 2000). Il est exprimé en poids frais et nécessite de connaître la teneur moyenne en eau des différents organismes. Les BCF ont été calculés pour évaluer la capacité des organismes à accumuler l'aluminium et le zinc selon le rapport suivant :

$$BCF = \frac{\text{Concentration du métal dans les organismes (mg kg}^{-1}\text{ fw)}}{\text{Concentration du métal dans l'eau (mg L}^{-1}\text{)}}$$

Pour les ormeaux qui ont également été nourris avec des algues contaminées, le facteur de bioamplification (BMF) utilisé pour les chaînes trophiques marines, a permis l'évaluation du transfert de l'Al et du Zn des algues vers les ormeaux (Gray, 2002) :

$$BMF = \frac{\text{Concentration du métal dans les ormeaux (mg kg}^{-1}\text{ fw)}}{\text{Concentration du métal dans les algues (mg kg}^{-1}\text{ fw)}}$$

#### 4. Analyses statistiques

Les différentes analyses statistiques présentées dans ce manuscrit ont été réalisées avec la version 3.6.3 du logiciel R studio. La normalité des données a été testée avec le test de Shapiro-Wilk et l'homogénéité des variances avec un test de Bartlett. Dans le cas où les données vérifiaient ces hypothèses, une analyse de variance (ANOVA) suivie d'un test post-hoc de Tukey ont été réalisés pour comparer les paramètres. Lorsque les données ne suivaient pas une distribution normale, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis (KW) suivi du test de Dunn ont été privilégiés. Les différences ont été considérées comme significatives à une valeur  $p < 0,05$ . L'ACP présentée dans l'article 1 a été réalisée avec le package Factoshiny.

Parmi les différentes expérimentations, lorsque cela était possible, plusieurs résultats ont été utilisés pour le calcul de paramètres écotoxicologiques que sont les  $CE_x$ , notamment le pourcentage de normalité des larves pour l'essai d'embryotoxicité, les taux de croissance des ormeaux ainsi que la croissance de certaines microalgues. Pour cela, des régressions non linéaires ont été réalisées en utilisant l'équation de Hill à l'aide de la macro Excel® REGTOX (Vindimian, 2012). Pour chaque courbe dose-réponse, les  $CE_{10}$ ,  $CE_{20}$  et  $CE_{50}$  ont été calculées après 24 heures d'exposition en utilisant les concentrations en Al et en Zn mesurées au début de l'exposition pour les différentes dilutions.

### CHAPITRE III – Effets d’une anode galvanique à base d’aluminium chez les mollusques

## 1. Introduction

Ce chapitre vise à caractériser les effets des anodes galvaniques chez deux espèces de mollusques, l'huître creuse, *Crassostrea gigas* et l'ormeau européen, *Haliotis tuberculata*. Pour ce faire, trois expérimentations ont été réalisées : (i) une première exposition chronique de 3 mois avec des huîtres adultes, (ii) un test d'embryotoxicité sur des larves d'huîtres, (iii) ainsi qu'une deuxième exposition chronique de 3 mois (+1 mois de décontamination) avec à la fois des ormeaux juvéniles et des ormeaux adultes. Ces travaux ont été valorisés sous la forme de 4 publications scientifiques dont 1 publiée dans *Aquatic toxicology*, 1 publiée dans *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* et 3 autres actuellement en cours de « reviewing » dans *Ecotoxicology, Aquatic toxicology et Environmental Science and Pollution Research*. Le premier article s'intéresse aux effets des anodes galvaniques sur les huîtres adultes. La deuxième publication met en avant la comparaison entre les effets de l'anode galvanique, du chlorure d'aluminium et du chlorure de zinc sur le développement larvaire des huîtres. Le troisième article vise à étudier l'impact du cocktail de métaux libéré par les anodes galvaniques sur la croissance, le taux d'ingestion et la bioaccumulation de ces métaux chez les ormeaux juvéniles. Enfin, la quatrième publication se focalise sur les effets physiologiques chez les ormeaux adultes. Les concentrations en métaux n'ont pas pu être quantifiées dans les tissus des ormeaux adultes pour des raisons pratiques. De ce fait, nous avons décidé de les mesurer dans les tissus des ormeaux juvéniles (article 3). Pour une question d'homogénéité, il a été décidé de présenter les résultats sous le format d'avant publication. Les sections références bibliographiques de chaque publication ont été compilées avec la section bibliographie qui est située à la fin du manuscrit.

Une autre expérimentation intitulée « effet intergénérationnel » a été entreprise durant la deuxième année de la thèse. Celle-ci consistait en l'exposition de géniteurs *C. gigas* pendant environ 3 mois à trois concentrations d'aluminium et un témoin, sensiblement dans les mêmes conditions que pour l'expérimentation valorisée dans l'article 1. Cependant, l'objectif était cette fois de réaliser différentes combinaisons de fécondation *in vitro* avec ces géniteurs afin d'étudier l'impact des métaux issus de la dissolution de l'anode galvanique à base d'aluminium sur la génération d'huître suivante en réalisant notamment un test d'embryotoxicité. L'exposition des géniteurs a dû être renouvelée à trois reprises à cause de mortalités trop importantes dans les bacs. La troisième exposition des géniteurs s'est bien déroulée. Tout au long de l'exposition, des prélèvements réguliers d'individus ont permis le suivi de l'avancement de la gamétogenèse. Après plus de trois mois de maturation des huîtres, une date a été fixée afin de réaliser l'essai d'embryotoxicité. Seuls quelques individus ont émis leurs gamètes après de nombreux chocs thermiques et il a donc fallu stripper la majorité des géniteurs afin d'obtenir suffisamment de gamètes pour chacune des conditions d'exposition. La fécondation et les étapes suivantes ont été réalisées avec la même méthodologie que décrite dans l'article 2. Une fois les

fécondations effectuées, la moitié des larves de chaque croisement de fécondation a été placée dans de l'eau contaminée (à la même concentration que les géniteurs) tandis que l'autre moitié a été placée dans de l'eau non contaminée. Après observation des larves au microscope, nous avons relevé un taux de normalité des larves témoins de  $57,75 \pm 8,37 \%$  ce qui est bien en-dessous des 80 % nécessaires au respect de la norme AFNOR (NF ISO 17244, 2015). Nous avons également constaté que les larves issues des géniteurs exposés à la concentration nominale de  $300 \mu\text{g L}^{-1}$  d'aluminium présentaient un bien meilleur développement, ce qui était probablement dû au fait qu'à cette condition la plupart des géniteurs avaient émis leurs gamètes sans être strippés. Une deuxième partie de l'expérimentation consistait à conserver une partie des larves dans l'objectif d'étudier l'impact jusqu'à la métamorphose qui a lieu après 18 à 21 jours de développement. Or, les mortalités larvaires enregistrées étaient beaucoup trop importantes, y compris pour les larves témoin, ce qui a mis fin à l'expérimentation. À l'origine, il était également prévu de continuer l'étude jusqu'au stade naissain des huîtres afin d'évaluer s'il y avait un écart de croissance entre les individus issus des différents croisements. Considérant ces différents problèmes rencontrés, il a été choisi de ne pas présenter les résultats de cette expérimentation dans le manuscrit.

Au cours des différentes expérimentations, plusieurs biomarqueurs ont été étudiés au niveau individuel et infra-individuel. Ces biomarqueurs étaient parfois communs d'une expérimentation à l'autre.

## 2. Biomarqueurs étudiés

### 2.1. Biomarqueurs individuels

Dans les études écotoxicologiques, connaître l'état physiologique des animaux au moyen de biomarqueurs individuels est primordial afin d'interpréter correctement les biomarqueurs infra-organismes. De par la facilité de l'acquisition des données, la mortalité constitue un des premiers biomarqueurs à relever et renseigne rapidement sur la fenêtre de sensibilité des organismes et les effets délétères des contaminants au niveau individuel. D'autres traits d'histoire de vie comme la croissance sont couramment utilisés dans les élevages afin d'évaluer le bon état de santé des mollusques (Lucas and Beninger, 1985). De plus, pour des espèces commerciales comme l'huître ou l'ormeau pour lesquelles les courbes de croissance en élevage sont connues, il est alors facile de comparer les résultats des groupes témoins avec la littérature. Les indices de condition, souvent utilisés par les conchyliculteurs pour évaluer la qualité d'un stock, sont aussi d'excellents biomarqueurs individuels (Friedman et al., 1997; Walne and Mann, 1975).

## 2.2. Biomarqueurs d'immunité

Comme rappelé dans l'introduction, chez les mollusques ce sont les hémocytes qui assurent principalement la fonction de défense interne *via* des processus comme la phagocytose, l'encapsulation des pathogènes ainsi que l'accumulation et la détoxification des contaminants. C'est pour cette raison que les hémocytes sont des cibles privilégiées pour analyser les effets des contaminants sur le système immunitaire.

### 2.2.1. La phagocytose

La phagocytose permet l'internalisation et la dégradation des éléments reconnus comme faisant partie du « non-soi » (Soudant et al., 2013). On distingue 4 phases durant le processus de phagocytose : (i) la chimiotaxie qui consiste en l'attraction des hémocytes par des stimuli chimiques libérés ou transportés par les particules étrangères, (ii) la reconnaissance et la fixation qui seraient médiées par des lectines, (iii) l'internalisation des micro-organismes dans un phagosome, (iv) la destruction du micro-organisme par des activités microbicides dépendantes et indépendantes de l'oxygène (Cheng, 2000) (Figure 21). Du fait du rôle central des hémocytes dans l'immunité des mollusques, la mesure de l'activité phagocytaire des hémocytes en cytométrie en flux a largement été utilisée en tant que biomarqueur d'immunotoxicité (Brousseau et al., 1999; Gagnaire et al., 2006; Hong et al., 2019; Lambert et al., 2003; Minguez et al., 2014; Sauve et al., 2002). La cytométrie en flux est un outil puissant qui permet de caractériser les sous-populations de cellules grâce à leurs propriétés morphologiques. La préparation de l'échantillon avec des marqueurs fluorescents (e.g. iodure de propidium ou Hoechst) permet de mesurer une intensité de fluorescence qui sera indicatrice d'une réponse en relation avec la fonction du marqueur. L'analyse des données sous forme de cytogramme permet d'évaluer l'impact des contaminants sur l'immunité des mollusques. Classiquement, une augmentation de l'activité phagocytaire est observée lors de l'exposition à de faibles doses de métaux alors que pour de fortes doses une diminution est constatée (effet hormétique). Cette baisse de l'activité phagocytaire peut par la suite favoriser l'infection d'un individu par des pathogènes. Par exemple, l'exposition des hémocytes de *Crassostrea virginica* à des niveaux environnementaux de TBT a montré une diminution de l'activité phagocytaire qui a favorisé la progression de l'infection par le protozoaire *Perkinsus marinus* (Anderson, 1996). Chez *C. gigas*, il a été démontré que les ETMs ou les xénobiotiques altéraient l'agrégation des hémocytes (Auffret and Oubelh, 1997). Si un contaminant est toxique pour les hémocytes, c'est la réponse immunitaire tout entière et la survie de l'organisme qui sont potentiellement mises en jeu (Matozzo et al., 2001).

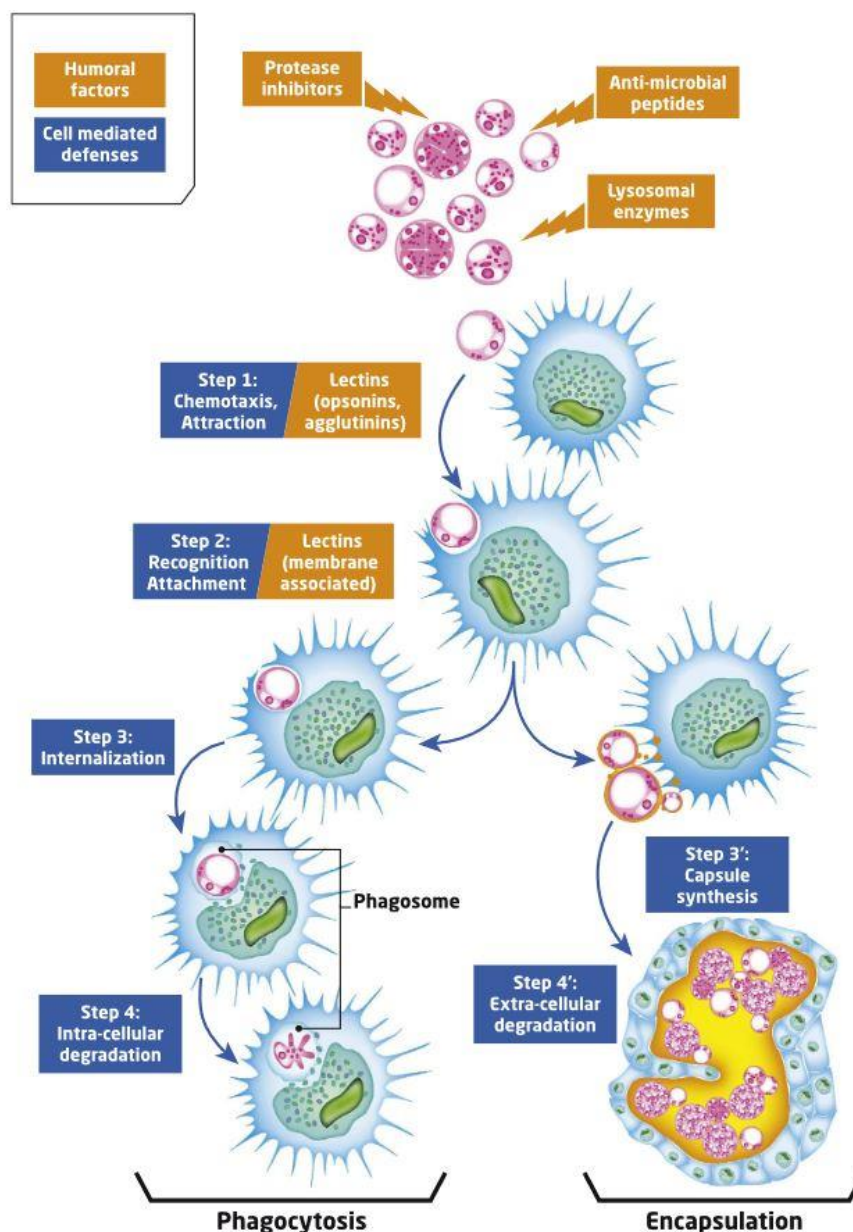


Figure 21 : Schéma des réponses humorales et cellulaires impliquées dans les mécanismes de défense des bivalves lors d'une infection par des micro-organismes. Le bleu indique les étapes de phagocytose et d'encapsulation. Le marron indique les différents facteurs humoraux tels que les peptides antimicrobiens, les hydrolases lysosomales, les inhibiteurs de protéases qui contribuent également à éliminer les micro-organismes pathogènes. Lorsque les hémocytes n'ont pas réussi à phagocyter les micro-organismes (par exemple s'ils sont trop gros pour être internalisés), ils les encapsulent et les détruisent à l'extérieur à l'aide d'enzymes lysosomales et de ROS. D'après Soudant et al. (2013).

### 2.2.2. Les ROS

Les ROS (Reactive Oxygen Species), également appelés DRO (dérivés réactifs de l'oxygène), constituent un groupe de composés chimiques oxygénés. Parmi eux on peut citer : le peroxyde

d'hydrogène  $H_2O_2$ , l'anion hydroxyde  $OH^-$ , l'anion superoxyde  $O_2^-$ , l'oxygène singulet  $O_2^*$ , l'ozone  $O_3$  ou encore l'oxyde nitrique  $NO$ . Les êtres vivants produisent naturellement des ROS dans leur organisme pour la réalisation de certaines activités enzymatiques. Comme mentionné dans la Figure 21, les ROS sont couplés au processus de phagocytose et permettent la dégradation des particules phagocytées. C'est dans le cas d'un déséquilibre de la production des ROS que le métabolisme de l'organisme peut être affecté entraînant des effets néfastes sur la santé. Une production excessive de ROS peut engendrer des dommages cellulaires importants, endommager les tissus et favoriser grandement le stress oxydatif (Valavanidis et al., 2006), tandis que dans le cas d'une production trop faible de ROS le processus de phagocytose ne pourra pas se dérouler correctement dans sa totalité (Soudant et al., 2013). Plusieurs études dans la bibliographie ont déjà démontré l'impact des métaux sur la production de ROS chez les hémocytes de mollusque (Latire et al., 2012; Luo and Wang, 2022; Mottin et al., 2012). En conséquence, l'équilibre entre les facteurs prooxydants endogènes/exogènes (c'est-à-dire les polluants environnementaux) et les défenses antioxydantes (enzymatiques et non enzymatiques) dans les systèmes biologiques peut être utilisé dans l'objectif d'évaluer les effets toxiques des différentes classes de polluants chimiques (Valavanidis et al., 2006), et dans notre cas en réponse à l'aluminium et au zinc libérés par l'anode galvanique.

### 2.2.3. Le système lysosomal

Les lysosomes sont des organites cellulaires, mesurant de 0,2 à 0,5  $\mu m$ , qui contiennent plus de 60 types différents d'hydrolases acides qui peuvent digérer toutes sortes de macromolécules. On retrouve les lysosomes dans le cytosol de toutes les cellules animales eucaryotes, à exception faite des érythrocytes. La membrane lysosomale est composée de protéines de transport (perméases), de canaux ioniques spécifiques aux ions chlorures  $Cl^-$  ainsi que de pompes à protons membranaires  $ATP/Mg^{2+}$  dépendantes pour maintenir un pH acide (entre 3,5 et 5) indispensable au bon fonctionnement des enzymes. Les lysosomes assurent la dégradation des particules extracellulaires issues de l'endocytose et des composants intracellulaires issus de l'autophagie (Xu and Ren, 2015), mais également la séquestration des métaux et des polluants organiques qui peuvent provoquer des dommages cellulaires (Lowe and Fossato, 2000). En cas de forte contamination, les membranes lysosomales peuvent se fragiliser et leur perméabilité peut être affectée négativement à cause d'une production de ROS trop importante engendrant par la suite le relargage du contenu lysosomal dans le cytoplasme. La capacité de stockage des lysosomes peut également arriver à saturation en cas d'une concentration en polluant trop élevée. L'évaluation de l'état du système lysosomal des hémocytes au moyen du test de rétention du rouge neutre (TRRN) a été largement utilisée en tant que biomarqueur dans les études écotoxicologiques sur les métaux chez les organismes marins (Aliko et al., 2015; Nicholson, 2003; Taylor and Maher, 2014).



## 2.3. Biomarqueurs biochimiques

### 2.3.1. Le malondialdéhyde

L'accumulation de malondialdéhyde (MDA) est un marqueur de la peroxydation des lipides ce qui correspond à l'oxydation des lipides insaturés par des ROS ou par des enzymes. Les peroxydes de lipides, dérivés d'acides gras polyinsaturés, sont instables et se décomposent pour former une série complexe de composés. Parmi ceux-ci figurent les composés carbonylés réactifs, dont le plus abondant est le MDA (Figure 22).

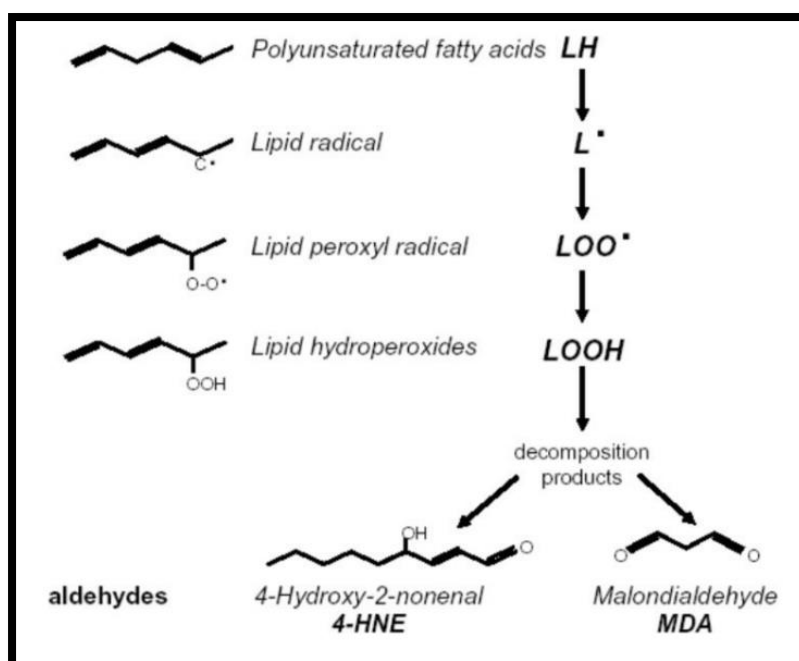


Figure 22 : Mécanisme de la peroxydation lipidique. La peroxydation lipidique conduit à la formation de produits de décomposition comme le 4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE) et le malondialdéhyde (MDA). D'après (Laouafa, 2018).

La quantification du MDA dans certains organes spécifiques comme la glande digestive a largement été utilisé comme biomarqueur de stress oxydatif chez les mollusques (Breitwieser et al., 2017; Luna Acosta et al., 2014; Moore et al., 2020; Mottier et al., 2015; Segueineau et al., 2011; Shaw et al., 2011; Sussarellu et al., 2012). Les paramètres environnementaux tel que l'hypoxie, la température et salinité peuvent également être impliqués dans la modulation des niveaux de MDA chez les mollusques (Shaw et al., 2011, 2004; Sussarellu et al., 2012). Mottier et al. (2014) ont notamment démontré que l'exposition à  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de glyphosate a induit une augmentation des niveaux de MDA chez des huîtres juvéniles après 56 jours d'exposition. Soltani et al. (2012) ont noté une induction de MDA chez les palourdes, *Donax trunculus*, prélevées sur un site connu pour sa forte concentration en contaminants d'origine industriels.

### 2.3.2. Le Glycogène

En tant que glucide complexe homopolymère du glucose, le glycogène constitue l'une des principales réserves énergétiques chez les mollusques. Quand il est mobilisé, il libère rapidement du glucose disponible pour le métabolisme. Cependant, en cas de stress environnementaux, des dépenses énergétiques additionnelles sont nécessaires pour maintenir l'homéostasie (Sokolova, 2013), ce qui peut se faire au détriment d'autres fonctions coûteuses en énergie comme la croissance ou la reproduction lors de la maturation des gamètes. Par conséquent, le métabolisme énergétique joue un rôle majeur dans l'adaptation et sa tolérance au stress. La Figure 23 présente le modèle intitulé « concept of energy-limited tolerance to stress » décrit par Sokolova (2013), qui présente comment l'allocation de l'énergie entre les différentes fonctions physiologiques est impacté par le stress environnemental.

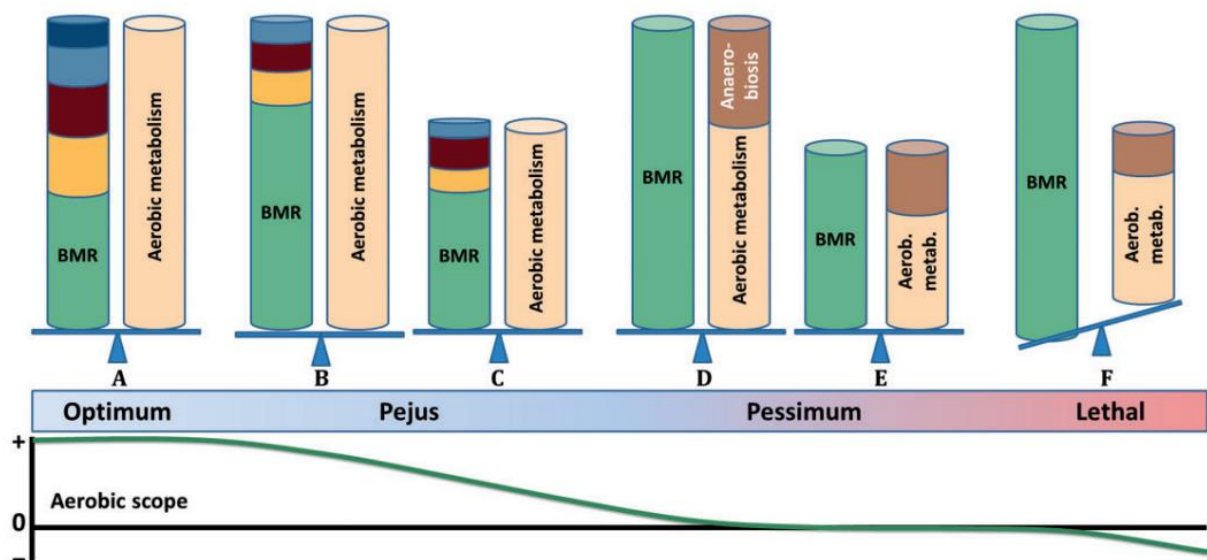


Figure 23 : Concept de tolérance au stress limitée par l'énergie. Vert = Maintenance de l'organisme. Jaune = Activité de l'organisme. Rouge foncé = Reproduction/maturation. Bleu clair = Croissance/développement. Bleu foncé = Constitution de réserves énergétiques. D'après Sokolova (2013).

Lorsqu'un organisme est dans un environnement avec des conditions optimales, l'ATP produit par le métabolisme aérobie subvient à la demande d'énergie pour la maintenance, et l'excédent peut alors être alloué à la croissance, à la reproduction ou encore à la mise en réserve avec la synthèse du glycogène ou des lipides. En revanche, en cas de stress important, le coût énergétique de base dépasse les capacités aérobie de l'organisme à cause des demandes supplémentaires en énergie pour la protection contre le stress et pour la réparation des dommages, ce qui implique la mise en place du métabolisme anaérobie où l'énergie est allouée uniquement à la maintenance de l'organisme. Le stockage d'énergie est absent ou réduit dans ces conditions. Enfin, lors d'un stress extrême tel qu'une très forte contamination, le déséquilibre énergétique entraîne la mort de l'organisme qui ne peut plus

assurer ses fonctions vitales. Cette allocation relative de l'énergie aux différentes fonctions physiologiques varie selon les espèces et les stades de vie (Sokolova, 2013). De par leur milieu de vie, les mollusques intertidaux comme l'huître et l'ormeau sont des organismes relativement résistants aux stress environnementaux. Le dosage du glycogène est donc un excellent biomarqueur qui permet d'évaluer dans un premier temps les réserves énergétiques, mais aussi indirectement l'impact d'un stress environnemental subit par l'organisme.

### 2.3.3. L'indice Brix

Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes également intéressés à la mesure de l'indice Brix dans l'hémolymph des mollusques. Initialement, l'indice Brix permet de mesurer la fraction de saccharose dissous d'un liquide en fonction de l'indice de réfraction (IR). Il est très utilisé dans l'industrie agroalimentaire notamment dans le milieu viticole, pour les confitures, confiseries, sauces et sirops. Cependant, l'indice Brix est également utilisé depuis longtemps dans les laboratoires vétérinaires et médicaux comme une méthode rapide pour déterminer la concentration de solutés dans les fluides corporels (George, 2001). Des essais récents chez les crustacés décapodes marins montrent que l'indice Brix est en étroite corrélation avec les nutriments de l'hémolymph tels que les protéines, les triglycérides des muscles abdominaux et de l'hépatopancréas (Berry et al., 2019; Simon et al., 2015). Plusieurs auteurs considèrent ainsi l'indice Brix comme un indicateur fiable de l'état nutritionnel des crustacés. Même s'il ne reflète pas réellement la quantité de sucre dans l'hémolymph, c'est un biomarqueur pratique d'utilisation qui permet de comparer rapidement les effets de deux conditions expérimentales. Dans le cadre de nos expositions sur l'huître et l'ormeau, l'indice Brix de l'hémolymph de deux espèces de mollusques a été évalué pour la première fois.

## 2.4. Biomarqueurs histologiques

L'observation de la gonade des mollusques grâce à des préparations histologiques permet d'acquérir un certain nombre d'informations sur le sexe des individus, l'avancement de la gamétogenèse et la présence de dommages avec des lésions tissulaires. Des altérations des tubules gonadiques et de la glande digestive ont été observées chez le bivalve *Mizuhopecten yessoensis* en corrélation avec la présence de fortes concentrations en métaux dans des sites pollués de la mer du Japon (Syasina et al., 1997). Des concentrations sublétales de métaux comme le cadmium ont également induit une inhibition de la croissance des tubules gonadiques chez les mâles et les femelles de *M. edulis*, ainsi qu'une stimulation de la ponte (Kluytmans et al., 1988). Il a déjà été observé que les contaminations chimiques pouvaient induire des pontes importantes chez les bivalves, notamment les pesticides chez l'huître creuse *C. gigas* (Buisson et al., 2008), mais aussi la norfluoxétine chez la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*) et la fausse moule noire (*Mytilopsis leucophaeata*) à des

concentrations aussi faibles que 5  $\mu\text{M}$  (Fong and Biel, 2008). L'exemple le plus célèbre reste certainement celui des tributylétains (TBT) utilisés dans la production des peintures antifoulings dont un des effets secondaires était la masculinisation (imposex) des gastéropodes de l'espèce *Nucella lapillus* (Blaber, 1970), conduisant à la disparition de certaines populations. Chez les mollusques, l'émission des gamètes entraîne souvent des stress létaux et sublétaux pendant la période post-ponte (Li et al., 2010), qui peuvent être accentués en cas de stress environnementaux. Un indice gonadique moyen comme le MGI (mean gonad index) est un outil pratique reflétant la progression de la gamétogenèse qui permet de suivre les changements cycliques globaux dans les tissus reproducteurs d'un groupe d'individus en réponse à un contaminant (Gosling, 2003).

## 2.5. Embryotoxicité

Parmi les stades de vie étudiés pour évaluer l'impact potentiel des substances chimiques ou des rejets industriels dans l'environnement, les embryons et les larves de bivalves sont parmi les organismes les plus fréquemment employés dans les bioessais depuis les premiers travaux de Prytherch (1924) sur l'huître *Crassostrea virginica* (Prytherch, 1924). Il est clairement admis que les larves de bivalves sont plus sensibles aux métaux que les adultes de la même espèce (Boyden et al., 1975; Brereton et al., 1973; Calabrese et al., 1973; Golding et al., 2015; MacInnes, 1981; Markich, 2021; Martin et al., 1981; Nadella et al., 2013; Pagano et al., 1996; Wilson and Hyne, 1997), et représentent par conséquent le stade vie critique pour les essais de toxicité en laboratoire. La première préconisation de *C. gigas* pour l'évaluation de la qualité de l'eau *via* des essais d'embryotoxicité remonte au début des années 1970 (Woelke, 1972). Le temps d'exposition relativement court, de 24 h à 48 h après fécondation en fonction des espèces, associé à la sensibilité des bivalves font des tests d'embryotoxicité des outils particulièrement utilisés à des fins de surveillance de la toxicité en milieu marin. Chez l'huître creuse, le test est basé sur le pourcentage de larves-D normales obtenu à la fin de l'embryogenèse et peut-être complété par l'analyse de la fréquence des différents types d'anomalies larvaires, ou encore du suivi du comportement natatoire des larves. Les résultats de ces bioessais permettent de déterminer les seuils de toxicité pour une grande variété de contaminants (His et al., 1997).

### 3. Matériels et Méthodes

Cette section a pour objectif d'apporter des précisions méthodologiques sur les biomarqueurs étudiés chez l'huître et l'orveau par rapport au contenu des articles.

#### 3.1.Organismes

- **Article 1** : les huîtres de 18 mois ont été fournies par la ferme conchyicole " Thalassa " de Blainville-sur-mer (Manche, France).
- **Article 2** : les géniteurs huîtres nécessaires aux fécondations ont été fournis par Guernesey Sea Farms (Guernesey, Royaume-Unis).
- **Article 3 et 4** : les orveaux ont été fournis par la ferme France Haliotis située à Plouguerneau (Bretagne, France).

#### 3.2.Biomarqueurs individuels

Au cours de toutes les expérimentations, les bacs ont été quotidiennement vérifiés afin d'écarter les individus morts et calculer les taux de mortalité. À chaque date d'échantillonnage, les mollusques étaient mesurés (longueur, largeur et épaisseur à 0,01 mm près) et pesés (avec et sans coquille à 0,01 g près) après avoir été placés sur du papier absorbant pour éliminer le surplus d'eau. Les coquilles vides ont également été pesées. La condition des orveaux a été évaluée en utilisant l'indice de condition suivant (Friedman et al., 1997):

$$\text{Indice de condition} = \frac{\text{Poids total} - \text{Poids de chair}}{\text{Poids total}}$$

La condition des huîtres a été évaluée à l'aide de l'indice de condition de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) et l'indice de Walne et Mann (Walne and Mann, 1975) :

$$\begin{aligned} \text{Indice de condition AFNOR} &= \frac{\text{Poids de chair}}{\text{Poids total}} \times 100 \\ \text{Indice de condition Walne and Mann} &= \frac{\text{Poids de chair sec}}{\text{Poids de coquille}} \times 100 \end{aligned}$$

Lors de la première exposition sur les huîtres, les organismes n'ont pas été marqués individuellement ce qui ne nous a pas permis de calculer des taux de croissance individuel. En revanche, les orveaux ont tous été marqués avec du vernis ce qui nous a permis de calculer plusieurs indicateurs comme le taux croissance pondérale (% d<sup>-1</sup>) et la croissance linéaire (mm d<sup>-1</sup>) :

$$\begin{aligned} \text{Taux de croissance pondéral} &= \left( \left( \frac{\text{Poids total final}}{\text{Poids total initial}} \right)^{\frac{1}{\text{temps}}} - 1 \right) \times 100 \\ \text{Croissance linéaire} &= \frac{\text{Longueur final de coquille} - \text{Longueur initial de la coquille}}{\text{temps}} \end{aligned}$$

Les ormeaux ont été nourris avec des algues *P. palmata* tout au long de l'expérimentation. Chaque semaine, les algues initiales données aux ormeaux ont été pesées (iA), les algues restantes de chaque réservoir ont été recueillies dans un tamis, drainées avec une essoreuse à salade et pesées (rA). Cinq bacs témoins d'ingestion contenant de l'eau et des algues contaminées à différentes concentrations ont également été utilisés pour déterminer le poids des algues naturellement dégradées dans un environnement sans ormeaux (dA). Le taux d'ingestion (g d'algue consommé/ind/day), et le taux de conversion (g d'algue consommé/g de gain de poids frais) ont été calculés après les 85 jours d'exposition comme suit :

- Taux d'ingestion = 
$$\frac{(iA-rA)-dA}{\text{Nombre d'ormeaux} \times 85 \text{ (jours d'exposition)}}$$
- Taux de conversion = 
$$\frac{(iA-rA)-dA}{\text{Gain de poids au cours de l'exposition}}$$

### 3.3. Biomarqueurs immunitaires

L'hémolymphe des mollusques a été prélevé au niveau du muscle adducteur postérieur, à l'aide d'une aiguille stérile hypodermique (calibre 25) montée sur une seringue en plastique de 5 mL (Figure 24). L'hémolymphe de chaque huître et ormeau a été transféré dans un microtube individuel ou un tube falcon 15 mL sur la glace. Pour les ormeaux, le tube contenait préalablement 1 mL de solution d'Alsever modifiée stérile refroidie (115 mM de glucose ; 27 mM de citrate de sodium ; 11,5 mM d'EDTA ; 382 mM de NaCl) qui est une solution anticoagulante et qui empêche l'agrégation des cellules (Bachère et al., 1988). Pour chaque prélèvement, une fraction a été examinée en microscopie optique pour évaluer la qualité de l'échantillon et écarter les potentielles contaminations par les gamètes. Un comptage sur cellule de Thoma a également été effectué afin de déterminer la concentration en cellules. Ainsi, un volume équivalent à 100 000 cellules de chaque échantillon a été déposé dans des nouveaux tubes pour l'analyse de l'activité phagocytaire, des ROS et du système lysosomal.

#### 3.3.1. Activité phagocytaire

L'activité phagocytaire des hémocytes de mollusque a été quantifiée grâce à l'ajout de billes fluorescentes (F8823, 1µm de diamètre, Invitrogen®) dans le milieu. Ces billes sont couplées à de la fluorescéine (FITC) ce qui permet leur détection par le cytomètre. À partir d'une solution stock à  $3,6 \cdot 10^{10}$  billes mL<sup>-1</sup>, celles-ci sont ajoutées dans le milieu à raison de 100 billes par cellule. Une solution mère est préparée en utilisant 5,6 µl de billes fluorescentes ajoutées à 194,4 µl de tampon MPS (Molluscan Physiological Saline) ( $4 \cdot 10^{-1}$  M NaCl ;  $1 \cdot 10^{-1}$  M MgSO<sub>4</sub> ;  $2 \cdot 10^{-2}$  M HEPES ;  $1 \cdot 10^{-2}$  M CaCl<sub>2</sub> ;  $1 \cdot 10^{-2}$  M KCl). Après 40 min d'incubation à 17 °C, une solution de Hoechst (H3570, Sigma Aldrich®) est ajoutée à 0,2 µg mL<sup>-1</sup> (concentration finale), qui est un composé se fixant à l'ADN des cellules vivantes permettant ainsi de les détecter par fluorescence et permet d'éliminer les débris. Après 20 min

d'incubation supplémentaire, les cellules sont fixées au formaldéhyde 3 %. Tous les échantillons sont conservés à 4°C jusqu'au passage en cytométrie en flux (CytoFLEX, Beckman® Coulter), installé sur la plateforme de cytométrie en flux (SF ICORE). La fluorescence est mesurée à l'aide du canal FL1 (500-530-nm). Au total, 10 000 événements ont été comptés pour chaque échantillon et l'efficacité phagocytaire des hémocytes a été évaluée comme le pourcentage d'hémocytes ayant phagocyté au moins trois billes (Delaporte, 2003). Les données des huîtres et des ormeaux présentées dans les articles 1 et 4 de ce manuscrit ont été traitées avec le logiciel d'acquisition et d'analyse CytExpert (Beckman® Coulter) spécifiquement développé pour le modèle CytoFLEX.

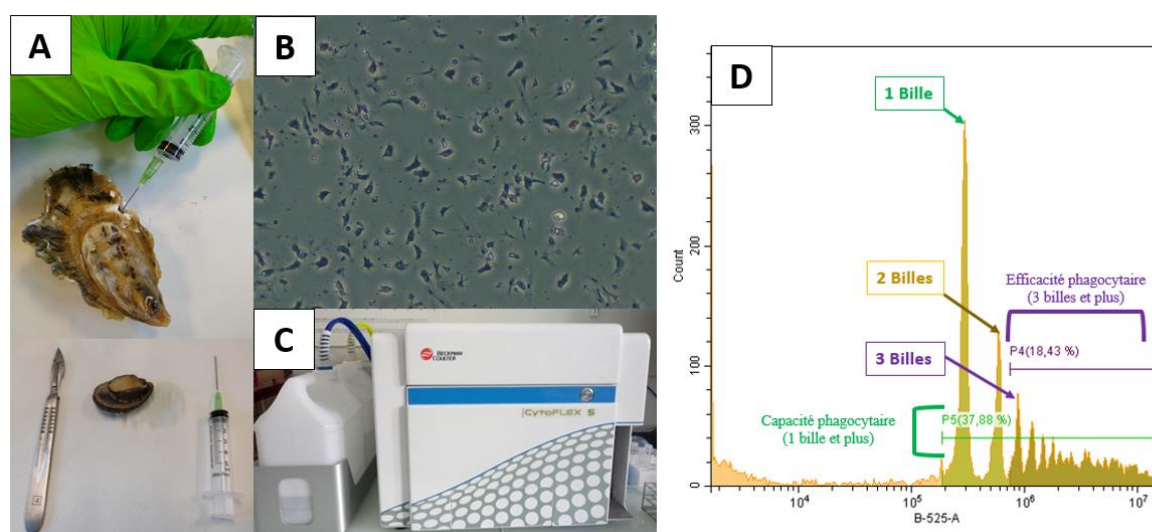


Figure 24 : Schéma montrant les grandes étapes de l'étude de l'activité phagocytaire des hémocytes par la cytométrie en flux. Prélèvement d'hémolymphe dans le muscle adducteur d'une huître ou d'un ormeau à l'aide d'une seringue (A). Observation des hémocytes au microscope optique (B). Passage des échantillons en cytométrie en flux, Cytoflex (Beckman® Coulter) (C). Cytogramme montrant le pourcentage d'hémocytes ayant au moins phagocyté une bille fluorescente (capacité phagocytaire) et le pourcentage d'hémocytes ayant au moins phagocyté trois billes fluorescentes (efficacité phagocytaire) (D).

### 3.3.2. Production de ROS

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) des hémocytes a été quantifiée par l'ajout de diacétate 2,7-dichlorofluorescéine (DCFH-DA, Sigma, concentration finale = 10 µM) qui se diffuse dans les cellules pendant la phase d'incubation d'une heure (Lambert et al., 2003). Dans le cytoplasme, les groupes acétate (-DA) sont éliminés par l'estérase ; le DCFH est ainsi piégé dans les cellules. Le DCFH intracellulaire, qui est un analogue non fluorescent de la fluorescéine, est oxydé en dichlorofluorescéine (DCF qui devient fluorescent) par les hémocytes pour produire des ROS. L'oxydation du DCFH intracellulaire est quantitativement reliée au métabolisme oxydatif des hémocytes et est médiée par le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Après l'heure d'incubation, les échantillons sont fixés au formaldéhyde 3 % et conservés à 4°C jusqu'au passage en cytométrie en flux (Cytoflex, Beckman® Coulter). La production de DCF donne lieu à une fluorescence verte, mesurable

sur le détecteur FL1 du cytomètre. Les résultats de la production de ROS sont exprimés en pourcentage de cellules présentant une fluorescence. Les données des huîtres et des ormeaux présentées dans les articles 1 et 4 de ce manuscrit ont été traitées avec le logiciel d'acquisition et d'analyse CytExpert (Beckman® Coulter) spécifiquement développé pour le modèle CytoFLEX.

### 3.3.3. Test de rétention du rouge neutre

L'état du système lysosomal des hémocytes de mollusques a été évalué à l'aide du test de rétention du rouge neutre (TRRN) selon le protocole utilisé par Minguez et al. (2014). Un volume d'hémolymphe contenant 100 000 hémocytes est ajouté dans les puits d'une microplaque 24 puits et les cellules sont ensuite incubées 45 minutes à 17°C afin de permettre leur adhésion dans le fond des puits. Une solution de rouge neutre est préparée avec 10 mg de rouge neutre dilués dans 347 µl de DMSO et filtrés à l'aide d'une seringue (0,22 µm, Millipore). Puis, 100 µL de filtrat sont mélangés à 50 mL de MPS. Après l'adhérence des hémocytes, 200 µL de la solution de rouge neutre sont déposés dans chacun des puits et la plaque est ensuite incubée à l'obscurité pendant 1 heure à 17°C. Les puits sont de nouveau rincés 2 fois avec 150 µL de MPS afin d'éliminer les cellules non adhérentes, les débris cellulaires ainsi que le surplus de rouge neutre non incorporé dans les lysosomes. Deux-cents microlitres d'un tampon de lyse (1:50:49 v/v/v d'acide acétique, éthanol absolu, eau Milli-Q) sont ajoutés à chaque puits et la plaque est mise à l'obscurité pendant 45 minutes de façon à lyser les cellules et relarguer le RN contenu dans les lysosomes. La mesure d'absorbance est réalisée au lecteur de microplaque (Flexstation 3, Molecular Device®, Sunnyvale, CA, USA) situé sur le plateau technique Proteogen à 540 nm.

Le colorant rouge neutre est absorbé dans les cellules par diffusion membranaire où il se piège dans le compartiment lysosomal (Lowe and Pipe, 1994; Rashid et al., 1991). Une différence de densité optique peut refléter une altération de la membrane des lysosomes, une différence de numération des lysosomes dans les hémocytes ou encore une différence de taille des lysosomes. Les cellules mortes ou les cellules dont la membrane est endommagée ne peuvent pas accumuler le colorant, et lors des étapes de lavage, le colorant ne sera pas retenu. Les échantillons contenant des cellules endommagées, des cellules avec moins de lysosomes ou des lysosomes de plus petite taille seront en conséquence moins colorés.

## 3.4. Biomarqueurs biochimiques

Après l'acquisition des données biométriques et les prélèvements d'hémolymphe, la masse viscérale des mollusques a été disséquée dans le but de récupérer plusieurs échantillons comme décrit dans la Figure 25. Un échantillon de branchie ainsi qu'un échantillon de glande digestive ont été prélevés pour le dosage du MDA et des protéines. Après avoir écarté le bord du manteau et les



branchies, un échantillon du reste de la masse viscérale est prélevé afin de doser le glycogène. Une fois pesés, tous les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à l'étape de broyage. Une coupe transversale dans la gonade des huîtres et des ormeaux a également été effectuée dans le but de réaliser des analyses histologiques décrites dans la section suivante.

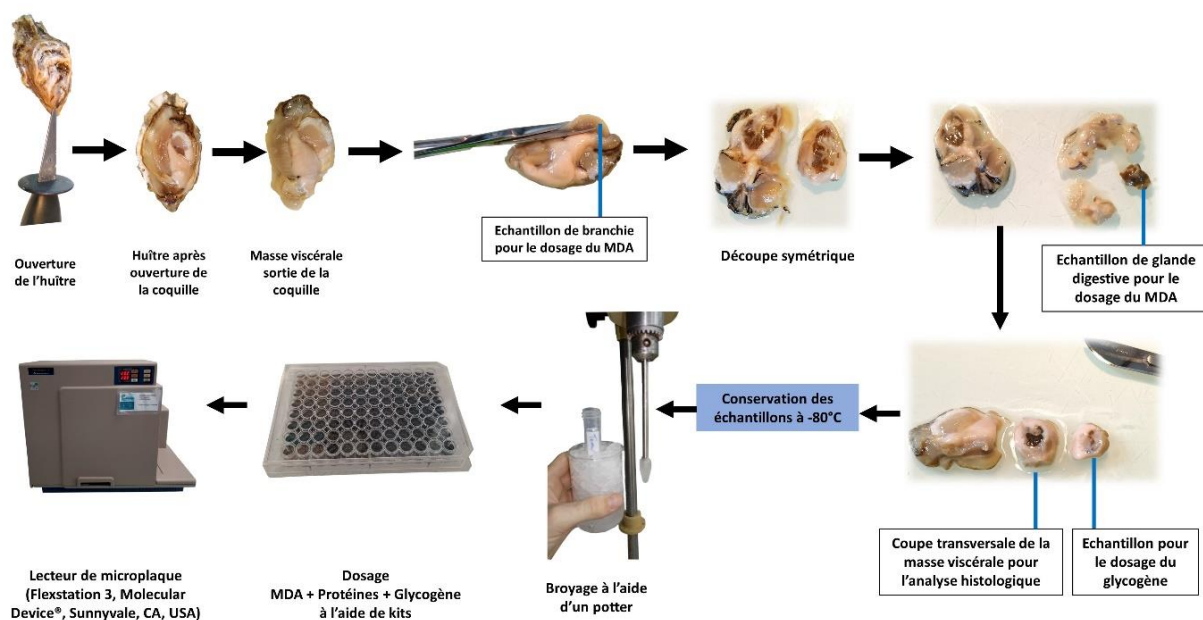


Figure 25 : Schéma du protocole de dissection, de broyage et d'analyse des biomarqueurs biochimiques étudiés chez l'huître et l'ormeau. Pour plus de simplicité, seule l'huître est représentée sur le schéma.

### 3.4.1. Dosage du MDA

Après prélèvement comme décrits ci-dessus, du PBS (Phosphate-buffered saline) (NaCl 500 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,1 mM, pH 7,4), contenant du BHT (hydroxytoluène butylé) (1 mL de BHT 500 mM pour 99 mL de PBS) qui est un agent antioxydant, a été ajouté aux échantillons de branchie et de glande digestive dans une proportion volume/poids de 5 µl par mg de tissu. Les échantillons ont été broyés à l'aide d'un Potter–Elvehjem pendant 1 minute à 1400 tours min<sup>-1</sup>. Les échantillons ont ensuite été centrifugés (10 000 x g, 10 min, 4°C) puis les surnageants aliquotés et stockés à -80°C jusqu'au dosage. Les mêmes aliquots ont été utilisés pour déterminer la teneur en protéines et en MDA. Le dosage MDA a été réalisé avec un kit (MDA-586, Oxis-Research®). Après décongélation, les échantillons de glande digestive d'huître et d'ormeau et de branchie d'ormeau ont été dilués au 1/5 et les échantillons de branchie d'huître au 1/2 dans de l'eau ultrapure afin d'obtenir une concentration finale entre 1 et 8 mg protéines mL<sup>-1</sup>. Puis, 30 µL d'échantillon ou de standard MDA sont mélangés avec 1,5 µL de probucol, 96 µL de réactif R1 dilué (N-méthyl-2-phénylindole dans de l'acétonitrile avec ¼ de méthanol) et 22,5 µL de réactif R2 (acide chlorhydrique concentré). Après 60 minutes d'incubation à 45°C dans un bain sec, les échantillons ont été de nouveau centrifugés (10 000

x g, 10 min, 4°C). Enfin, 80 µL de surnageant ont été déposés dans les puits d'une plaque 96 puits et la lecture s'effectue au lecteur de microplaque à 586 nm (Flexstation 3, Molecular Device®, Sunnyvale, CA, USA). Le kit de dosage du MDA est relativement non spécifique, le MDA libre et le MDA lié aux protéines peuvent tous les deux réagir d'où la nécessité d'effectuer également un dosage des protéines sur les mêmes échantillons pour rapporter la concentration de MDA à la concentration en protéines. Les résultats sont alors exprimés en nmol MDA mg<sup>-1</sup> protéine.

### 3.4.2. Dosage des protéines

La teneur en protéines a été déterminée à l'aide d'un kit de dosage des protéines (Bradford reagent B6916-500mL, Sigma-Aldrich®) selon la méthode Bradford (Bradford, 1976). Les échantillons ont été disséqués et broyés de la même façon que pour le dosage du MDA. Après décongélation, les échantillons ont été dilués au 1/10 dans du PBS afin que les valeurs de DO soient incluses dans la gamme de sérum albumine bovine (BSA). Cinq microlitres de chaque échantillon et de la gamme de BSA ont été déposés dans les puits d'une microplaque 96 puits, après quoi 250 µL de réactif Bio-Rad ont été ajoutés. L'absorbance a été déterminée à 595 nm avec un lecteur de microplaques (Flexstation 3, Molecular Device®, Sunnyvale, CA, USA). Les résultats sont exprimés en mg mL<sup>-1</sup>.

### 3.4.3. Dosage du Glycogène

Après décongélation, de l'eau ultra pure a été ajoutée à chaque échantillon dans une proportion volume/poids (100 µL pour 0,01 g). Les tissus ont été broyés à l'aide d'un Potter–Elvehjem pendant 1 minute à 1400 tours min<sup>-1</sup>. Les échantillons ont ensuite été mis à bouillir pendant 5 minutes pour procéder à l'inactivation des enzymes puis ils ont été centrifugés (3 000 x g, 5 min, 4°C). Le surnageant a été récupéré et de nouveau centrifugé (10 000 x g, 5 min, 4°C). Les surnageants sont aliquotés et stockés à -80°C jusqu'au dosage. Le dosage du glycogène a été réalisé à l'aide du kit de test glycogène (MAK016-1KT, Sigma-Aldrich®). Après décongélation, les échantillons d'huître sont dilués au 1/1000 et les échantillons d'ormeaux au 1/50 avec de l'eau ultra pure. Au fond de chaque puits d'une plaque 96 puits, ont été déposés 50 µL de la gamme de glycogène et des échantillons en duplicats. Le mix d'enzymes hydrolytiques (2 µL) a ensuite été déposé dans un seul des duplicats étant donné que le second sert de blanc pour éliminer le bruit de fond dû au glucose. La plaque a ensuite été mise à incuber pendant 30 minutes à température ambiante. Puis, 50 µL d'un « Master Reaction Mix » ont été ajoutés dans chaque puits avant d'entamer une seconde incubation de 30 minutes à l'obscurité et sous agitation à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 570 nm par un lecteur de microplaques (Flexstation 3, Molecular Device®, Sunnyvale, CA, USA). Les résultats sont exprimés en mg glycogène g<sup>-1</sup> chair.

### 3.4.4. Indice Brix

Pour évaluer l'indice Brix des mollusques, 100 µl d'hémolymphe (prélevés préalablement dans le muscle adducteur des mollusques) ont été déposés sur réfractomètre numérique à compensation automatique de température (HI96801, Hanna Instruments®). De l'eau ultrapure a été utilisée comme blanc entre chaque échantillon. Les résultats sont exprimés en °Brix.

### 3.5. Biomarqueurs histologiques

Comme décrit dans la Figure 25, une coupe transversale réalisée dans la masse viscérale des huîtres et des ormeaux a servi pour les analyses histologiques dans l'objectif de déterminer les stades de gamétogenèse des individus. Concernant les huîtres, les coupes ont été réalisées derrière les palpes labiaux (5 mm d'épaisseur), et concernant les ormeaux, dans la partie terminale de la gonade (5 mm d'épaisseur). Les échantillons ont été placés 48 h dans un bain de Davidson (1 vol. de glycérol, 2 vol. de formaldéhyde 37%, 3 vol. d'éthanol 95% et 3 vol. d'eau de mer filtrée) et préparés comme déjà décrit dans plusieurs publications (Di Poi et al., 2016; Mottier et al., 2015; Séguin, 2016). Les échantillons ont ensuite été traités en routine histologique, et les coupes de 3 µm incluses en paraffine ont été colorées selon le protocole trichrome de Prenant Gabe (Gabe, 1968). Pour chaque individu le sexe et le stade de gamétogenèse ont été déterminés comme d'après les Tableaux II et III présents dans les parties *Reproduction et cycle de vie* de ce manuscrit (4.1.1.4 et 4.1.2.4). Un indice de maturité sexuel (MGI) a ensuite été calculé pour chaque condition et durée d'exposition. Il correspond à un code numérique qui traduit l'avancement de la gamétogenèse et permet de suivre les changements cycliques des tissus reproducteurs pour l'ensemble des individus d'une condition. Un coefficient (Tableau VII) est attribué à chaque stade en fonction de son avancement dans la gamétogenèse et comme aucun décalage n'a été observé dans la maturation gonadique entre les individus mâles et femelles, les codes numériques des femelles et des mâles ont été combinés pour calculer le MGI. Ce dernier a été calculé en multipliant le nombre d'individus de chaque stade par le coefficient du stade correspondant et le total divisé par le nombre d'individus :

$$\text{MGI} =$$

$$\frac{(\text{nombre d'individu au stade } n \times \text{coefficient du stade } n) + \dots + (\text{nombre d'individu au stade } n + 1 \times \text{coefficient du stade } n + 1)}{\text{nombre total d'individus}}$$

Tableau VII : Attribution des coefficients en fonction des stades de gamétogenèse chez l'huître et l'ormeau pour le calcul du MGI.

| Stades de gamétogenèse<br>chez l'huître | Coefficient | Stades de gamétogenèse<br>chez l'ormeau | Coefficient |
|-----------------------------------------|-------------|-----------------------------------------|-------------|
| 0                                       | 0           | I                                       | 0           |
| 1                                       | 1           | II                                      | 1           |
| 2                                       | 2           | III                                     | 2           |
| 3a                                      | 3           | IV                                      | 3           |
| 3b                                      | 3,5         | V                                       | 1,5         |
| 3d                                      | 1,5         | VI                                      | 0,5         |

### 3.6. Test d'embryotoxicité

Dans le cadre des travaux de thèse, des expérimentations ont également été menées sur des larves d'huîtres. À ces fins, des huîtres conditionnées ont été commandées à Guernesey Sea Farm (Ecloserie, Guernesey, Royaume-Uni). Les larves ont été obtenues en utilisant la procédure standardisée AFNOR (NF ISO 17244, 2015). Brièvement, les gamètes mâles et femelles ont été obtenus par stimulation thermique, les huîtres ont été alternées toutes les 30 minutes entre des bains à 16 et 28 °C. La qualité des gamètes a été vérifiée au microscope : des spermatozoïdes très concentrés et mobiles ainsi qu'un grand nombre d'ovocytes matures, aussi uniformes que possible, légèrement pyriformes avec un cytoplasme granulaire homogène. Après l'émission des gamètes, les ovocytes ont été filtrés sur des tamis avec des pores de 100 µm et les spermatozoïdes sur des tamis avec des pores de 40 µm afin d'éliminer les résidus potentiels. La densité d'ovocytes de la femelle sélectionnée a été déterminée à l'aide d'une cellule de comptage Mallassez. Les spermatozoïdes ont été ajoutés progressivement à la solution d'ovocytes à raison de 10 spermatozoïdes par ovocyte. Le béccher où a lieu la fécondation a été placé sur une table vibrante pour éviter la polyspermie. Vingt minutes après le début de la fécondation, les embryons ont été répartis à raison d'une densité de 60 000 L<sup>-1</sup> dans les puits d'une plaque 24 puits où l'eau contaminée avait été préalablement ajoutée (120 embryons par puits). Après 24 h à 24 °C dans l'obscurité sans alimentation, les larves D ont été fixées à l'aide de 40 µL d'une solution de formol à 8% (20 mL L<sup>-1</sup>). Les larves de chaque puits ont été observées à l'aide d'un microscope binoculaire inversé à un grossissement de 400x (Leica R DM IRB). Les analyses ont permis de calculer les taux d'anomalie et de déterminer les types d'anomalie (Figure 26). Les larves ont été considérées comme anormales si une ou plusieurs des caractéristiques suivantes étaient évidentes : (i) embryons malformés n'ayant pas atteint le stade D (arrêt du développement), (ii) larves D présentant des déformations de la coquille (c'est-à-dire une charnière convexe, un bord de coquille abimé et/ou une coquille incomplète), (iii) une hypertrophie du manteau (avec/sans anomalie supplémentaire de la coquille).

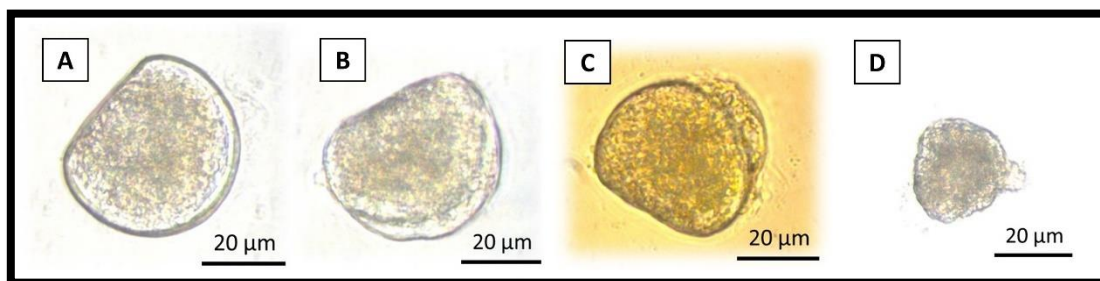


Figure 26 : Photos de microscopie optique (x400) montrant la morphologie des stades de développement de *Crassostrea gigas* à 24 h : larve normale en forme de D (A) ; larve présentant une coquille anormale (B) ; larve présentant un manteau hypertrophié (C) ; embryon présentant un arrêt de développement (D).

Les tests ont été considérés comme acceptables si le pourcentage de larves D normales dans les expositions témoins était  $\geq 80\%$  comme décrit selon la norme AFNOR (NF ISO 17244, 2015). En outre, tous les ovocytes non fécondés observés ont été comptés afin de calculer un taux de fécondation. Les résultats du développement embryo-larvaire des organismes exposés ont été exprimés en pourcentages nets de développement normal (NPNe) des larves de forme D par rapport à la réponse du témoin ( $\pm$  SD) tels que calculés dans une étude précédente (Mottier et al., 2013) :

$$(1) \text{ NPNe} = 100 - \left[ \frac{\text{PAe} - \overline{\text{PAC}}}{100 - \overline{\text{PAC}}} \times 100 \right]$$

$$(2) \text{ PAe} = \frac{\text{NAe} \times 100}{\text{Te}}$$

(3) NAe = nombre de larves anormales dans le réplicat d'une condition

(4) Te = nombre total de larves dans le réplicat d'une condition

(5)  $\overline{\text{PAC}}$  = moyenne de PAC (pour une condition)

$$(6) \text{ PAC} = \frac{\text{NAC} \times 100}{\text{Tc}}$$

(7) NAC = nombre de larves anormales dans un réplicat témoin

(8) Tc = nombre total de larves dans un réplicat témoin

La toxicité du cocktail des métaux de l'anode et du mélange de chlorure d'aluminium avec du chlorure de zinc a été analysée selon un modèle de rapport synergique (SR) (Plackett and Hewlett, 1963), utilisé dans d'autres études (Di Poi et al., 2018; Gamain et al., 2017):

$$\text{SR indice} = \frac{\text{EC50 d'un métal tout seul}}{\text{EC50 d'un métal dans un cocktail}}$$

Où, si SR = 1, l'action du cocktail métallique est décrite comme additive ; si SR < 1, l'action du cocktail métallique est décrite comme antagoniste ; si SR > 1, l'action du cocktail métallique est décrite comme synergique.

# L'huître creuse *Crassostrea gigas*

## Article 1: Effects of chronic exposure of metals released from the dissolution of an aluminium galvanic anode on the Pacific oyster *Crassostrea gigas*

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal Aquatic Toxicology.

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106223>

Aquatic Toxicology 249 (2022) 106223



Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

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



### Effects of chronic exposure of metals released from the dissolution of an aluminium galvanic anode on the Pacific oyster *Crassostrea gigas*

Alexandre Levallois<sup>a</sup>, Christelle Caplat<sup>a</sup>, Olivier Basuyaux<sup>b</sup>, Jean-Marc Lebel<sup>a</sup>, Antoine Laisney<sup>b</sup>, Katherine Costil<sup>a</sup>, Antoine Serpentine<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Biologie des Organismes et Écosystèmes Aquatiques (BOREA) Université de Caen Normandie UNICAEN, Sorbonne Université, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UA, CNRS 8067, IRD 207, Esplanade de la paix, Caen F-14032, France

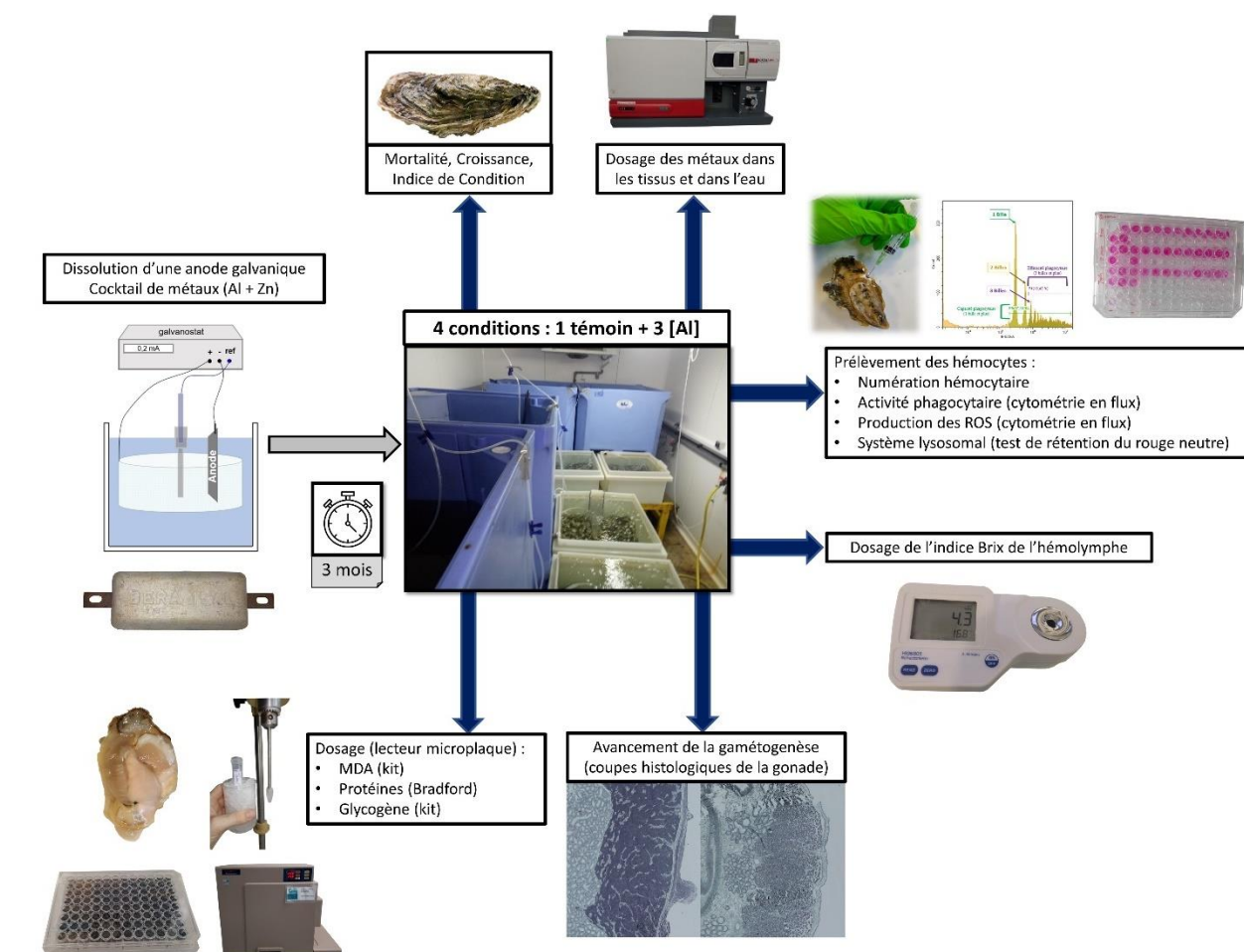
<sup>b</sup> Synergie Mer et littoral (SMEL), Zac de Blainville, Blainville-sur-Mer F-50560, France

#### Résumé de la publication

Dans cet article, les effets des métaux issus de la dissolution d'une anode galvanique à base d'aluminium ont été caractérisés chez l'huître à plusieurs niveaux. Les huîtres ont été exposées pendant trois mois à trois concentrations nominales d'aluminium (50, 100 et 300  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) obtenues avec un dispositif expérimental électrochimique simulant la dissolution d'une anode galvanique dans le milieu marin afin d'obtenir le même cocktail de métaux avec la même spéciation chimique que dans l'environnement. À différents temps d'exposition (24 heures, 1 semaine, 1 mois, 2 mois et 3 mois), nous avons étudié une batterie de biomarqueurs afin de pouvoir réaliser des cinétiques. Le système immunitaire a été étudié au travers des prélèvements d'hémolymphe, de la quantification de l'activité phagocytaire et la production de ROS des hémocytes, ainsi que l'étude de leur système lysosomal. Un échantillon de gonade a permis la préparation de coupes histologiques pour la détermination des stades de gamétogenèse en microscopie optique. Un échantillon de branchie ainsi qu'un échantillon de glande digestive ont été prélevés pour le dosage du malonaldéhyde qui est un marqueur de la

peroxydation lipidique, celle-ci étant assimilée à un indicateur de stress oxydatif. Enfin, les réserves énergétiques ont été investiguées à l'aide du dosage du glycogène dans les tissus et de la mesure de l'indicateur Brix dans l'hémolymphe, chose qui à notre connaissance n'avait jamais été réalisé chez un mollusque. Les concentrations en métaux ont été quantifiées dans les tissus des huîtres au cours de l'exposition afin d'étudier la capacité de bioconcentration de ces bivalves. Sur la base des concentrations testées et des conditions expérimentales, les anodes galvaniques ne semblent pas présenter un risque environnemental direct pour l'huître creuse étant donné l'absence de mortalité significative. Néanmoins, les résultats ont montré une sensibilité des huîtres à la plus forte concentration testée ( $296 \mu\text{g L}^{-1}$  d'Al). Nous avons constaté certains effets biologiques significatifs, notamment concernant la teneur en malondialdéhyde dans la glande digestive après 84 jours d'exposition. De plus, l'activité phagocytaire des hémocytes a diminué de près de 40 % dans la condition C3 par rapport au témoin. Cependant, cette différence n'est pas statistiquement significative. Les autres biomarqueurs étudiés n'ont pas été modulés de façon significative en réponse à l'exposition aux différentes concentrations des métaux libérés par l'anode galvanique. Les huîtres ont bioaccumulé d'avantage le zinc par rapport à l'aluminium, même si ce dernier était présent à des concentrations bien plus élevées dans le milieu que le zinc. De plus, il semble que le temps d'exposition n'a pas influencé la bioaccumulation de l'aluminium contrairement à celle du zinc qui s'est faite de manière plus graduelle au cours du temps. Il est possible que la bioconcentration en zinc n'ait pas atteint son plateau à la suite des 3 mois d'exposition.

## Récapitulatif du protocole expérimental



|                            |                                                     | T0                                                                  | T 24 heures | T 7 jours | T 29 jours | T 47 jours | T 84 jours |
|----------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------|-----------|------------|------------|------------|
|                            |                                                     | 03/06/20                                                            | 04/06/20    | 10/06/20  | 02/07/20   | 20/07/20   | 26/08/20   |
| Biomarqueurs individuels   | Mortalité                                           | Vérifiée quotidiennement sur l'ensemble de la durée de l'exposition |             |           |            |            |            |
|                            | Croissance                                          | n = 14                                                              | n = 13      | n = 13    | n = 13     | n = 13     | n = 13     |
|                            | Indice de Condition                                 | n = 14                                                              | n = 13      | n = 13    | n = 13     | n = 13     | n = 13     |
| Bioaccumulation            | Concentrations en métaux dans les différents tissus | n = 10                                                              | n = 10      | n = 10    | n = 10     | n = 10     | n = 10     |
| Biomarqueurs histologiques | Avancement de la gamétogenèse                       | n = 14                                                              | n = 13      | n = 13    | n = 13     | n = 13     | n = 13     |
| Biomarqueurs biochimiques  | Dosage du MDA                                       | n = 8                                                               | n = 8       | n = 8     | n = 8      | n = 8      | n = 8      |
|                            | Dosage des protéines                                | n = 8                                                               | n = 8       | n = 8     | n = 8      | n = 8      | n = 8      |
|                            | Dosage du glycogène                                 | n = 8                                                               | n = 8       | n = 8     | n = 8      | n = 8      | n = 8      |
|                            | Indice Brix                                         | n = 14                                                              | n = 13      | n = 13    | n = 13     | n = 13     | n = 13     |
| Biomarqueurs immunitaires  | Numération hématocytaire                            | n = 14                                                              | n = 13      | n = 13    | n = 13     | n = 13     | n = 13     |
|                            | Activité phagocytaire                               | n = 14                                                              | n = 13      | n = 13    | n = 13     | n = 13     | n = 13     |
|                            | Espèces réactives de l'oxygène                      | n = 14                                                              | n = 13      | n = 13    | n = 13     | n = 13     | n = 13     |
|                            | Système lysosomal                                   | n = 14                                                              | n = 13      | n = 13    | n = 13     | n = 13     | n = 13     |



# Effects of chronic exposure of metals released from the dissolution of an aluminium galvanic anode on the Pacific oyster *Crassostrea gigas*

Levallois Alexandre<sup>1</sup>, Caplat Christelle<sup>1</sup>, Basuyaux Olivier<sup>2</sup>, Lebel Jean-Marc<sup>1</sup>, Laisney Antoine<sup>2</sup>, Costil Katherine<sup>1</sup>, Serpentine Antoine<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA) Université de Caen Normandie UNICAEN, Sorbonne Université, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UA, CNRS 8067, IRD, Esplanade de la paix, F-14032 Caen.*

<sup>2</sup> *Synergie Mer et littoral (SMEL), Zac de Blainville, F-50560 Blainville-sur-Mer.*

## Abstract

Among the anthropogenic sources releasing metallic species into the marine environment, the galvanic anode cathodic protection system (GACP) is widely used to protect submerged metallic structures from corrosion. Galvanic anodes are an alloy of metals of which the main component is aluminum or zinc. Very few studies were performed to study their potential biological effects. We investigated the chronic toxicity of an aluminum-based galvanic anode on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Oysters were exposed for three months to three concentrations of aluminum (50, 100 and 300  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) obtained with an electrochemical experimental device simulating the dissolution of a galvanic anode. At different exposure times, we studied a battery of biomarkers of the immune system, reproductive parameters and the metabolic state of the oysters. Results demonstrated a sensitivity of oysters at the highest concentration and some biological effects were observed especially for the malondialdehyde content in the digestive gland after 84 days of exposure. In addition to these biomarkers, the bioaccumulation of the different metals composing the anode was measured in oysters' tissues. Bivalves bioaccumulated more zinc than aluminum, even if aluminium was present in greater concentrations during exposures. Moreover, exposure time did not influence the bioaccumulation of aluminum in contrast to zinc.

**Keywords:** galvanic anode, aluminium, oyster, *Crassostrea gigas*, biological effects, bioaccumulation

## 1. Introduction

Coastal ecosystems are areas subject to significant pressure due to their anthropization, and they have become particularly vulnerable. Indeed, they are impacted by maritime transport, fishing, shellfish farming, sediment dredging, noise pollution, chemical pollution and many others. Among the anthropo-constructions affecting biodiversity, functioning and resilience of aquatic environments, merchant ships, port structures, wind farms or oil platforms are of particular interest. It is common practice to connect galvanic anodes on these steel structures as a corrosion protection system. This

type of cathodic protection (GACP for Cathodic Protection by Galvanic Anode) consists in controlling the corrosion of a metallic surface by means of an anode made of a metallic alloy of which electrochemical potential is lower than that of the metal to be protected (Guibert, 2009). The galvanic anode undergoes oxidation in the marine environment and releases various metals in the forms of ions or oxy-hydroxides into the environment. The principal metals composing the anodes are aluminium (Al), zinc (Zn) or magnesium because of their negative corrosion potential. Historically, zinc-based alloys were used first, but the use of aluminum-based galvanic anodes for the cathodic protection of metallic structures has been practiced since the early 1960s (Roy, 1968). The main advantages of Al are its availability, low cost, low density and uniform current distribution, which explains why it is more used in offshore structures (Guibert, 2009). As a metal alloy, galvanic anodes are known to significantly release toxicological elements (Reese et al., 2020). Depending on their physical and chemical behaviours in the solution phase, these elements are present in soluble fraction of the water or associated with suspended particulate matters, resulting in the deposition of these elements in sediments at proximity of the equipped installations when hydrodynamic conditions are low (Caplat et al., 2020). Along the marine coasts, more and more ports are equipping themselves with galvanic anodes to protect their metallic structures such as sheet piles or dolphin (pilings). Private individuals are also equipping the hulls of their pleasure boats for better protection over time. In addition, in the frame of the energy transition, the increasing installation of offshore wind farms also involves the installation of galvanic anodes. In an offshore wind farm of about 75 wind turbines, the galvanic anodes composed by Al alloy can represent a mass of about 15 tons per foundation, which corresponds to an estimated transfer of metals into water of  $105 \text{ kg day}^{-1}$  or approximately annually 45 tons of Al and 2 tons of Zn, contributing to the enrichment of aquatic environments with metals (Kirchgeorg et al., 2018).

It is therefore essential to study the impact that such a metal transfer can have on marine ecosystems. Dissolved aluminium concentrations in open sea are typically below  $0.7 \mu\text{g L}^{-1}$  (Tria et al., 2007). In coastal waters, Al concentrations vary from 0.1 to  $39.4 \mu\text{g L}^{-1}$  and can reach  $83 \mu\text{g L}^{-1}$  in heavily polluted ports (Angel et al., 2016; Golding et al., 2015). In the open ocean, zinc is present at concentrations of the order of  $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$  and concentrations are about  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  in coastal waters such as the English Channel with measurements about 3 à  $12 \mu\text{g L}^{-1}$  (Sheahan et al., 2007). However, levels reaching  $1,800 \mu\text{g L}^{-1}$  have already been recorded in some areas (Barcellos, 1995). Overall, the contribution of anodes to metal concentrations in marine waters appears to be low, except in confined areas with low hydrodynamics and shallow depths where aggregation and precipitation processes are observed in surface sediments (Caplat et al., 2010; Deborde et al., 2015). It has been recently shown that the dissolution of an aluminum-based galvanic anode induces a higher enrichment in Zn than Al

in the sediment (Caplat et al., 2020). Few studies have focused on the metals released from galvanic anodes and their potential effects on marine organisms. Recently, Bell et al (2020) observed slight effects on algal growth. Caplat et al. (2010) showed that Al and Zn from the dissolution of the galvanic anode were less toxic than sulphate salts on the sea urchin, *Paracentrotus lividus*. Further investigations are required to assess the impact of galvanic anodes on the marine environment.

Therefore, the main objective of our study was to investigate the chronic toxicity of aluminum-based galvanic anode on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), also known as *Magallana gigas*. Due to their feeding habits, bivalves concentrate environmental contaminants in their tissues by filtering large volumes of water and are therefore bioaccumulative species. This particularity and its economic importance make the pacific oyster a very useful model for the evaluation and monitoring of environments. In this work, oysters were exposed for 84 days to three concentrations of aluminium using an experimental device simulating the dissolution of a galvanic anode. At different exposure times, we analysed a battery of biomarkers of the immune system, reproductive parameters and the metabolic state of the oysters. The bioaccumulation of the different metals composing the anode was also measured in oysters' tissues.

## 2. Materials and Methods

### 2.1.Organisms

Pacific oysters of 18 months were collected by the experimental center « Synergie mer et littoral » (SMEL) from the shellfish farm "Thalassa" of Blainville-sur-mer (West coast of Normandy, France); oysters were from natural catchment. At the beginning of the experiment, homogeneous (ANOVA,  $p > 0.05$ ) in size and weight (averaged  $24.58 \pm 0.39$  g in weight and  $65.83 \pm 0.45$  mm in length) oysters' batches were constituted. The experiment was realized at Blainville-sur-mer in SMEL center, which dedicated an air-conditioned room to this objective. Oysters were acclimated for 1 month and the room temperature was 16°C.

### 2.2.Experimental structure and design

An electrochemical experimental device simulated the dissolution of an aluminum-based galvanic anode (GACP) in controlled conditions to obtain a transfer of metals with the same chemical speciation as in the marine environment (Figure 26). The device was equipped with reference electrode (saturated calomel electrode - SCE), a counter electrode (CE) made of a platinize-titanium alloy and an aluminum anode (Al Bera15, Bac Corrosion® Control). The assembly was electrically connected to a galvanostat as already realized in other studies (Caplat et al., 2012, 2010; Mao et al., 2011; Mottin et al., 2012). Aluminum-based galvanic anode is mainly composed of seven elements and the mass

percentages of each metal were given by the supplier as following: 93.2% to 97.1% of Al, 2.5% to 6.5% of Zn, 0.13% max of iron, 0.1% max of silicon, 0.01% to 0.03% of indium, 0.01% max of manganese and 0.006% max of copper. This experimental device provided 130 L of contaminated water with a high concentration of metals ( $[Al] = 11\,131 \pm 2\,764 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $[Zn] = 500 \pm 123 \mu\text{g L}^{-1}$ ) every 24 hours. Concentrations in water of the other anode constituents were all lower than the quantification limit.

The exposure was performed during 84 days (from June 2 to August 28, 2020). Regarding the oysters, 23 individuals were collected before the beginning of the experiment and 120 oysters per tank were randomly distributed in 4 experimental systems: 1 control and 3 aluminium nominal concentrations of 50, 100 and 300  $\mu\text{g L}^{-1}$  got after decantation process (for 24 h). Each experimental system was composed of 3 tanks (2 of 500 L and 1 of 160 L) (Figure 27).

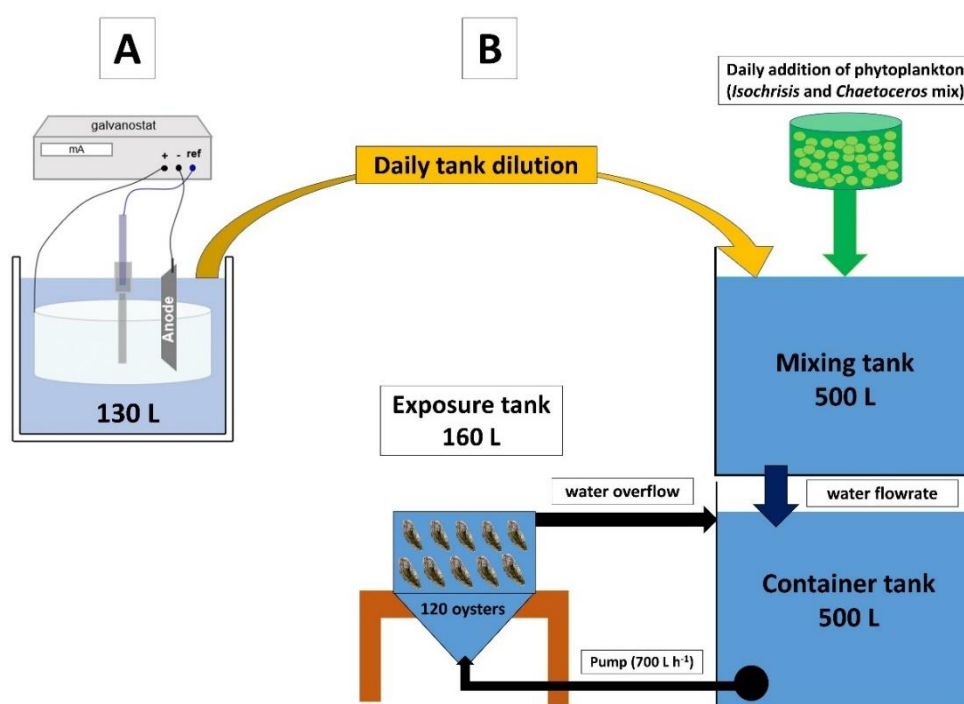


Figure 27 : Scheme of the electrochemical device consisting of a galvanostat and an aluminium galvanic anode simulating its degradation in the marine environment modified according to Caplat et al. (2010) (A). Scheme of the installation of the different tanks for the oysters' exposure to the products resulting from the dissolution of the aluminium galvanic anode. The setup is replicated 4 times for the control and the three aluminum concentrations tested (65, 125 and 296  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) (B).

The first 500 L tank was used for daily mixing of contaminated water, phytoplankton and natural seawater filtered to 50  $\mu\text{m}$ , as follows: every day, a volume of contaminated water, produced by the experimental device with the galvanic anode, was added to the mixing 500 L tank according to the targeted Al concentration. A mixture of phytoplankton (*Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans* in ratio 2:1) was daily added at a concentration of  $1.10^6$  cells per oyster. The volume of the mixing tank

was completed to 500 L with natural seawater. Then, the mixture of the first tank fell into the container tank located below the first one, which served as a reserve and for the decantation of metals. A pump (700 L h<sup>-1</sup>) installed in this container tank sent the contaminated water into the exposure tank, in which the oysters were placed on a sieve. Every two days the exposure tank was cleaned to remove all oyster faeces in the aim to limit the water quality degradation. Salinity (34.44 ± 1.04 PSU), temperature (16.27 ± 0.27 °C), carbonates (3.18 ± 0.74 meq L<sup>-1</sup>) and pH (8.06 ± 0.08) were continuously recorded with a multiparameter probe (NKE®, model STYPS+30-SI) and revealed stable under the 4 conditions. Oysters were sampled at five dates: 1 day and then 7, 29, 47 and 84 days. At each sampling date, 23 individuals per condition were randomly picked, 13 for biomarkers analyses and 10 for bioaccumulation assessments.

### 2.3. Biometric and histological biomarkers

In each experimental condition, the oysters were daily checked to discard dead oysters and calculate mortality rates. On each sampling date, all oysters collected were measured in length, width and thickness (to the nearest 0.01 mm), and weighted (to the nearest 0.01 g) to determine potential growth. The weight of the drained visceral mass and the empty shell are also recorded. These same oysters are used to determine two conditions index: the “Association Française de Normalisation” (AFNOR) condition index (CI) and the Walne and Mann index (Walne and Mann, 1975) respectively calculated as follows:

$$CI_{AFNOR} = (\text{flesh weight} / \text{total weight}) \times 100$$

$$CI_{\text{Walne and Mann}} = (\text{dry flesh weight} / \text{dry shell weight}) \times 100$$

For histology analysis, oyster cross-sections (5 mm thick) were cut behind the labial palps and fixed in Davidson’s solution (1 vol. glycerol, 2 vol. 37% formaldehyde, 3 vol. 95% ethanol and 3 vol. filtered seawater). Tissue samples were then routinely processed, and the 3 µm paraffin-embedded sections were stained according to the trichromatic protocol of Prenant Gabe (Gabe, 1968). For each individual, the sex and stage of gametogenesis were determined. A Mean gonad Index (MGI) reflecting the global cyclic changes in the reproductive tissues of oysters was calculated (Gosling, 2003) and a coefficient was assigned to each stage as follow: stage 0: sexual rest = 0; stage I: beginning of gametogenesis = 1; stage II: active gametogenesis = 2; stage IIIa: beginning of sexual maturity = 3; stage IIIb: beginning of spawning = 3.5; stage IIIc: advanced spawning = 1.5.

$$MGI = (\text{number of individuals at stage } n \times \text{coefficient of the stage } n) + \dots + (\text{number of individuals at stage } n_{+1} \times \text{coefficient of the stage } n_{+1}) / (\text{total number of individuals}).$$

## 2.4. Measures of metallic concentrations and bioaccumulation

Seawater samples were collected every week to determine total concentrations of Al and Zn by atomic absorption spectrometry (AAS). The aluminum was analyzed by a Zeeman Atomic Absorption Spectrometer Z-AAS (AA240Z – Varian) equipped with a graphite tube atomizer (FTA 120, Varian) and a programmable sample dispenser (PSD 120, Varian). Analyses were performed with a matrix modifier solution ( $2 \text{ g L}^{-1}$  of  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ). Each digested sample was analysed five times, and the mean of values was used for evaluation. Zn was analysed with air–acetylene flame atomic absorption spectrometry (F-AAS) using a Varian AA240F apparatus equipped with a deuterium lamp to correct non-specific absorption. Analyses were conducted on each sample in triplicate, and mean values were used for evaluation. The limit of detection for determination of each metallic concentration was defined as mean of blank analyses plus three times standard deviation (SD) of the blank analyses. A SD of  $3.1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  ( $n = 30$ ) was given for Zn and  $6.6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  ( $n = 45$ ) for Al.

Ten oysters for each condition and sampling date were dissected to measure metals in tissues. The visceral mass was weighed and then stored at  $-20^\circ\text{C}$ . The samples were freeze-drying then crushed with Teflon balls and mineralized with prior microwave acid sample digestion (Multiwave ECO, Anton Paar, Les Ulis, France) ( $800 \text{ } \mu\text{l}$  of concentrated and purified  $\text{HNO}_3$  (70%),  $200 \text{ } \mu\text{l}$  of purified  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $1 \text{ ml}$  of ultrapure water for  $40 \text{ mg DW}$ ). All samples were spiked with three internal-standard solutions of Gallium, Rhodium and Iridium for final concentrations of 5, 1 and  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively, diluted to  $50 \text{ ml}$  with Ultrapure water to obtain solutions containing 2.0 % (v/v) of nitric acid, and then filtered at  $0.45 \text{ } \mu\text{m}$  using a teflon filtration system (Digifiltre, SCP Science, Villebon-sur-Yvette, France). Total concentrations of several elements (Al, Ag, As, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, Pb and Zn) were measured by High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (HR ICP-MS Thermo Scientific™ Element 2™, Bremen, Germany and Element XR™). To assess the quality of the biota processing procedure, a standard reference material (SRM NIST-1566b oyster tissue from the National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) was analysed with a series of samples. The relative errors were less than 10% for all metal concentrations recorded in both standard reference materials, excepted for Pb and Al concentrations which ranged between 10% and 40%. Appropriate blanks were also analyzed in series with all the samples. The limit of quantification (LQ) for each element was calculated from 10 times the standard deviation of 25 measures of blanks. The limits of quantification for determination of the Al and Zn concentrations measured in seawaters (10 measures of blanks) were respectively of  $6.4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  for and  $7.7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ .

Bioconcentration factors (BCFs) were used to assess the capacity of oysters to accumulate Al and Zn from environment (Adams et al., 2000). BCF was calculated as follow:

$$BCF = \frac{\text{metal concentration in the organism (mg kg}^{-1}\text{fw)}}{\text{metal concentration in water (mg L}^{-1}\text{)}} \times 0.12 \text{ (dry weight/fresh weight in bivalves, (Papp, 2011))}$$

## 2.5. Immune parameters of the hemolymph

### ***Hemolymph removing and hemocyte counting***

The hemolymph was withdrawn from the posterior adductor muscle using a 25-gauge needle mounted on a 5 mL plastic syringe. The hemolymph from each oyster was transferred into an individual tube on ice. For each sample, a fraction was examined under light microscopy to check the quality of the sample and determine the concentration of cells. A volume of hemolymph was calculated in order to have 100,000 cells per sample.

### ***Phagocytic activity and reactive oxygen species***

The phagocyte capacity of hemocytes was determined by adding fluorescent beads (Fluorospheres F8823, Carboxylate, 1  $\mu\text{m}$  diameter yellow-green fluorescent, Invitrogen®) to the medium. These beads are coupled with fluorescein (FITC) which allows, after phagocytosis, their detection by flow cytometry. From a stock solution of  $3.6 \cdot 10^{10}$  beads  $\text{mL}^{-1}$ , these were added to the medium at a rate of 100 beads per cell. A stock solution was prepared using 5.6  $\mu\text{L}$  of fluorescent beads added to 194.4  $\mu\text{L}$  of Molluscan Physiological Saline (MPS) ( $4.10^{-1}\text{M}$  NaCl;  $1.10^{-1}\text{M}$   $\text{MgSO}_4$ ;  $2.10^{-2}\text{M}$  HEPES;  $1.10^{-2}\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ ;  $1.10^{-2}\text{M}$  KCl). After 40 min incubation at  $17^\circ\text{C}$ , Hoechst 33342 (H3570, Trihydrochloride, Trihydrate, Invitrogen®) was added to  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . This compound binds to the DNA of living cells and can be detected by fluorescence allowing the elimination of debris from the cytogram. After 20 min incubation time, cells were fixed with 3% formaldehyde. All samples were stored at  $4^\circ\text{C}$  until analysis by flow cytometry (Beckman® Coulter CytoFLEX, Flow Cytometry platform SF4206 ICORE). In total, 10,000 events were counted for each sample, and the phagocytosis efficiency of cells was evaluated as the percentage of hemocytes that had engulfed at least three beads (Delaporte, 2003).

The determination of reactive oxygen species (ROS) was also performed by flow cytometry on the same individual hemolymph samples. For this, 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma®, final concentration =  $10 \mu\text{M}$ ) which diffuses into the cells during the 1-hour incubation time was used. In the cytoplasm, the acetate (-DA) groups are eliminated by esterase and the DCFH is thus trapped in the cells. Intracellular DCFH, which is a non-fluorescent fluorescein analogue, is oxidized to dichlorofluorescein (DCF) by hemocytes to produce ROS. The oxidation of intracellular DCFH is quantitatively related to the oxidative metabolism of hemocytes and is mediated by hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). After 1 hour of incubation, the samples were fixed with 3% formaldehyde and stored

at 4°C until flow cytometry analysis. The production of DCFH results in green fluorescence, measurable on the FL1 detector of the flow cytometer. The results of ROS production were expressed as the percentage of cells showing fluorescence.

### ***Lysosomal membrane stability***

The lysosomal system was evaluated with the neutral red retention assay (NRRRA) according to the protocol used by Minguez et al. (2014). The hemolymph was deposited in the wells of a 24-well plate. After 30 min. of incubation at 17°C to allow the hemocytes to adhere to the well bottom, 200 µL of NR solution were added in each well. The solution was prepared with 10 µg of NR (N7005, Sigma Aldrich®) diluted in 347 µL of DMSO and filtered with a 0.22 µm syringe. Then 10 µL of filtrate were diluted with 5 mL of MPS. NR is absorbed into the cells by membrane diffusion where it is trapped in the lysosomal compartment (Lowe and Pipe, 1994). An alteration in its absorption reflects damage to the plasma membrane. Dead cells or cells with damaged membranes cannot accumulate NR and as a result, wells containing dead or damaged cells will be less stained. After 1 hour of incubation at 17°C, wells were rinsed twice with 300 µL of MPS to remove the excess NR not incorporated in the lysosomes. Two hundred microliters of lysis buffer (1:50:49 v/v/v acetic acid, absolute ethanol, Milli-Q water) were added to each well and the plate was darkened for 30 min. at room temperature to lysis the cells and release the neutral red from the lysosomes. Absorbance measurement was performed with the microplate reader at 540 nm (Flexstation 3, Molecular Device®, Sunnyvale, CA, USA, Proteogen platform SF4206 ICORE).

## **2.6. Malondialdehyde content and protein content**

Malondialdehyde (MDA) accumulation in the gills and digestive gland was used as a lipid peroxidation marker. Samples were homogenized with a Potter-Elvehjem homogenizer for 1 min at 1,400 rpm in PBS (NaCl 500 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.1 mM, pH 7.4) containing butylated hydroxytoluene (antioxidant agent). Samples were then centrifuged (10,000 x g, 10 min, 4°C) and the supernatants were aliquoted and stored at -80°C until analysed. The same sample was used for determining both proteins levels and the MDA content. The MDA assay was performed with a test kit (MDA-586 Oxis-Research®) following manufacturer's instructions. The plate was read with the microplate reader at 586 nm. Results were expressed in nmol MDA mg protein<sup>-1</sup>.

## **2.7. Energy reserves**

Glycogen reserves were used as a marker of energy reserves in oysters. After removing the mantle edge and gills, a sample of the remaining visceral mass was taken, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. After defrosting on ice, ultra-pure water was added to each tube in a proportion by volume:



weight (100  $\mu\text{L}$  for 0.01 g). Tissues were homogenized with a Potter-Elvehjem for 1 min at 1,400 rpm. The samples were then boiled for 5 min to inactivate the enzymes and then centrifuged (3,000  $\times$  g, 5 min, 4°C). The supernatant was recovered and centrifuged again (13,000  $\times$  g, 5 min, 4°C). Finally, the supernatants were aliquoted and stored at -80°C until assayed. The glycogen assay was performed with glycogen test kit (MAK016-1KT Sigma-Aldrich®) following manufacturer's instructions. The plate was read with the microplate reader at 570 nm. Results were expressed in mg glycogen. g flesh<sup>-1</sup>.

In addition, hemolymph was used to measure the Brix index which is an indicator of the nutritional status, strongly correlated to the concentrations of proteins, triglycerides, cholesterol, calcium and phosphorus in the hemolymph (Berry et al., 2019). Hemolymph of 10 oysters per condition and sampling date was individually analyzed. To this end, 100  $\mu\text{L}$  of hemolymph were centrifuged (3,000  $\times$  g, 5 min, 4°C) and supernatant was deposited on the optical reader of a digital refractometer with automatic temperature compensation (Hanna Instruments, HI96801). Results were expressed in °Brix. Ultrapure water was used as a blank between each sample.

## 2.8. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using R software version 3.4.4. The normality of the data was tested with the Shapiro-Wilk test and homoscedasticity with F-test. If the data followed a normal distribution and homoscedasticity was respected, analyses of variance (ANOVAs) followed by Tukey post-hoc tests were used to determine homogeneous groups. When the data did not follow a normal distribution, non-parametric Kruskal-Wallis (K-W) tests followed by Dunn's tests were performed. Differences were considered significant at p-value < 0.05. In addition to these analyses, a correlation matrix (Pearson test) and a principal component analysis were performed on the biomarkers and metals concentrations data. All results are presented as mean  $\pm$  SEM (Standard Error of the Mean).

## 3. Results

For C1, C2 and C3 conditions, effective concentrations of metals measured in exposure tanks during the experiment were about respectively 65, 125 and 296  $\mu\text{g L}^{-1}$  for Al and 15, 22 and 35  $\mu\text{g L}^{-1}$  for Zn (Table VIII).

| Concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )     | Control       | C1           | C2             | C3            |
|--------------------------------------------|---------------|--------------|----------------|---------------|
| <b>Nominal concentrations of aluminium</b> | 0             | 50           | 100            | 300           |
| <b>Aluminium</b>                           | 7.4 $\pm$ 1.3 | 65 $\pm$ 6.7 | 125 $\pm$ 11.2 | 296 $\pm$ 29  |
| <b>Zinc</b>                                | 9.7 $\pm$ 0.8 | 15 $\pm$ 0.5 | 22 $\pm$ 0.6   | 35 $\pm$ 22.6 |

Table VIII : Average metal concentrations in water during the exposure period for the 4 conditions. Metals levels are expressed as  $\mu\text{g L}^{-1}$  (mean values  $\pm$  SEM, n=15).

### 3.1. Oyster mortality and biometry

For the 3 months of exposure, 1 % on the 120 oysters of the control died and there was no difference between the control and the 3 concentrations (*data not shown*). Regardless of the conditions or time, oysters did not show variations in the different biometric parameters measured during the experiment (ANOVA,  $p > 0.05$ ). In the same way there was no variation for condition index which were on average of 17.61 for the AFNOR condition index and 5.79 for the Walne and Mann index.

### 3.2. Bioaccumulation

At the beginning of the experiment, the aluminum and zinc levels in the oysters are respectively  $19.7 \pm 5.7$  and  $672.5 \pm 96.4 \text{ mg kg}^{-1}$ . Figure 28 shows the bioaccumulation kinetics of Al and Zn during the 84 days of exposure for the 4 experimental conditions. After 24 hours of exposure, significant differences in aluminum levels in oysters were observed. For condition C3, it reached  $109.0 \pm 25.2 \text{ mg kg}^{-1}$  and subsequently it is necessary to wait 47 days to recover a similar content. Indeed, after 1 week of exposure, a decrease of the aluminum concentration in oysters was observed in all the experimental conditions.

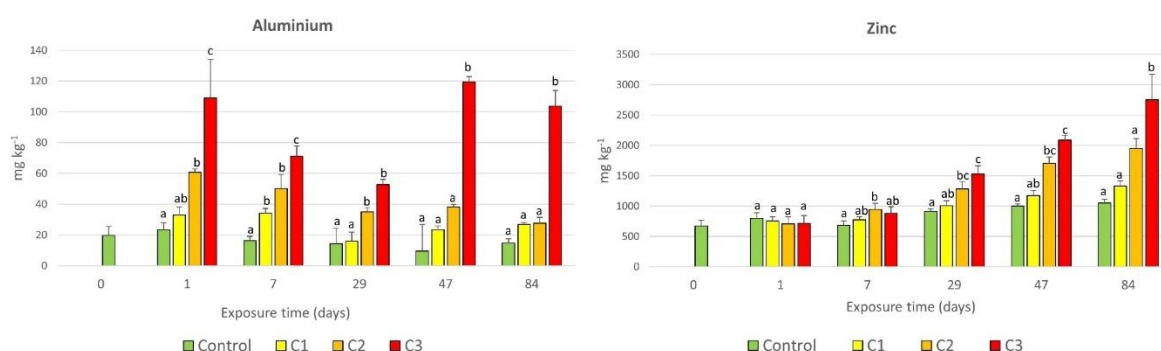


Figure 28 : Bioaccumulation kinetics of aluminium and zinc for the 84 days of exposure under the 4 experimental conditions. Metals levels are expressed as  $\text{mg kg}^{-1}$  of flesh (mean values  $\pm$  SEM,  $n=10$ ). The significance of data is presented for each date compared to the control. A letter common to two conditions indicates that there is no significant difference between them.

Table IX lists elements concentrations measured in the total tissues of oysters ( $n = 10$ ) collected for each condition after 84 days. Results for all exposure times are included in supplementary 1.

Table IX : Bioaccumulation kinetics of different elements for 0 day and after 84 days of exposure for the 4 experimental conditions. Elements levels are expressed as  $\text{mg kg}^{-1}$  of flesh (mean values  $\pm$  SEM,  $n=10$ ). These results were obtained by High Resolution ICP-MS.

| Concentration<br>( $\text{mg kg}^{-1}$ ) | Aluminium        | Zinc               | Copper         | Manganese      | Iron            | Arsenic         | Silver        | Cadmium       | Nickel         | Lead           | Potassium           | Calcium             | Magnesium          |
|------------------------------------------|------------------|--------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|---------------|---------------|----------------|----------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| Control (0 day)                          | 19.7 $\pm$ 5.7   | 672.5 $\pm$ 96.4   | 44.2 $\pm$ 5.4 | 33.5 $\pm$ 4.7 | 100.8 $\pm$ 4.8 | 18.15 $\pm$ 0.6 | 2.5 $\pm$ 0.4 | 1.5 $\pm$ 0.2 | 0.4 $\pm$ 0.03 | 0.6 $\pm$ 0.02 | 12112 $\pm$ 383.4   | 4415 $\pm$ 809.5    | 2656 $\pm$ 123.7   |
| Control (84 days)                        | 14.6 $\pm$ 6.8   | 1051.7 $\pm$ 108.3 | 53.7 $\pm$ 7.7 | 47.0 $\pm$ 9.6 | 125.5 $\pm$ 5.1 | 11.5 $\pm$ 0.9  | 3.0 $\pm$ 0.4 | 1.8 $\pm$ 0.1 | 0.5 $\pm$ 0.1  | 0.4 $\pm$ 0.04 | 12418 $\pm$ 393.8   | 8636.3 $\pm$ 1737.7 | 4397.9 $\pm$ 558.1 |
| C1 (84 days)                             | 26.8 $\pm$ 3.5   | 1327.8 $\pm$ 131.9 | 65.9 $\pm$ 8.1 | 30.2 $\pm$ 6.7 | 107.5 $\pm$ 5.7 | 11.2 $\pm$ 0.5  | 3.2 $\pm$ 0.4 | 1.7 $\pm$ 0.1 | 0.5 $\pm$ 0.04 | 0.4 $\pm$ 0.02 | 13159 $\pm$ 436.3   | 6213.7 $\pm$ 1035   | 4409.6 $\pm$ 283.5 |
| C2 (84 days)                             | 27.6 $\pm$ 3.3   | 1952 $\pm$ 81.8    | 79.9 $\pm$ 5.5 | 31.3 $\pm$ 9.4 | 91.9 $\pm$ 2.5  | 13.2 $\pm$ 1.6  | 4 $\pm$ 0.3   | 1.5 $\pm$ 0.1 | 0.3 $\pm$ 0.05 | 0.3 $\pm$ 0.02 | 11960.4 $\pm$ 332.2 | 6245.5 $\pm$ 3966.1 | 3751.1 $\pm$ 195   |
| C3 (84 days)                             | 103.7 $\pm$ 10.3 | 2753.6 $\pm$ 418.7 | 63.1 $\pm$ 9.8 | 29.7 $\pm$ 4.8 | 109.5 $\pm$ 5.1 | 13.3 $\pm$ 1.3  | 3.7 $\pm$ 0.6 | 1.6 $\pm$ 0.1 | 0.3 $\pm$ 0.12 | 0.4 $\pm$ 0.02 | 11660.3 $\pm$ 314.2 | 9481.5 $\pm$ 2820   | 3777.4 $\pm$ 216   |

For Al, the contents in oysters were respectively  $14.6 \pm 6.8$ ,  $26.8 \pm 3.5$ ,  $27.6 \pm 3.3$  and  $103.7 \pm 10.3 \text{ mg kg}^{-1}$  for the control, C1, C2 and C3. The bioaccumulation kinetics of Zn was different from that of Al. After 29 days, significant differences in the flesh concentrations were observed between the C3 condition and the control, with Zn content of respectively  $1,532 \pm 131.9 \text{ mg kg}^{-1}$  and  $908 \pm 46.3 \text{ mg kg}^{-1}$ . The concentration differences between all the conditions gradually increased after 84 days. Then, Zn levels in oysters were respectively  $1,052 \pm 108$ ,  $1,328 \pm 132$ ,  $1,952 \pm 82$  and  $2,754 \pm 419 \text{ mg kg}^{-1}$  for the control, C1, C2 and C3. For both metals, the concentration in oyster tissue was significantly higher for condition C3. The other toxicologically important elements analyzed such as copper, lead or cadmium did not show significant variations in oysters and a similar result was obtained for potassium, magnesium and calcium (ANOVAs,  $p > 0.05$ ). Figure 29 presents kinetics of bioconcentration factors of Al and Zn during the 3 months of exposure for the 4 experimental conditions. For the two metals, highest BCF values were linked to lowest and naturally exposure concentrations. For the three concentrations of exposures (C1, C2 and C3), Al presents close and lowest BCF values, whereas Zn BCF values increased in relation to the decrease of exposure concentrations.

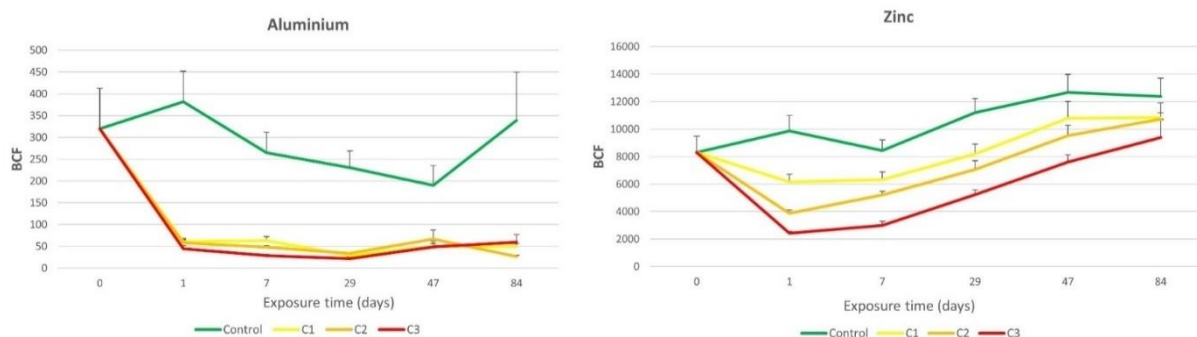


Figure 29 : Bioconcentration factors of aluminium and zinc for the 84 days of exposure under the 4 experimental conditions (mean values  $\pm$  SEM,  $n=10$ ).

### 3.3. Gametogenesis stages

Histological analysis (n=13 per condition) did not reveal any significant differences in the progress of gametogenesis between the 4 exposure conditions (Kruskal-Wallis,  $p > 0.05$ ). After 84 days, MGI were, respectively, for the control, C1, C2 and C3 of  $3.35 \pm 0.15$ ,  $3.04 \pm 0.24$ ,  $3.27 \pm 0.22$  and  $3.35 \pm 0.16$  (*data not shown*).

### 3.4. Immune parameters

Figure 30 shows four immune parameters of oyster hemocytes after 84 days. For all parameters (i.e. hemocyte count, phagocytic activity, ROS production and lysosomal system), we did not record any significant differences between individuals exposed to the four conditions (Kruskal-Wallis,  $p > 0.05$ ). However, some decreasing trends could be observed, particularly for phagocytic efficiency with a 40% decrease for the C3 condition compared to the control. By contrast, there was an increase of 50% in the lysosomal system for condition C2 and 25% for condition C3. The individual variability induced large deviations which probably explains the absence of significance.

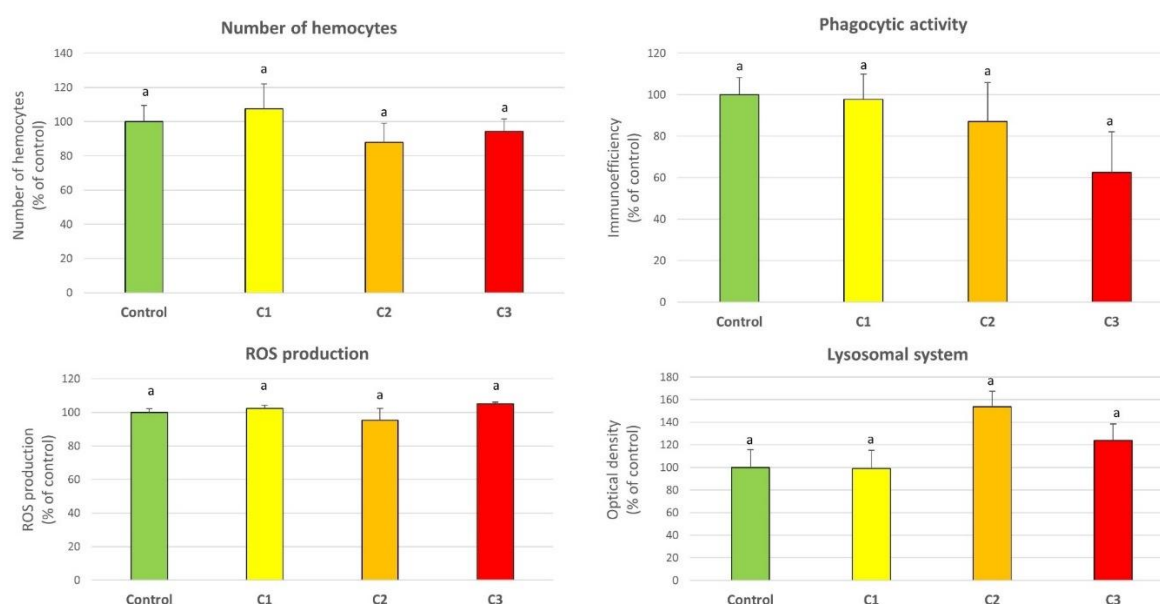


Figure 30 : Immune parameters of oyster hemocytes after 84 days of exposure to metals released from the dissolution of an aluminum galvanic anode at different concentrations. Parameters studied are the number of hemocytes  $\text{mL}^{-1}$ , phagocytic activity, ROS production and lysosomal system in oyster hemocytes. Results were given compared to the 100% control (mean values  $\pm$  SEM, n=13). A letter common to two conditions indicates that there is no significant difference between them.

### 3.5. Proteins and MDA levels

Protein concentrations in the digestive gland ranged from 34.55 to 54.73  $\text{mg mL}^{-1}$  and in the gills from 15.34 to 27.24  $\text{mg mL}^{-1}$ . There were no significant differences between the different exposure conditions throughout the exposure (*data not shown*). After 84 days, MDA levels in the digestive gland

of oysters showed variations with a significant decrease only for oysters exposed to C3 (Figure 31). The values averaged  $3.61 \pm 0.79$ ,  $1.92 \pm 0.24$ ,  $1.62 \pm 0.18$ ,  $1.15 \pm 0.38$  nmol MDA mg. protein<sup>-1</sup> for, respectively, the control, C1, C2 and C3. In contrast, MDA levels in the gills revealed stable even after 84 days; values ranged from 2.38 to 3.13 nmol MDA mg. protein<sup>-1</sup>.

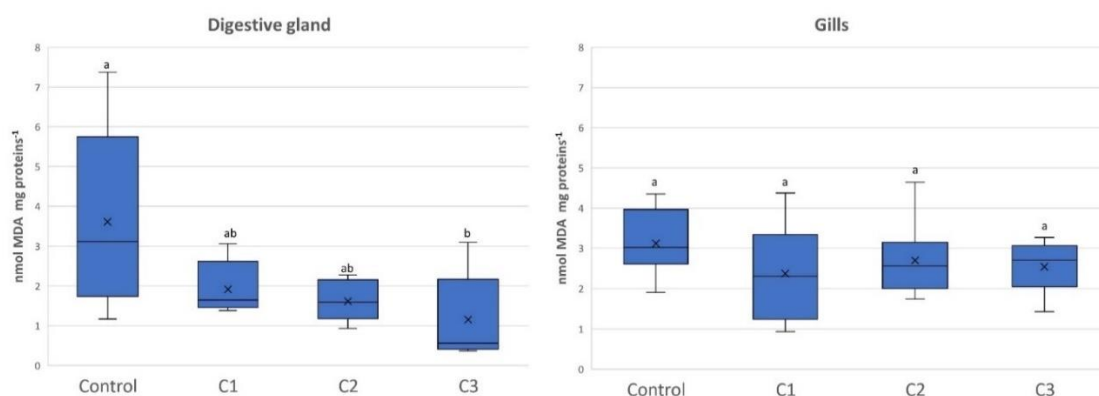


Figure 31 : MDA (malondialdehyde) levels in the digestive gland and gills after 84 days of exposure to metals released from the dissolution of an aluminum galvanic anode at different concentrations. MDA levels are expressed as nmol MDA mg proteins<sup>-1</sup> (mean values  $\pm$  SEM, n=8). A letter common to two conditions indicates that there is no significant difference between them.

### 3.6. Glycogen and Brix index

The brix index measured in the bivalve hemolymph did not show any variation either as a function of time or exposure conditions (Kruskal-Wallis,  $p > 0.05$ ). Values ranged from 4.20 to 5.05 °brix (*data not shown*). Figure 32 shows the kinetics of oyster glycogen content during the 3 months of exposure. At the beginning of the experiment, the average glycogen content was of  $117.1 \pm 5.75$  mg. g<sup>-1</sup> of flesh.

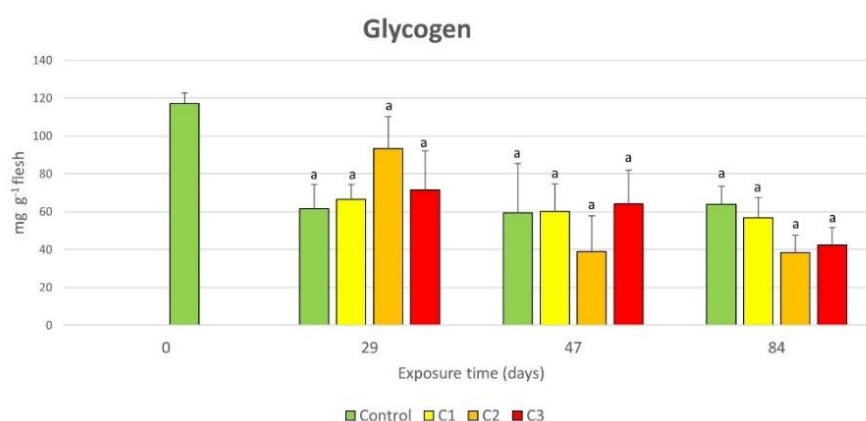


Figure 32 : Glycogen content for 84 days of exposure to metals released from the dissolution of an aluminum galvanic anode for the four conditions. Glycogen levels are expressed as mg g<sup>-1</sup> of flesh (mean values  $\pm$  SEM, n=8). A letter common to two conditions indicates that there is no significant difference between them.

Whether after 29 days, 47 days or 84 days of exposure we did not measure any significant differences between the oysters exposed to the 4 conditions. Overall, the glycogen content decreased

during the experiment to reach values around the order of 38.4 to 64 mg. g<sup>-1</sup> of flesh. At 84 days, a trend could be noted because glycogen content was slightly lower for the 2 highest concentrations.

### 3.7. Principal components analysis and correlation matrix

A correlation matrix (supplementary data 2) performed with the Pearson test between bioaccumulated aluminum and zinc in relation to the biomarkers after 84 days reveals that Al in oysters is negatively correlated with MDA levels in the digestive gland. Such a result can also be illustrated when looking at the principal component analysis (Figure 33) where Al and Zn concentrations present inverse relationship to both MDA and glycogen levels along F1 (Figure 33A). All immune parameters go in the same direction along F2. Furthermore, several groups emerged corresponding to the 4 conditions on the F1F2 plane (explained variance: F1: 23.08% and F2: 19.39%) (Figure 33B).

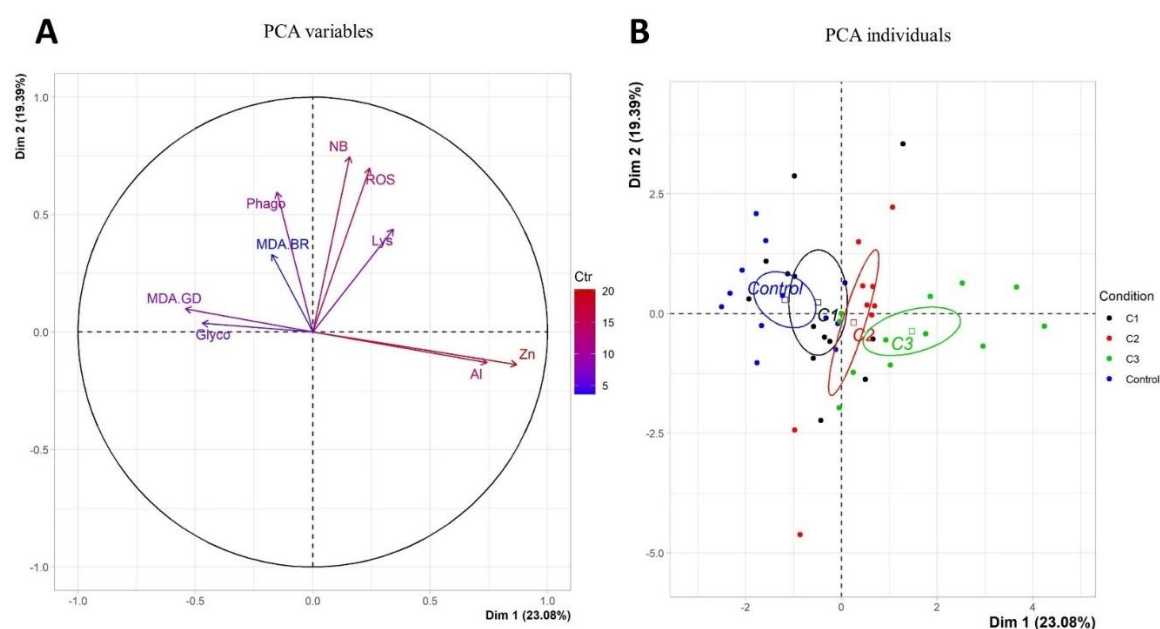


Figure 33 : The principal components analysis (PCA) of the different variables (A) and individuals (B) of the study after 84 days of exposure. Al = aluminium bioaccumulated. Zn = zinc bioaccumulated. MDA GD = MDA levels in the digestive gland. MDA Br = MDA levels in the gills. NB = number of hemocytes. Lys = lysosomal system. Phago = phagocytosis efficiency, ROS = ROS production; Glyco = Glycogene content. BRIX = Brix index.

## 4. Discussion

Over the last several decades, the evaluation of biological effects of anthropogenic contaminants has become a crucial importance to maintain a good ecological status of coastal environment as recommended by European directives such as the Marine Strategy Framework Directive (MSFD) (2008/56/EC). To our knowledge, the present study is one of the first to focus on the chronic impact of aluminum galvanic anodes on a marine organism. We conducted an experimental integrative approach, designed to complement the previously published results on the effects of galvanic anodes (Caplat et al., 2020, 2012, 2010; Deborde et al., 2015; Mao et al., 2011; Mottin et al., 2012).

The concentrations of contaminants tested during the experiment did not induce significant mortalities of oysters and sublethal effects had thus been to be researched. The results of bioaccumulation analyses confirmed that oysters have bioaccumulated the various constituents of the galvanic anode. At the beginning of the experiment, metals concentrations in oysters were close to the natural levels given for coastal seawaters in Normandy (RIN program, *personal data*). BCF measures the ability of an organism to bioconcentrate an element in its tissue considering the concentration of that element in the water. The BCF values measured for Al and Zn in oysters depended on the concentration of these two elements in the chronic exposure medium. At the concentration measured under C3 condition, reverse relationships were observed between metallic BCF values and total concentrations in water. In their review about metals, McGeer et al. (2003) have already reported similar relationships, that they linked to the ability of organisms to regulate uptake of chronically Zn elevated concentrations. In any case, BCFs for Al are low (around 50) indicating that *C. gigas* is not a hyper accumulator of aluminium in contrast to Zn for which BCFs are particularly high (around 10,000). Furthermore, it is observed that the BCFs of Zn decrease when the concentration in water increases. Indeed, the bioaccumulation of metals results from different mechanisms compared to organic substances. Metals in the environments are mostly in hydrophilic and hydrated forms that are not able to cross biological membranes by simple diffusion. Their uptake thus requires facilitated transport involving protein transporters or transmembrane channels which can reach saturation at high metal concentrations (Pelletier and Campbell, 2008).

The filter feeding of bivalves contributes to the high bioavailability of aquatic contaminants. For an Al concentration of  $296 \mu\text{g L}^{-1}$  (C3 condition) after 24 hours of exposure, the Al content in oysters reaches  $109 \text{ mg kg}^{-1}$ . The detoxification process of Al starts after 7 days of exposure when the concentration drops to  $71 \text{ mg kg}^{-1}$ , and it is necessary to wait 47 days to measure again a concentration above  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ . Concerning C2 condition, such an increase in Al content is not observed after 47 days of exposure, the oyster physiological processes being sufficiently efficient to detoxify at this Al concentration. One of the few marine studies on Al released from a galvanic anode concerns the bioaccumulation of Al in the mussel *Mytilus edulis* (Mao et al., 2011). Mussels were exposed to  $530 \mu\text{g L}^{-1}$  Al for 8 weeks which is higher than the C3 concentration in our study (i.e.  $296 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Mao et al. (2011) showed that the Al concentration reached its maximum after 13 days of exposure in the digestive gland ( $1,700 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and after 8 days of exposure in total tissues ( $308 \text{ mg kg}^{-1}$ ). In our study we did not focus on any specific organ but aluminum levels in tissues are about the same order of importance between the two species ( $71 \text{ mg kg}^{-1}$  after 7 days for oyster *versus*  $308 \text{ mg kg}^{-1}$  after 8 days for mussels).

The zinc profile is totally different because the enrichment in oysters' tissues was gradual over the three months of exposure and no equilibrium level has been reached at the end of the experimentation. At 0 day, the Zn concentration is 672 mg kg<sup>-1</sup> and it takes 29 days to observe significant differences between conditions. After 84 days, the Zn content in oysters reaches 2,753 mg kg<sup>-1</sup> for C3 condition. This value is comparable to those found in the natural environment for polluted sites on the southern Spanish coast, such as Punta Umbria and Mazagon, where the Zn content in *Crassostrea angulata* oysters were, respectively, 2,240 and 3,016 mg kg<sup>-1</sup> (Funes et al., 2006). Finally, in the present study, metallic results do not indicate significant enrichment of all other quantified elements (Cu, Cd, Pb...) in oysters chronically exposed to products of the dissolution of the aluminum-based galvanic anode suggesting that Al and Zn are alone to be of concern.

In natural environments, contaminants adsorb more onto suspended organic matter, but low amount of dissolved or suspended organic matter occur in controlled conditions, which increases the bioavailability of contaminants to organisms. Therefore, the experimental BCF can be higher than that measured *in situ*. For filter-feeding bivalves such as *C. gigas*, a metal can become available by two major ways: dissolved uptake, which is mainly through the gills and probably requires no energy investment; and the ingestion of particulates associated with food particles which becomes available to bivalves. It has been already shown that aluminium dissolved in water can be incorporated into the frustules of diatoms as a detoxification mechanism (Dixit et al., 2001; Gehlen et al., 2002). Aluminium can therefore be ingested by oysters through the trophic pathway. Our results show that the oyster is not a good bioaccumulator of Al, whereas Zn is more bioaccumulated in tissues. In the future, it would be interesting to distinguish the two uptake mechanisms by performing an experiment in which oysters would be placed in non-contaminated water but fed with microalgae previously cultivated in water contaminated with aluminium.

Although Al has no biological function, it can substitute for essential metals in some biochemical processes (Exley and House, 2011). By contrast, zinc is an essential trace element for the functioning of many cellular processes, but in excess it is toxic and generates ROS that damage the organism (Calabrese et al., 1973; Mottin et al., 2012). At the same concentration, Al is known to be less toxic than Zn in marine organisms. To our knowledge, no studies have investigated the biological effects of aluminum-based galvanic anode on bivalves. Bell et al (2020) investigated the effect of galvanic anodes during acute exposure on an amphipod species, *Corophium volutator*, a diatom species, *Phaeodactylum tricornutum*, and a bacterial species, *Aliivibrio fischeri* (Bell et al., 2020). They found no acute toxicity for the bacteria tested and only slight effects on algal growth. Regarding amphipods, significant increases in mortality were observed at the highest concentration of 100 mg L<sup>-1</sup>. Sublethal effects would have probably occurred at lower concentrations but all tested concentrations were very



far from the environmental maximums. It is interesting to note that in the study by Caplat et al. (2010), it is shown that the dissolution of Al and Zn from a galvanic anode was less toxic for the urchin *Paracentrotus lividus* than sulphate salts. The dissolution of the anode could result in hydroxide precipitation due to a local increase in pH or associations of metallorganic complexes that could reduce the levels of free ionic Al (III) and Zn (II) species and therefore their availability. As a consequence, this could result in a lower toxicity of the degradation products of galvanic anodes compared to Al and Zn in the form of sulphate salts for which there is a higher proportion of free metal forms due to the sulphate anion association. Using aluminum salts is consequently not the right solution for ecotoxicological studies of galvanic anodes. Considering Al in all its forms in literature, various LC<sub>50</sub> (lethal concentration) values have been reported: 3,000 µg L<sup>-1</sup> in the coral *Acropora tenuis* (Negri et al., 2011); 10,000 µg L<sup>-1</sup> in the copepod *Nitocra spinipes* (Bengtsson, 1978), while no effect is observed in annelids *Ctenodrilus serratus* and *Neanthes arenaceodentata* at 2,000 µg L<sup>-1</sup> (Petrich and Reish, 1979), and at 28,000 µg L<sup>-1</sup> in the sea urchin *Heliocidaris turberculata* (Golding et al., 2015). Nevertheless, at these elevated total concentrations of Al, it can be assumed that the element was principally under a non-bioavailable particulate form (Al(OH)<sub>3</sub>) since the Al solubility limit is 500 µg L<sup>-1</sup> (Angel et al., 2016) (Golding et al., 2015).

The quantification of ROS and the number of circulating hemocytes remained stable throughout the experiment. However, after 84 days, phagocytic efficiency and the NRRA tended to, respectively, decrease and increase. Regarding NRRA, a change in optical density can be interpreted as a change in the stability of lysosomal membranes or a change in the number or size of lysosomes. The decrease of almost 40% in phagocytic efficiency associated with a modulation of the lysosomal system may be indicative of a weakened immune system. A study on the effect zinc-based galvanic anode in *C. gigas* have reported a stimulation of the immune system during a 10 weeks chronic exposure (0.53 ± 0.04 mg L<sup>-1</sup>) while immune parameters were inhibited during the one week acute exposure (10.2 ± 1.2 mg L<sup>-1</sup>) (Mottin et al., 2012). In the present study, the absence of significant effects on the immune system can be explained by the low doses of contaminant in the water and probably the adaptation of the molluscs to chronically exposure concentrations until elevated value. Indeed, Mottin et al (2012) investigated concentrations in Zn approximatively 30 times higher than in our C3 condition.

In bivalves, energy reserves and the reproductive cycle are described as being closely linked (Heude-Berthelin, 2000). Glycogen represents an important part of energy reserves; it is particularly used as an energy source for gametogenesis. The measurement of glycogen levels in oysters gives us information about the metabolic state of individuals. The overall decrease in glycogen levels after 29 days can be explained by active gametogenesis, with a majority of oysters being in stages 2 (active gametogenesis) and 3a (beginning of sexual maturity). There was a slight trend of decrease for

conditions C2 and C3 after 84 days but this result was not related to the MGI. It is possible that oysters spend more energy to detoxify. Actually, the observation of histological sections showed no differences in the progress of gametogenesis between the 4 conditions. Concerning the BRIX index measured on hemolymph, it indicated no significant variation according to time or condition. To our knowledge, our study is the first one to use this type of index on bivalves during exposure to contaminants.

Reactive oxygen species (ROS) have the capacity to damage tissues and cellular components of organisms, which is known as oxidative stress. It is well established that marine organisms and particularly bivalves show a large panel of antioxidant defenses to protect themselves from exposure to contaminants with oxidative potential (Pipe and Coles, 1995). The role of these antioxidant systems and their sensitivity may be of great importance in ecotoxicological studies. MDA accumulation is one of the manifestations of oxidative stress, an indicator of lipid peroxidation corresponding to the oxidation of polyunsaturated fatty acids by ROS or enzymes. In our study, individuals exposed to C3 concentration showed significantly lower levels of MDA in the digestive gland after 84 days, while no variation in MDA levels in the gills was observed. The MDA values recorded are in agreement with those found in other studies in which *C. gigas* was exposed to pesticides (Mottier et al., 2015; Séguin et al., 2016). Various laboratory studies showed an increase in MDA levels in several bivalve species following metal exposures (Khebbeb et al., 2010; Moore et al., 2020). However, it has also been shown that a 21-day exposure to cadmium, silver, and mercury induced a decrease in MDA levels in the gills of *C. gigas* (Géret, 2002). A clear decrease of MDA in *P. perna* gills was recorded during the cycle of contamination by *Staphylococcus aureus* (Bendjoudi et al., 2013). It has also been shown a significant positive correlation between zinc and copper levels in *C. angulata* oysters and biomarkers involved in defense against oxidative stress such as catalase (CAT), superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferases as well as metallothioneins (Funes et al., 2006). In chronic exposures to contaminants released from the estuaries of Huelva and Guadalquivir, low levels of MDA were associated with high activity of metallothioneins in the clams *Chamaelea gallina* (Rodríguez-Ortega et al., 2002). Therefore, the decrease in MDA levels in the digestive gland may be explained by antioxidant defense provided by sensitive enzymes of which activity increases in target organs depending on contaminant concentration (Damiens et al., 2006). CATs, a family of key enzymes in the regulation of oxidative stress, as well as metallothioneins, proteins particularly important in metal sequestration and detoxification, are examples of defense mechanisms against oxidative stress that were able to overtake lipid peroxidation. We did not have measure these enzymatic activities but in further studies, it would be interesting to evaluate these biomarkers in the digestive gland of oysters exposed to the C3 concentration for which MDA levels are the lowest. In addition, the absence of variation in ROS

production measured in hemocytes by flow cytometry suggests that the digestive gland is impacted before the circulating system.

The principal component analysis confirms this antagonist relationship between MDA levels in the digestive gland with aluminum and zinc concentrations in water. The emergence of 4 distinct clusters on the PCA along dimension 1 corresponds to the 4 concentrations tested in our experiment. These results demonstrate a sensitivity of oysters even if only the highest concentration induced pronounced biological effects.

## 5. Conclusion

On the basis of the concentrations tested and experimental conditions, the assessment of the chronic toxicity of the degradation products of an aluminum-based galvanic anode on the Pacific oyster *C. gigas*, does not seem to indicate a direct environmental risk given the absence of significant mortality. Nevertheless, results demonstrate a sensitivity of oysters even if only the highest concentration induced pronounced biological effects. It is important to relate these results to the context of climate change, with the ocean acidification that has been shown to amplify metal bioaccumulation and may exacerbate their toxicity in *C. gigas* (Cao et al., 2018). As a non-essential element, Al shows low bioconcentration factors but galvanic anodes may facilitate the entry of Al into the food chain and its biomagnification in higher trophic level organisms considering that invertebrates are food sources of many species. It is known that Al in freshwater can be transferred from a primary to a secondary consumer at a pH of 7.1 (Walton et al., 2010). Zinc is also important to monitor because it represents 5% of an aluminum-based galvanic anode. Furthermore, in view of the bioaccumulation results, the Zn level equilibrium has not been achieved in oysters even after 84 days and it would be interesting to extend the exposure period. The sustainability of marine organisms sensitive to contaminants is essential in terms of ecosystem services as well as to limit the health risks associated with the consumption of organisms grown near areas rich in galvanic anodes. As the biological effects of aluminum-based galvanic anode are poorly studied in the literature, further investigations on larval stages and other taxonomic groups remain necessary.

## Acknowledgements

The authors thank Marilyne Guillamin for technical assistance with cytometry analyses, Nadège Villain-Naud for technical assistance with histological sections, Benoit Bernay from Proteogen platform, Victor Simon for his help during dissections as well as the company Thalassa for the oysters. We also thank the Normandy region and the Seine Normandy water agency (AESN) for their funding.

## **Supplementary data**

Supplementary data 1 : Bioaccumulation kinetics and bioconcentration factors (BCF) of aluminium and zinc for 3 months of exposure under the 4 experimental conditions. Bioaccumulation metals levels are expressed as mg kg<sup>-1</sup> of flesh (mean values ± SEM, n=10). These results were obtained by High Resolution ICP-MS.

|                                                    | Exposure condition | Exposure time (days) |               |             |                |                |                |
|----------------------------------------------------|--------------------|----------------------|---------------|-------------|----------------|----------------|----------------|
|                                                    |                    | 0                    | 1             | 7           | 29             | 47             | 84             |
| Aluminium in oysters' flesh (mg kg <sup>-1</sup> ) | Control            |                      | 24 ± 4        | 16 ± 3      | 14 ± 10        | 9 ± 17         | 15 ± 7         |
|                                                    | C1                 | 20 ± 6               | 33 ± 5        | 34 ± 3      | 16 ± 6         | 23 ± 2         | 27 ± 3         |
|                                                    | C2                 |                      | 61 ± 2        | 50 ± 9      | 35 ± 3         | 38 ± 2         | 28 ± 3         |
|                                                    | C3                 |                      | 109 ± 25      | 71 ± 7      | 53 ± 3         | 119 ± 3        | 104 ± 10       |
| BCF Aluminium                                      | Control            |                      | 382 ± 70      | 265 ± 47    | 231 ± 39       | 190 ± 46       | 339 ± 110      |
|                                                    | C1                 | 320 ± 92             | 61 ± 5        | 63 ± 9      | 29 ± 2         | 50 ± 6         | 49 ± 6         |
|                                                    | C2                 |                      | 58 ± 10       | 48 ± 3      | 33 ± 2         | 66 ± 21        | 26 ± 3         |
|                                                    | C3                 |                      | 44 ± 7        | 29 ± 2      | 21 ± 4         | 49 ± 13        | 60 ± 18        |
| Zinc in oysters' flesh (mg kg <sup>-1</sup> )      | Control            |                      | 800 ± 90      | 684 ± 68    | 908 ± 46       | 1 000 ± 37     | 1 052 ± 109    |
|                                                    | C1                 | 672 ± 96             | 756 ± 71      | 774 ± 52    | 1 005 ± 83     | 1 175 ± 82     | 1 328 ± 132    |
|                                                    | C2                 |                      | 705 ± 117     | 947 ± 101   | 1 286 ± 122    | 1 701 ± 106    | 1 952 ± 82     |
|                                                    | C3                 |                      | 713 ± 133     | 880 ± 108   | 1 532 ± 132    | 2 088 ± 82     | 2 754 ± 419    |
| BCF Zinc                                           | Control            |                      | 9 875 ± 1 114 | 8 444 ± 768 | 11 203 ± 1 017 | 12 671 ± 1 318 | 12 387 ± 1 336 |
|                                                    | C1                 | 8 296 ± 1 189        | 6 163 ± 553   | 6 309 ± 578 | 8 194 ± 714    | 10 792 ± 1 227 | 10 830 ± 1 076 |
|                                                    | C2                 |                      | 3 876 ± 255   | 5 204 ± 285 | 7 064 ± 641    | 9 538 ± 741    | 10 726 ± 449   |
|                                                    | C3                 |                      | 2 432 ± 127   | 3 003 ± 284 | 5 228 ± 345    | 7 060 ± 514    | 9 395 ± 1 309  |

Supplementary data 2 : Correlation matrix performed with Pearson tests between different biomarkers studied after 3 months of exposure. Bioaccumulated aluminum and zinc are compared to the different biomarkers measured in the study. A colored box means that two variables are significantly correlated,  $p < 0.1$  is indicated by blue,  $p < 0.05$  is indicated by orange and  $p < 0.01$  is indicated by red. Al = aluminium bioaccumulated. Zn = zinc bioaccumulated. MDA GD = MDA levels in the digestive gland. MDA Br = MDA levels in the gills. NB = number of hemocytes. Lys = lysosomal system. Phago = phagocytosis efficiency, ROS = ROS production; Glyco = Glycogene content. BRIX = Brix index; MGI = Mean gonad index, AFNOR = Condition index.

|        | AFNOR |       |       |       |       |        |        |       |      |       |      |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|------|-------|------|
| Al     | -0.35 | Al    |       |       |       |        |        |       |      |       |      |
| BRIX   | -0.24 | -0.21 | BRIX  |       |       |        |        |       |      |       |      |
| Glyco  | -0.25 | -0.21 | -0.24 | Glyco |       |        |        |       |      |       |      |
| Lys    | 0.07  | 0.12  | -0.08 | 0.07  | Lys   |        |        |       |      |       |      |
| MDA.BR | -0.58 | 0.14  | 0.44  | 0.02  | -0.33 | MDA.BR |        |       |      |       |      |
| MDA.GD | 0.39  | -0.59 | 0.14  | 0.18  | 0.13  | -0.46  | MDA.GD |       |      |       |      |
| MGI    | -0.07 | 0.21  | -0.16 | -0.16 | -0.33 | 0.19   | -0.25  | MGI   |      |       |      |
| NB     | -0.18 | 0.14  | 0.09  | -0.01 | 0.15  | 0.25   | -0.54  | -0.28 | NB   |       |      |
| Phago  | 0.04  | -0.40 | 0.21  | 0.12  | -0.30 | 0.22   | -0.09  | -0.37 | 0.31 | Phago |      |
| ROS    | 0.17  | 0.42  | -0.26 | -0.47 | 0.08  | 0.12   | -0.44  | 0.37  | 0.19 | -0.32 | ROS  |
| Zn     | -0.37 | 0.58  | -0.15 | -0.38 | 0.36  | 0.00   | -0.46  | 0.09  | 0.25 | -0.35 | 0.35 |

Supplementary data 3 : Table gathering biometric data including length (mm), width (mm), thickness (mm) and weight (g) after 84 days of exposure for the four exposure conditions. Data are expressed as mean values  $\pm$  SEM (n=23).

| Condition | Length (mm)      | Width (mm)       | Thickness (mm)   | Weight (g)       |
|-----------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Control   | 65.04 $\pm$ 2.76 | 41.22 $\pm$ 1.71 | 19.81 $\pm$ 1.02 | 22.99 $\pm$ 0.39 |
| C1        | 69.41 $\pm$ 2.76 | 43.62 $\pm$ 2.07 | 20.78 $\pm$ 0.69 | 26.01 $\pm$ 0.40 |
| C2        | 64.88 $\pm$ 2.42 | 40.52 $\pm$ 1.52 | 20.92 $\pm$ 0.70 | 25.99 $\pm$ 0.33 |
| C3        | 64.56 $\pm$ 2.08 | 40.55 $\pm$ 1.34 | 20.01 $\pm$ 0.58 | 22.66 $\pm$ 0.28 |

## Résultats majeurs

- Les huîtres ont été exposées pendant trois mois à trois concentrations d'aluminium obtenues à l'aide d'un dispositif expérimental électrochimique qui simule la dissolution d'une anode galvanique dans le milieu marin.
- Les huîtres ont bioaccumulé plus de zinc que d'aluminium, même si ce dernier était présent en plus grande concentration.
- De plus, la durée d'exposition n'a pas influencé la bioaccumulation de l'aluminium contrairement à celle du zinc.
- Une batterie de biomarqueurs a été étudiée et certains effets biologiques ont été observés (concentration de MDA dans la glande digestive), notamment à la plus forte concentration ( $296 \pm 29 \mu\text{g L}^{-1}$  d'aluminium).



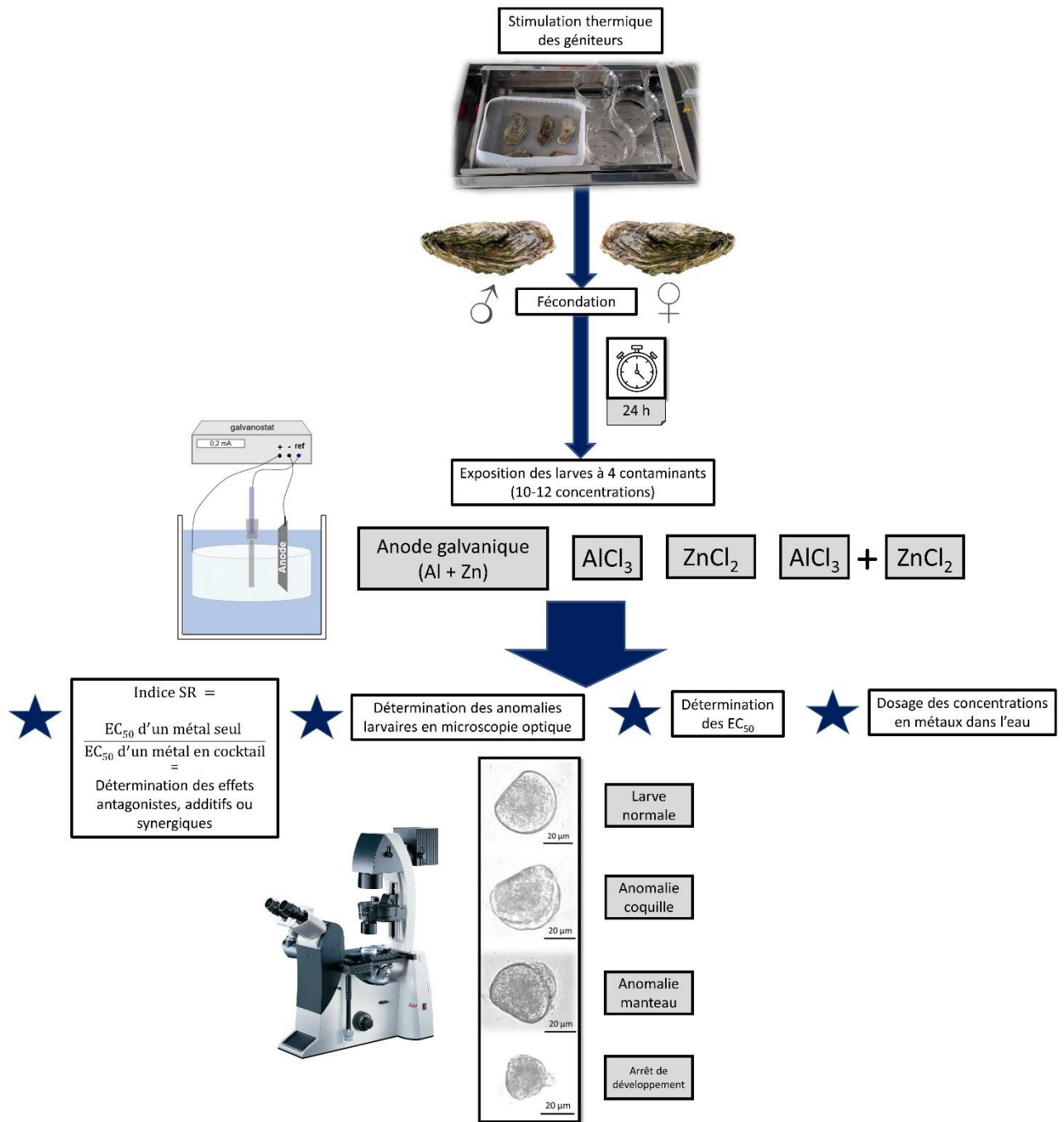
## Article 2: Comparative effects of trace metal elements released from dissolution of aluminum-based galvanic anodes, aluminum chloride, zinc chloride and their mixture on the development of the Pacific oyster D-larvae, *Crassostrea gigas*

Cet article a fait l'objet d'une soumission dans le journal Environmental Science and Pollution Research

### Résumé de la publication

Afin d'explorer l'impact des anodes galvanique à base d'aluminium sur d'autres phases du cycle de vie de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, une expérimentation d'embryotoxicité a été mise en place. Nous avons comparé l'effet du cocktail de métaux libéré par une anode galvanique à base d'aluminium, avec l'effet du chlorure d'aluminium hexahydraté et l'effet du chlorure de zinc seuls, ainsi que l'effet du mélange des deux métaux sous leur forme chlorée. L'objectif de l'étude était de déterminer des  $CE_{50}$  ainsi que d'évaluer s'il existe une variation de toxicité entre les différents contaminants comme précédemment constaté par Caplat et al. (2010) chez l'oursin. Nous avons calculé une  $CE_{50}$  de  $193 \mu\text{g L}^{-1}$  et  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  pour le chlorure d'aluminium et le chlorure de zinc, respectivement. Nos résultats sont en accords avec la littérature indiquant que l'aluminium augmente l'incidence de développement anormal chez les larves de bivalves à partir de  $150 \mu\text{g L}^{-1}$  ce qui est une concentration proche des maximums environnementaux enregistrés dans les eaux côtières polluées. En se basant sur la concentration d'aluminium, nous avons mis en évidence une  $CE_{50}$  de  $190 \mu\text{g L}^{-1}$  pour l'anode galvanique. Le calcul des ratios SR pour l'anode galvanique a révélé une action additive dans le cas de l'aluminium ( $SR=1,02$ ) et un léger effet antagoniste dans le cas du zinc ( $SR=0,69$ ). En ce qui concerne l'exposition au cocktail d'Al et de Zn sous leur forme chloré, les résultats ont révélé un modèle synergique avec l'aluminium ( $SR=2,11$ ) et un effet additif avec le zinc ( $SR=1,05$ ). Ces résultats semblent indiquer que le chlorure de zinc a augmenté la toxicité du chlorure d'aluminium chez les larves d'huîtres, ce qui n'était pas le cas pour le cocktail de métaux de l'anode galvanique. Cette étude souligne l'importance de ne pas extrapoler les résultats des essais réalisés avec du chlorure ou du sulfate d'aluminium pour caractériser les effets biologiques des anodes galvaniques.

## Récapitulatif du protocole expérimental



# **Comparative effects of trace metal elements released from dissolution of aluminum-based galvanic anodes, aluminum chloride, zinc chloride and their mixture on the development of the Pacific oyster D-larvae, *Crassostrea gigas***

Alexandre Levallois<sup>1a</sup>, Katherine Costil<sup>1</sup>, Christelle Caplat<sup>1</sup>, Olivier Basuyaux<sup>2</sup>, Jean-Marc Lebel<sup>1</sup>, Claire Guegan<sup>1</sup>, Antoine Serpentine<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA) Université de Caen Normandie UNICAEN, Sorbonne Université, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UA, CNRS 8067, IRD, Esplanade de la paix, F-14032 Caen.*

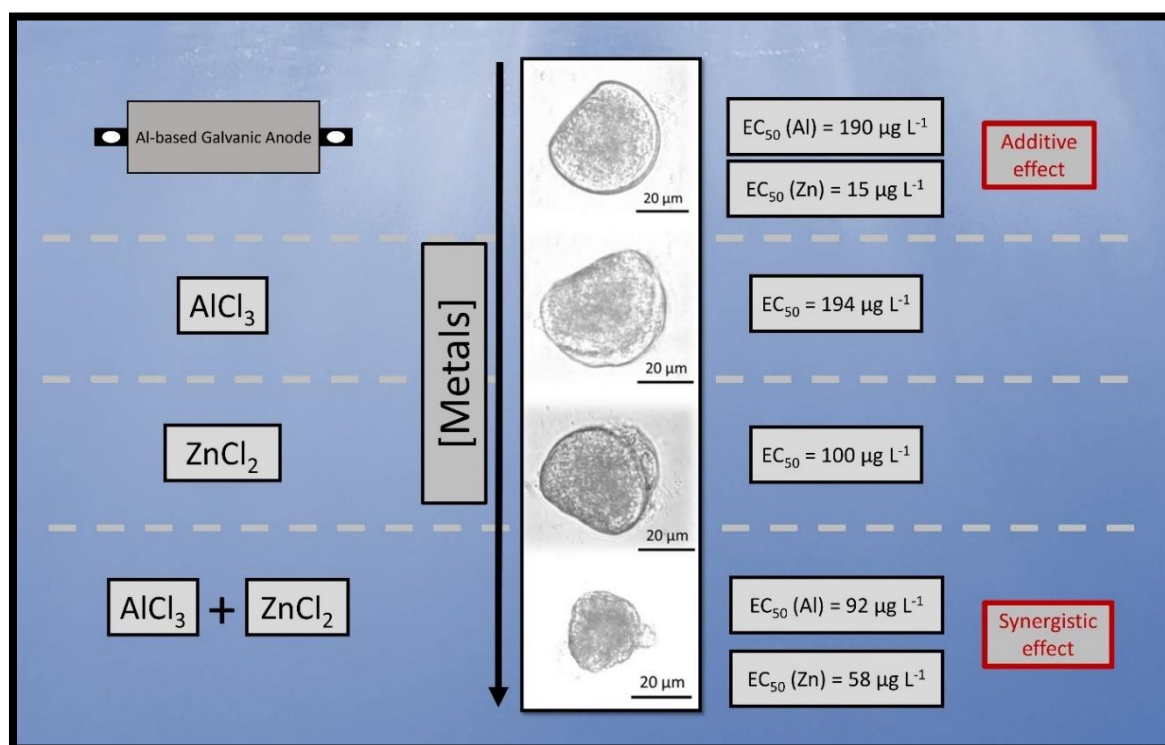
<sup>2</sup> *Synergie Mer et littoral (SMEL), Zac de Blainville, F-50560 Blainville-sur-Mer.*

## **Abstract:**

As the most abundant metal in the earth's crust, aluminium (Al) is used in many sectors, and nowadays there is an increase in anthropogenic releases to aquatic ecosystems. This is particularly true in the context of corrosion protection systems involving galvanic anodes, which are mostly made of Al. Corroded instead of the steel structures they protect, galvanic anodes are described as sacrificial anodes. In contact with sea water, they undergo oxidation and release various metals in the form of ions or oxy-hydroxides into the marine environment, mainly Al and zinc (Zn). Several studies agree that Al increases the incidence of abnormal development in bivalve larvae from 150 µg L<sup>-1</sup> which is close to the highest Al concentrations recorded in coastal waters. Therefore, we studied the impact of the cocktail of metals released by aluminum-based galvanic anodes on the development of *Crassostrea gigas* larvae, which we compared to the effects of aluminum chloride hexahydrate and zinc chloride alone and their mixture. The anode solution was realised thanks to an experimental device simulating the dissolution of a galvanic anode in the marine environment in order to reproduce the cocktail of metal species. We calculated an EC<sub>50</sub> of 193.55 µg L<sup>-1</sup> and 100.05 µg L<sup>-1</sup> for Al and Zn chloride alone respectively, and we highlighted an EC<sub>50</sub> of 190.22 µg L<sup>-1</sup> for the galvanic anode based on Al concentration. The mixture of the two metals in their chloride form resulted in the observation of additive and synergistic effects, which underlines the importance of considering the cocktail effect in ecotoxicological studies.

**Keywords:** Oyster larvae, *Crassostrea gigas*, Cocktail effect, Galvanic anode, Aluminium, Zinc

## GRAPHICAL ABSTRACT



### 1. Introduction

Since the 1960s, aluminium-based galvanic anodes are one of the major protection methods against corrosion reducing the financial costs for the maintenance of metal structures immersed in the sea. However, galvanic anodes constitute one of the pathways for trace metals to enter in the environment (Barbucci et al., 1997). Depending on its specific alloy, aluminium-based galvanic anodes contain aluminium (Al) (95-96%), zinc (Zn) (4–5%) and Indium (In) (0.015–0.04%) which are necessary for activation and to avoid passive oxide films on the surface. Furthermore other trace metals (< 0.1%) such as cadmium, manganese, iron, silicon, lead or copper are also present as impurities from the manufacturing process (Smith and Goolsby, 1996). In contact with steel structures in sea water, the galvanic anode is deliberately induced to corrode, which undergoes oxidation and releases various metals in the form of ions or oxy-hydroxides into the marine environment. The anodes are corroded instead of the steel structure (with which it forms a galvanic cell), and are therefore usually described as sacrificial anodes.

As part of the energy transition, the focus has been placed on marine renewable energies, requiring also a threefold increase in corrosion protection by the end of 2030. A conservative estimate showed a current annual discharge of about 1,900 tons of Al and 90 tons of Zn in the North Sea alone (Kirchgeorg et al., 2018). In commercial ports, the load of Al galvanic anodes can reach a few hundred

tons per year. Because harbors are often confined or semi-enclosed areas with shallow water and low seawater turnover by tide or current, metal inputs from anode dissolution are more important in these environments, resulting in potential ecological damage as reported by previous biomonitoring studies in harbor environments (Bird et al., 1996; Caplat et al., 2020; Deborde et al., 2015; Gabelle et al., 2012; Jupp et al., 2017; Leleyter et al., 2007; Rousseau et al., 2009). It has been demonstrated in several studies that galvanic anodes increased Zn concentration in water as well as in the surface sediments (Caplat et al., 2020; Gabelle et al., 2012; Leleyter et al., 2007). An enrichment in the surface layer implies potential mobilization of metals from the sediments in response to physicochemical changes (e.g. during dredging operations) (Rousseau et al., 2009). However, it is difficult to assess the impact of the anode dissolution on the concentrations of metals by conducting *in situ* studies.

To our knowledge, too few studies investigated the biological effects of galvanic anodes on marine organisms (Barbarin, 2023; Bell et al., 2020; Caplat et al., 2010; Levallois et al., 2022; Mao et al., 2011; Mottin et al., 2012). Barbarin et al. (2023) concluded that it was not possible to evaluate the potential effect of galvanic anodes on the health of the black scallop *Mimachlamys varia* directly *in situ* because of various confounding factors in the port environment. In a previous study, the chronic exposure of *Crassostrea gigas* to metals released by aluminium-based galvanic anode induced pronounced biological effects for the highest tested concentration (296  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), especially in malondialdehyde levels in the digestive gland (Levallois et al., 2022). Moreover, adults' oysters bioaccumulated more Zn than Al even if Al was present in greater concentrations during exposures.

Bivalve larvae are more sensitive to Al and Zn than adults (Boyden et al., 1975; Brereton et al., 1973; Calabrese et al., 1973; Golding et al., 2015; MacInnes, 1981; Markich, 2021; Martin et al., 1981; Nadella et al., 2013; Pagano et al., 1996; Wilson and Hyne, 1997), but the question about the sensitivity to galvanic anode remains unanswered. It appears essential to characterize the effects of galvanic anodes on the larval stages of oysters in order to have a global overview on the complete life cycle. To this end, *C. gigas* larvae were exposed to a range of concentrations established from a stock solution of metals released by an aluminum-based galvanic anode and to a range of concentrations prepared from Al chloride, Zn chloride and a mixture of Al chloride and Zn chloride in order to compare the results between the different contaminants. Another objective was to provide quality data on the sensitivity of the Pacific oyster to the different cocktails tested to incorporate these data into current guidelines for protecting coastal marine ecosystems.

## 2. Material and Methods

### 2.1.Exposure protocol

The dissolution of an aluminium-based galvanic anode was reproduced with an electrochemical experimental device using natural seawater as already described in previous publications (Caplat et al., 2010; Levallois et al., 2022). The device was composed of a reference electrode (saturated calomel electrode - SCE) and a counter-electrode (CE) made of a platinum-titanium alloy as well as an aluminum-based galvanic anode of 800 g for a surface of 450 cm<sup>2</sup> (Al Bera15, Bac Corrosion® Control). In order to accelerate the dissolution of the anode, the assembly was electrically connected to a galvanostat. The galvanic anode was principally composed of 7 elements including Al (95-96%) and Zn (4-5%) with trace elements (Fe, Si, In, Mn and Cu). The day before the beginning of the experiment, the anode was installed in a large tank into which 160 L of seawater taken from the Luc-sur-mer marine station (Normandy, France) was added and passed through a sand filter. The mixing was obtained by an air diffuser. The operating time of the galvanostat was controlled by a programmer in order to vary the final target concentration and the saturated calomel electrode stabilised the corrosion potential of the anode. This device allowed to obtain a high concentrated stock solution of 5 mg L<sup>-1</sup> (based on total Al concentration).

The day of the experiment, a Zn chloride solution and an Al chloride hexahydrate solution were prepared with fresh seawater of which salinity was 33.2 ± 0.17 PSU. For this, 1 g of Zn chloride was added in 35 L and 3.955 g of Al chloride was added in 35 L. After homogenization, solutions were kept for two hours with an air diffuser before pH adjustment. The pH of the seawater used for all experiments was 8.11 whereas the pH of the three stock solutions ranged from 8.10 to 8.17 after adjustment.

### 2.2.Analysis of metals in water

A sample of each dilution of every concentration was collected to monitor the total Al and Zn concentrations. Samples were acidified with 69% nitric acid and stored at 4°C until passed by a Zeeman Atomic Absorption Spectrometer Z-AAS (AA240Z – Varian®) equipped with a graphite tube atomizer (FTA 120, Varian) and a programmable sample dispenser (PSD 120, Varian) in order to measure total Al concentrations. Analyzes were performed with a matrix modifier solution (2 g L<sup>-1</sup> of Mg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) and a temperature program developed for the seawater matrix. Each digested sample was analyzed 4 times, and average values were considered for evaluation. The zinc analyses were performed using an atomic absorption spectrometry in an air–acetylene flame (F-AAS, Varian AA240F). Non-specific absorptions were corrected with a deuterium lamp. Each sample was analyzed in triplicate, and average values were considered for evaluation. Blank solutions (33 g L<sup>-1</sup>) were performed by dissolution

of sodium chloride (> 99%) in ultrapure water. The detection limit (DL) was defined as mean plus three times standard deviation (SD) of blank analyses ( $n > 10$ ). For Al and Zn the DL are respectively  $6.6 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $3.1 \mu\text{g L}^{-1}$ .

### 2.3. Embryotoxicity bioassay and experimental design

Conditioned oysters were supplied by Guernsey Sea Farms (Guernsey, UK). Larvae were obtained using the standardised AFNOR procedure (NF ISO 17244, 2015). Briefly, male and female gametes were obtained by thermal stimulation; oysters were bathed every 30 min in alternate baths at 16 and 28 °C. The quality of the gametes was checked under the microscope: highly concentrated and motile spermatozoa and a high number of mature oocytes, uniform as possible, slightly pyriforms with a homogeneous granular cytoplasm. After the emission of gametes, these were filtered on sieves, with mesh size of 100  $\mu\text{m}$  for oocytes and 40  $\mu\text{m}$  for spermatozoa in order to eliminate potential residues. The egg density of the selected female was determined with a Mallassez counting cell. Spermatozoa were gradually added to the oocyte solution at a rate of about 10 spermatozoa per oocyte. Fertilisation was performed in a beaker placed on a vibrating table to prevent polyspermia.

Twenty minutes after the beginning of the fertilisation, the embryos were distributed at a density of  $60,000 \text{ L}^{-1}$  into the wells of a 24-well plate where the contaminated water had been previously added (corresponding to 120 embryos per well). After 24 h at 24°C in the dark without feeding and aeration, D-larvae were fixed using 40  $\mu\text{L}$  of an 8% formalin solution ( $20 \text{ mL L}^{-1}$ ). The larvae of each well were counted using an inverted binocular microscope at 400x magnification (Leica® R DM IRB). Observations enabled the calculation of rates of abnormality and the determination of the types of abnormalities. Larvae were considered abnormal if one or more of the following characteristics were evident: (i) malformed embryos or trochophore larvae that did not reach the D-veliger stage (developmental arrest) (EMB), (ii) D-veligers with shell deformities (e.g. convex hinge, indented shell margin and/or incomplete shell) (SHELL), (iii) loss of soft tissue (e.g. patches of missing tissue), protruding velum or mantle hypertrophy (with/without additional shell abnormality) (all MANT). All unfertilized oocytes observed were counted in order to calculate a fertilization rate.

For the four contaminants tested, embryo–larval toxicity tests were conducted using a broad range of concentrations (11 to 13 concentrations + control). For each concentration, expositions were performed in 8 wells to precisely determine the  $\text{EC}_x$  values (effective concentration for an effect on X% of the individuals tested). Consequently, the minimum number of individuals examined for each concentration was 960. Results of the embryo–larval development assessment of the exposed organisms were expressed as net percentages of the normal development ( $\text{NPN}_e$ ) of D-shaped larvae adjusted for the controls as calculated in a previous study (Mottier et al., 2013).

- (1)  $NPN_e = 100 - \left[ \frac{PA_e - \overline{PAC}}{100 - \overline{PAC}} \times 100 \right]$
- (2)  $PA_e = \frac{NA_e \times 100}{T_e}$
- (3)  $NA_e$  = number of abnormal larvae in a given exposure replicate
- (4)  $T_e$  = total number of larvae in a given exposure replicate.
- (5)  $\overline{PAC}$  = mean of  $PAC$  (for a given experiment)
- (6)  $PAC = \frac{NA_c \times 100}{T_c}$
- (7)  $NA_c$  = number of abnormal larvae in a given control replicate
- (8)  $T_c$  = total number of larvae in a given control replicate

## 2.4. Statistical analyses

In order to calculate various  $EC_x$  values, we realised non-linear regressions (using the Hill equation) through the Excel® macro REGTOX (Vindimian, 2012). For each dose response curve, the  $EC_{10}$ ,  $EC_{20}$ , and  $EC_{50}$  were calculated after 24-h exposure using the Al and Zn concentrations measured at the beginning of the exposure for the different dilutions. In addition, because the  $NPN_e$  data for embryotoxicity did not follow a normal distribution, they were compared using a Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test in order to distinguish the homogeneous groups. A significant difference was accepted when  $p < 0.05$ . All results were presented as mean  $\pm$  SEM (Standard Error of the Mean). All the statistical analyses in the present study were carried out with R studio software version 3.6.3.

The toxicity of the anode cocktail and the mixture of Al chloride with Zn chloride was analyzed according to a synergistic ratio (SR) model (Plackett and Hewlett, 1963) used in other studies (Di Poi et al., 2018; Gamain et al., 2017):

$$SR \text{ index} = \frac{EC_{50} \text{ of one metal acting alone}}{EC_{50} \text{ of one metal in the cocktail}}$$

Where, if  $SR = 1$ , the action of the metal cocktail is described as additive; if  $SR < 1$ , the action of the metal cocktail is described antagonistic; if  $SR > 1$ , the action of the metal cocktail is described synergistic.  $EC_{50}$  of the metal in the cocktail was corrected accordingly to the ratios between Al and Zn concentrations.

## 3. Results

### 3.1. Analyses of the tested molecules

For the control condition, the total Al and Zn concentrations were, respectively, 9.8 and 9.7  $\mu\text{g L}^{-1}$  with an average % RSD (Relative Standard Deviation) of 6% for both elements (Table X). Concerning the contamination with the galvanic anode, the concentrations of Al ranged from 14.2 to



15,856  $\mu\text{g L}^{-1}$  and those of Zn ranged from 11 to 352  $\mu\text{g L}^{-1}$ . The contamination with Al chloride ranged from 22 to 4,218  $\mu\text{g L}^{-1}$  while Zn chloride concentrations varied between 14 and 8,150  $\mu\text{g L}^{-1}$ . For the cocktail condition with both Al chloride and Zn chloride, the maximum concentrations were for Al and Zn, respectively, 2,060.3  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 959  $\mu\text{g L}^{-1}$  whereas the lowest concentrations were, respectively, 13.6  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 12.1  $\mu\text{g L}^{-1}$ . The % RSD were measured between 0.3% and 8.9% for both element concentrations. The pH adjustment in the tanks caused a precipitation of aluminum chloride which explains why we could not obtain the same ratio between the Al chloride/Zn chloride mixture compared to the mixture produced by the anode.

Table X : Aluminium and zinc concentrations measured in seawater ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) at the beginning of the exposure for the different conditions and contaminants. For the control condition, the aluminum and zinc concentrations were respectively 9.8 and 9.7  $\mu\text{g L}^{-1}$ . The number of concentrations varies from one contaminant to another for reasons of contamination logistics and pH. The % relative standard deviation were measured between 0.3% and 8.9% for both element concentrations.

| Condition | Anode   |       |             | AlCl <sub>3</sub> | ZnCl <sub>2</sub> | AlCl <sub>3</sub> + ZnCl <sub>2</sub> |       |             |
|-----------|---------|-------|-------------|-------------------|-------------------|---------------------------------------|-------|-------------|
|           | [Al]    | [Zn]  | Al/Zn Ratio | [Al]              | [Zn]              | [Al]                                  | [Zn]  | Al/Zn Ratio |
| C1        | 15855.8 | 352.0 | 45.0        | 4218.0            | 8150.0            | X                                     | X     | X           |
| C2        | 2488.8  | 111.8 | 22.3        | 1996.6            | 4244.0            | 2060.3                                | 959.0 | 2.1         |
| C3        | 932.9   | 49.9  | 18.7        | 928.3             | 1594.0            | 1009.6                                | 442.4 | 2.3         |
| C4        | 473.8   | 27.7  | 17.1        | 769.9             | 845.0             | 728.5                                 | 336.2 | 2.2         |
| C5        | 447.2   | 28.0  | 16.0        | 470.7             | 407.9             | 447.9                                 | 234.6 | 1.9         |
| C6        | 442.4   | 30.1  | 14.7        | 280.0             | 319.6             | 257.2                                 | 142.0 | 1.8         |
| C7        | 292.8   | 20.3  | 14.4        | 187.7             | 215.4             | 182.0                                 | 105.2 | 1.7         |
| C8        | 195.4   | 18.8  | 10.4        | 105.0             | 133.3             | 90.3                                  | 57.0  | 1.6         |
| C9        | 105.3   | 11.8  | 8.9         | 44.8              | 90.8              | 50.4                                  | 33.0  | 1.5         |
| C10       | 151.4   | 12.5  | 12.1        | 22.0              | 54.2              | 28.3                                  | 18.8  | 1.5         |
| C11       | 26.5    | 8.5   | 3.1         | 39.5              | 32.0              | 13.6                                  | 12.1  | 1.1         |
| C12       | 14.2    | 11.0  | 1.3         | X                 | 26.4              | X                                     | X     | X           |
| C13       | X       | X     | X           | X                 | 14.4              | X                                     | X     | X           |

### 3.2.Effects of metals on embryo–larval development

For each contaminant, the results of the embryo-larval bioassay revealed very high levels of fertilization ( $95.57 \pm 2.69\%$ ) and very few unfertilized oocytes were thus observed. Moreover, with a

normality rate in the controls of  $78.10\% \pm 4.88\%$ , the tests were validated according to the AFNOR procedure (NF ISO 17244, 2015).

The embryo–larval development exhibited concentration-dependent effects on characterised by a decrease in the rates of normal D-larvae with an increase of the contaminant concentrations for each metal (KW,  $p < 0.05$ ) (Figure 34). For an Al concentration of  $293 \mu\text{g L}^{-1}$  released from the galvanic anode, no more normal larvae were observed (Figure 34A). For Al chloride, a very low proportion of normal larvae (0.23%) was still observed at  $280 \mu\text{g L}^{-1}$  (Figure 34B). As a comparison, few larvae developed normally when Zn concentrations were  $319.6 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $407.9 \mu\text{g L}^{-1}$  (Figure 34C). The mixture of the two metals in their chloride form showed a more pronounced effect since no more larvae succeeded in developing normally for a concentration of  $257 \mu\text{g L}^{-1}$  of Al and  $142 \mu\text{g L}^{-1}$  of Zn (Figure 34D). Compared with the controls, no tested metal concentration had significant effect on the normal development rate at low concentrations (KW,  $p > 0.05$ ). In contrast, there was a significant difference for concentrations of  $182\text{-}105 \mu\text{g L}^{-1}$  associated to the Al-Zn-salt mixture (KW,  $p < 0.05$ ).

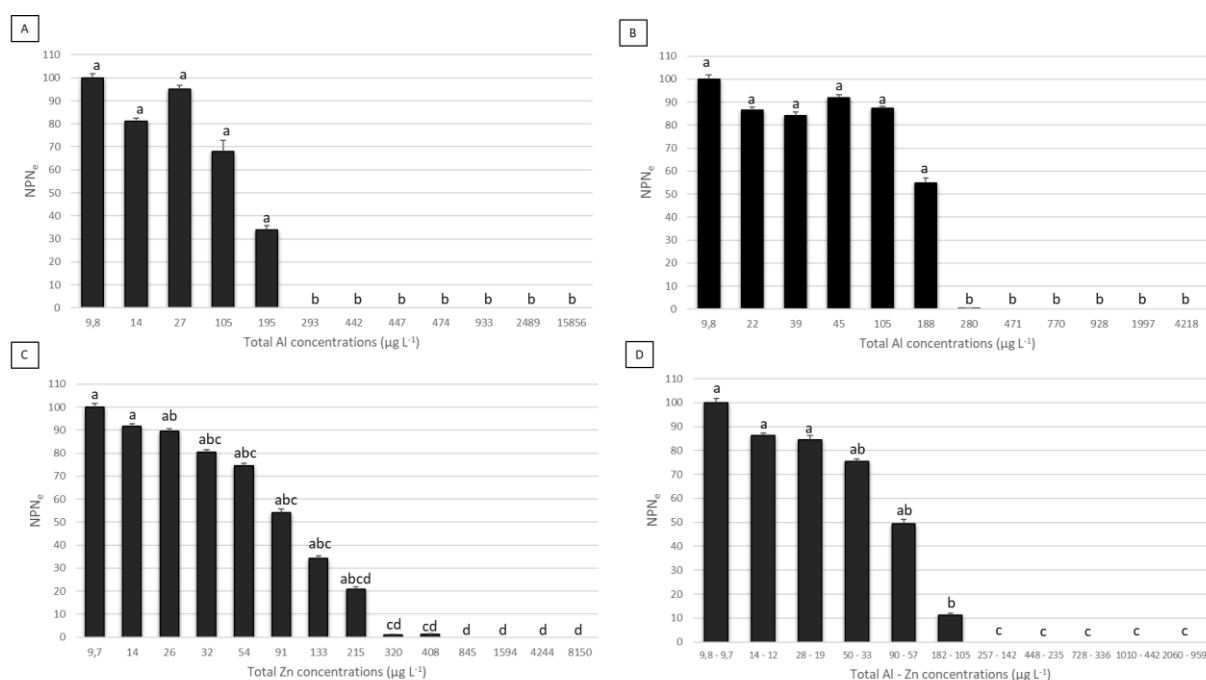


Figure 34 : Net percentages of normal development (NPN<sub>e</sub>) ( $\pm$  SEM) in *C. gigas* embryo-larvae observed after 24 h of exposure to products released by aluminium-based galvanic anode degradation (A), aluminium chloride (B), zinc chloride (C) and cocktail of aluminium and zinc chloride (D). The two values on the horizontal axis in Figure 1D correspond to the concentrations of aluminium and zinc. The concentrations that do not share a letter are significantly different.

The Table XI presents 3 EC<sub>x</sub> values calculated for the embryotoxicity tests in *C. gigas* embryo-larvae observed after 24 h of exposure for the four different metallic exposures. For contamination by aluminum-based galvanic anode degradation products, the EC<sub>50</sub> based on the total Al concentration was estimated at  $190.22 \mu\text{g L}^{-1}$ . For exposure to Al chloride and Zn chloride alone, the EC<sub>50</sub> were 193.55

and 100.05  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. The mixture of the two metals in their chloride form induced  $\text{EC}_{50}$  values of 91.79 and 57.67  $\mu\text{g L}^{-1}$  of Al and Zn concentrations, respectively. Considering both the  $\text{EC}_{10}$  and the  $\text{EC}_{50}$  values, the Zn was more toxic than the Al, and the cocktail of Al and Zn was more toxic than metals alone. The linear regression performed to calculate the different  $\text{EC}_x$  are shown in supplementary data 4. We observed that the dose effect curve for Zn did not have the same shape as the dose effect curves for Al + Zn mixture.

Table XI : Ecotoxicological parameters calculated for the embryotoxicity tests (rates abnormalities in D-shaped larvae) in *C. gigas* embryo-larvae observed after 24 h of exposure at the different concentrations of metals (products released by aluminium-based galvanic anode degradation, aluminium chloride, zinc chloride and cocktail of aluminium and zinc chloride).  $\text{EC}_x$  = effective concentration (in  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) which induced an effect of X% on the population (5- 50%).

| Parameters       | ANODE |      | $\text{AlCl}_3$ | $\text{ZnCl}_2$ | Cocktail ( $\text{AlCl}_3 + \text{ZnCl}_2$ ) |                 |
|------------------|-------|------|-----------------|-----------------|----------------------------------------------|-----------------|
|                  | Al    | Zn   |                 |                 | $\text{AlCl}_3$                              | $\text{ZnCl}_2$ |
| $\text{EC}_{10}$ | 165.9 | 10.4 | 166.5           | 34.3            | 42.1                                         | 28.9            |
| $\text{EC}_{20}$ | 174.5 | 11.9 | 176.0           | 50.9            | 56.1                                         | 37.3            |
| $\text{EC}_{50}$ | 190.2 | 15.1 | 193.5           | 100.0           | 91.8                                         | 57.7            |

When abnormal embryo-larval development was observed under microscopy, different categories of anomalies were described (Figure 35). For the control larvae, it appeared that early stages (embryos or trochophore larvae) in developmental arrest (EMB) was the most frequent (8.1-16%) followed by the mantle abnormalities (MANT) (3.1-10.9%). The percentages of abnormalities affecting the shell increased in response to low metal concentrations and then remained stable until a specific concentration. Indeed, we noticed that from a threshold concentration for the 4 contaminants, only developmental arrests in early stages (EMB) were observed; larvae no more had the capacity to reach the D veliger stage.

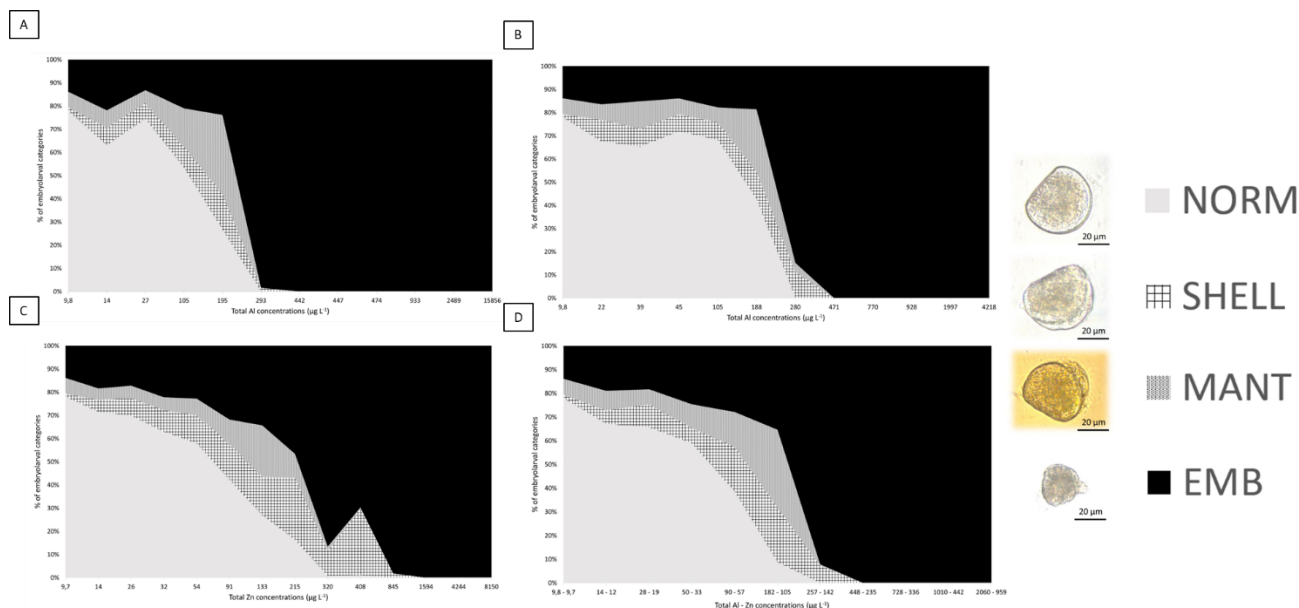


Figure 35 : The occurrence of the various types of abnormalities affecting embryo-larval development in *C. gigas* after 24 h of exposure to products released by aluminium-based galvanic anode degradation (A), aluminium chloride (B), zinc chloride (c) and cocktail of aluminium and zinc chloride (D). NORM = normal D-shaped larvae; SHEL = D-shaped larvae exhibiting shell abnormalities; MANT = D-shaped larvae showing a hypertrophied mantle; EMB = embryos in developmental arrest.

### 3.3. Joint-action toxicity of mixtures

On the basis of  $EC_{50}$ , the mixtures appeared to be at least as toxic, or even more toxic, than the exposures to the metals alone. The SR ratios varied from 0.69 to 2.11. For the anode exposure, we observed an additive action in the case of Al (SR=1.02) and a slight antagonistic effect in the case of Zn (SR=0.69). Regarding the exposure to the cocktail of Al and Zn in their chloride form, the results revealed a synergistic model with Al (SR=2.11) and an additive effect with the Zn (SR=1.05). Therefore, the SR model indicated that the Zn chloride increased the toxicity of Al chloride for oyster larvae.

## 4. Discussion

The greater sensitivity of early life stages when compared to adults is explained by a number of physiological, morphological, behavioral and biochemical characteristics (Mohammed, 2013). For example, the permeable tegument of larvae has a larger surface area for the uptake of toxicants resulting in increased sensitivity. Moreover, adults can sequester contaminants in tissues or specific proteins which captures the contaminants preventing them from reaching target organs which is not possible for larvae. At the present time, few studies investigated the potential environmental impact of aluminium-based galvanic anodes on marine organisms (Barbarin, 2023; Bell et al., 2020; Caplat et al., 2010; Levallois et al., 2022; Mao et al., 2011), and none on larval stages. In the present study, we performed the first assessment of the effects of aluminium-based galvanic anode on the larval stage of a marine species of economic importance, the Pacific oyster using a standard embryotoxicity bioassay.

In literature, even considering Al in all its chemical forms (Al salts, industrial effluents enriched in Al), its effects have been understudied in bivalves compared to other metals (Calabrese et al., 1973; Golding et al., 2015; Mao et al., 2011; Wilson and Hyne, 1997). Comparatively, the effects of Zn are relatively well documented on oyster larvae. Starting from a threshold concentration, these two metals are known to disrupt the swimming behavior, and negatively affect the growth and structural development of bivalve larvae, resulting in an increased incidence of larval abnormalities such as shell deformities, absence of umbo, mantle hypertrophy or even developmental arrest (Boyden et al., 1975; Brereton et al., 1973; Calabrese et al., 1973; Martin et al., 1981; Watling, 1982). Recently, a wide-ranging work evaluated the sensitivity of 10 bivalve species to 10 metals including aluminum chloride ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) and zinc chloride ( $\text{ZnCl}_2$ ) (Markich, 2021). Among these species, authors studied two oyster species including the Pacific oyster, *C. gigas*, the rock oyster, *Saccostrea glomerata*, the mussel *Mytilus edulis*, the scaly scallop, *Scaechlamys livida*, two cockle species, and 4 clam species. For all bivalve species, the decreasing order of metal sensitivity was  $\text{Cu} > \text{Pb} > \text{Zn} = \text{Ni} > \text{Co} > \text{Cd} > \text{Al} > \text{Cr (VI)} > \text{Mn} \geq \text{Fe (III)}$ , where Cu was eight times more toxic than Zn. Among the 10 species of bivalves studied, *C. gigas* appeared to be the most sensitive species to our two metals of interest, Al and Zn. The  $\text{EC}_{50}$  for Al was determined at  $195 \mu\text{g L}^{-1}$  and the  $\text{EC}_{50}$  for Zn was determined at  $46 \mu\text{g L}^{-1}$  in *C. gigas* (Markich, 2021). The value for Al is very close to what we found in the present study ( $193.55 \mu\text{g L}^{-1}$ ); in contrast the Zn value is more than twice lower ( $46$  vs  $100.05 \mu\text{g L}^{-1}$ ) but our results are similar to what other authors have reported ( $\text{Zn EC}_{50} = 119 \mu\text{g L}^{-1}$ ) in *C. gigas* (Martin et al., 1981). The table in supplementary data 5 summarizes the results of the various studies dealing with the toxicity of Al and Zn to larval marine organisms.

In the present study, for the first time, an  $\text{EC}_{50}$  of galvanic anode based on Al concentration ( $190.22 \mu\text{g L}^{-1}$ ) was calculated on the larval stage of a marine organism. Estimates of  $\text{EC}_{10}$  and  $\text{EC}_{20}$  could be considered as equivalent to No Observed Effect Concentration (NOEC), and Lowest Observed Effect Concentration (LOEC), respectively as suggested in OECD guidelines (OECD 201, 2006). Therefore, the NOEC based on Al concentration for galvanic anode was estimated at  $165.95 \mu\text{g L}^{-1}$  for the Pacific oyster. Looking at the dose-effect curves obtained, the window of sensitivity to Zn appeared to be more restrictive than for Al. In their study, Markich et al (2021) also reported NOECs for Al and Zn about, respectively,  $89 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $11.2 \mu\text{g L}^{-1}$ , which is much lower than in the present study. Moreover, their study showed a relationship between phylogeny and metal sensitivity considering that the five bivalve species of the subclass Pteriomorphia (oysters, mussels and scallops) constituted the most sensitive group to the metals tested compared to the bivalves of the subclass Heteroconchia (cockles and clams). These results are confirmed by the literature highlighting the difference of sensitivity in bivalves as shown in the table in supplementary data 5.

The embryo-larval development of invertebrates is a very important endpoint in ecotoxicological studies. Nevertheless, in most publications, the type of abnormality is rarely specified and the results are expressed only in terms of abnormality rates. Here, we highlighted that developmental arrest was dominant (EMB) from a certain concentration for each of the tested metals considering that a developmental arrest is more critical than a shell abnormality in terms of viability. We noticed that abnormalities affecting the shell were slightly more frequent than those affecting the mantle in response to Zn alone compared to Al alone. Regarding mechanisms of action, in metazoans, Al has no metal-specific membrane transporter and does not undergo oxidation-reduction reactions, occurring only in the trivalent ( $\text{Al}^{3+}$ ) state. Mechanisms of Al transport across the cell membrane are poorly understood and speculative (Exley and Mold, 2015).

Al is the most abundant metal in the earth's crust, mainly present in the form of bauxite. Although anthropogenic sources of Al to aquatic systems are globally lower than natural sources (Rauch and Pacyna, 2009), there is an increase in anthropogenic releases in aquatic ecosystems. In the marine environment, there is currently no regulatory threshold for Al. A study, based on toxicity test results from 11 marine species of different trophic levels, proposed a NOEC of  $24 \mu\text{g L}^{-1}$  of total Al for an Australian marine water guideline (Golding et al., 2015). In general, Al concentrations in coastal waters rarely exceed  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  while measurements in the open ocean have shown a consistently lower range of dissolved Al concentrations (Tria et al., 2007). The contribution of atmospheric particles and dust (less than  $5 \mu\text{m}$  in diameter) is the major source of Al to ocean surface waters (Hydes, 1983; Hydes et al., 1988; Kramer et al., 2004). However, several studies reported cases of high Al contamination in coastal waters, as in Port Botany, the major shipping port in Sydney ( $151 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Jahan and Strežov, 2017), on the northern coast of Chile ( $132 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Valdés et al., 2011) or even on the Egyptian coast with an Al concentration of  $106 \mu\text{g L}^{-1}$  (Abdel Ghani, 2015). According to our  $\text{EC}_{10}$  results, the most polluted sites would not cause any direct damage for the development of oyster larvae. Nevertheless, a record of  $1,170 \mu\text{g L}^{-1}$  was previously recorded in the port of Yamba in Australia, where the authors found an average concentration as high as  $224 \mu\text{g L}^{-1}$  (Jahan and Strežov, 2017), which would result in 100% embryos in developmental arrest and thus compromise oyster life cycle.

For lower concentrations, the cocktail effect of elements released from galvanic anodes, especially in presence of Zn, should not be excluded. Caplat et al. (2020) recorded higher Zn enrichment factor of sediments than Al in harbor environment under low hydrodynamic conditions and at proximity of anodes. Zn is the 27<sup>th</sup> most abundant element in the earth's crust where it is mainly found as Zn sulfide ( $\text{ZnS}$ ), also known as sphalerite. Analyses in aquatic environments showed that Zn is one of the compounds always detected and present at concentrations above  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  at the entrance and exit of sewage treatment (INERIS, 2010). In marine environment and in the absence of dissolved organic

matter, Zn is mostly in its hydrated form  $\text{Zn}(\text{OH})_2$  which makes it particularly bioavailable to marine organisms (Hogstrand et al., 2012). In the open ocean, Zn is present at concentrations in the range of  $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ . However, in coastal and estuarine waters, concentrations can be considerably higher, reaching  $1,800 \mu\text{g L}^{-1}$  in some extreme conditions, such as Sepetiba Bay in Brazil (Barcellos, 1995). In ballast water, it could reach  $1,160 \mu\text{g L}^{-1}$  because of the use of Zn-based galvanic anodes (Jelmert and Van Leeuwen, 2000). In the English Channel, concentrations measured remain always below  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (Sheahan et al., 2007). Presently, the current marine guideline for zinc is  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ . Based on normal concentrations, there is no direct environmental risk to the development of oyster larvae, but on the most polluted sites that exceed  $1 \text{ mg L}^{-1}$  of zinc, the life cycle of bivalves is definitely compromised. Despite the fact that the adults are relatively resistant, the  $\text{EC}_{50}$  value of larval stages varies between  $40$  and  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  (Markich, 2021; Martin et al., 1981; Nadella et al., 2013). In addition to the larval stages, the metamorphosis and development of juvenile oysters may be disrupted. At  $125 \mu\text{g L}^{-1}$  and above, Zn caused a delay in the settlement of oyster larvae and a concentration of  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  reduced juvenile oyster growth by over 50% (Boyden et al., 1975). In three oyster species, *C. gigas*, *Saccostrea cucullata* and *Striostrea margaritacea*,  $\text{EC}_{50}$  values were higher in 16-day-old larvae ( $80$ ,  $45$  and  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ) than in 13-day-old larvae (respectively,  $95$ ,  $85$  and  $85 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Watling, 1982); tolerance for Zn is increased in older oyster larvae. The mechanism of Zn inhibition on oyster larvae could be caused by a delay or arrest in behavioral development, thus disrupting the search for the appropriate substratum for larval settlement.

Because aquatic organisms are continuously exposed to complex mixtures of emerging contaminants, it is essential to evaluate mixture toxicity. Metal cocktails may result in additive action, where the effects of the metals are cumulative; in antagonistic action, where the toxic effects caused by the mixture are substantially less than the sum of the toxic effects of the separate metals; or in synergistic action, where the toxic effects caused by the mixture substantially exceed the sum of the effects of alone metals (Liu et al., 2017). In the oyster *Crassostrea virginica*, the combined effects of Cu and Zn revealed a synergistic effect on embryo larval development (MacInnes, 1981). In the present study, SR models indicated that Zn and Al released from galvanic anodes had additive or antagonistic effects, whereas Al chloride and Zn chloride mixed together exhibited additive or synergistic effects on the larval development of *C. gigas*. These results are in agreement with a previous study that showed that Al and Zn from the dissolution of a galvanic anode were less toxic in the sea urchin *Paracentrotus lividus* than Al and Zn in their sulfated form (Caplat et al., 2010). This difference in toxicity may be explained by a difference in bioavailability to organisms. Dissolution of the anode results in a hydroxide precipitation due to a local increase in pH or associations of metal-organic complexes that could reduce the levels of free ionic species Al (III) and Zn (II) and thus their availability. Therefore, this could result in a lower toxicity of the metal cocktail released by galvanic anodes compared to Al and Zn in other

forms which contain a high proportion of free metal species due to the association of chloride anions. It remains difficult to interpret the cocktail effects.

Even if some larvae do not seem to be morphologically affected (no visible abnormalities), a delay in growth caused by Al or Zn could induce a prolongation of the pelagic life and thus an increase in the risk of predation, disease and dispersion, thus reducing the recruitment (Calabrese et al., 1973). Moreover, it is important to keep in mind that aluminum-based galvanic anodes release other elements, including indium (In), of which effects have been rarely investigated. For instance, an exposure of rats to In demonstrated clear evidence of carcinogenic effects in long-term inhalation studies (Tanaka et al., 2010). It would be thus interesting to conduct laboratory exposures on marine organisms to this metal.

## 5. Conclusion

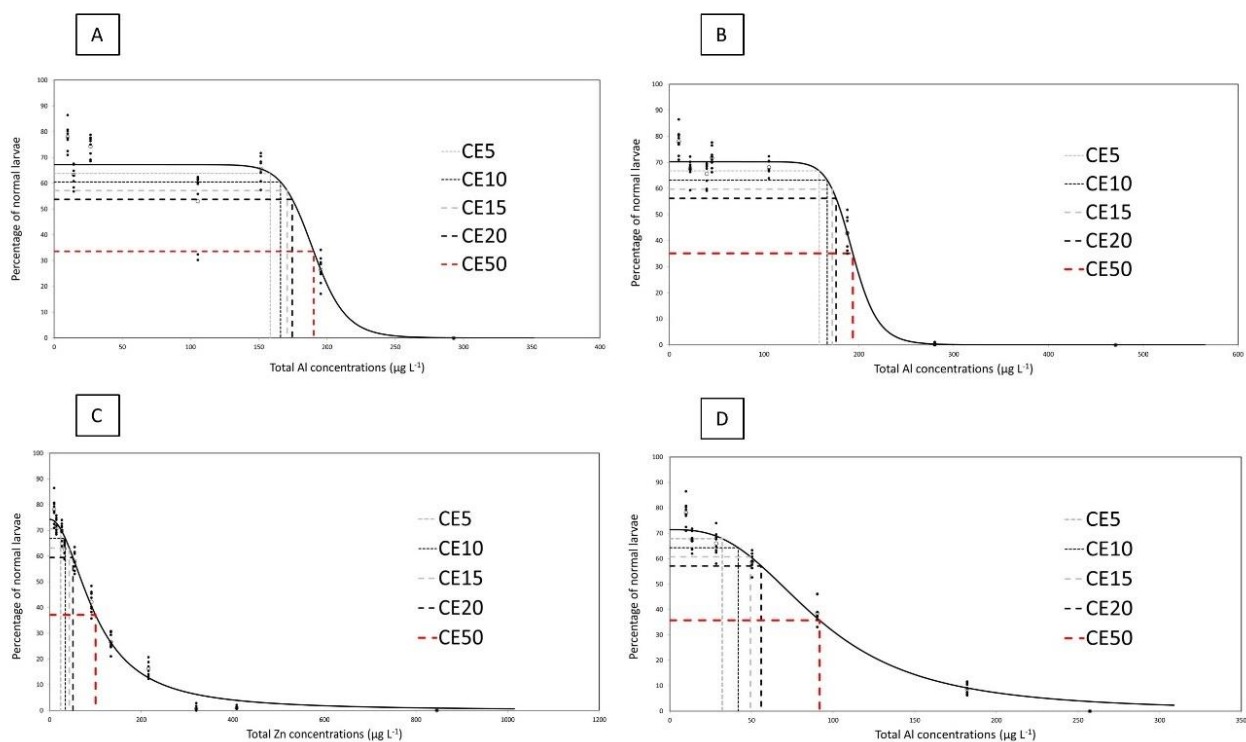
For the first time, tests were conducted on the toxicity of aluminium-based galvanic anode on the larval stage of a marine organism, and the results were compared to the toxicity of Al and Zn in other chemical forms. We highlighted an  $EC_{50}$  value of the galvanic anode of  $190.22 \mu\text{g L}^{-1}$  based on the Al concentration. Considering the  $EC_{10}$  as the NOEC, the environmental dose of  $165.95 \mu\text{g L}^{-1}$  should not be exceeded for the successful development of oyster larvae. Our  $EC_{50}$  results for Al chloride ( $193.55 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and Zn chloride ( $100.05 \mu\text{g L}^{-1}$ ) alone are in agreement with literature about the same species. A substantial number of studies focused on the individual actions of trace metal elements on marine organisms. However, environmental contaminants are found as multiple mixtures with different concentration ratios, which is the case for aluminum-based galvanic anodes. As we observed, Al and Zn from galvanic anode presented additive effect, and the mixture metals in their chloride form showed synergistic effects. The present study highlighted the importance of including the early life stages of marine organisms and the cocktail effects when assessing chronic metal toxicity what is essential to build up our knowledge. This would help establish recommendations in environmental risk assessment of galvanic anodes in costal and harbor ecosystems. In the context of climate change and ocean acidification, future ecotoxicological studies should also consider the decrease of pH as a factor increasing the speciation and the bioavailability of metals with intensification of their toxicity to marine organisms.

### *Acknowledgements*

We thank the Normandy region for its funding.



Supplementary data 4 : Non-linear regressions (using the Hill equation) realised with the Excel® macro REGTOX (Vindimian, 2012) of the net percentages of normal development of *C. gigas* embryo-larvae after 24 h of exposure to the different contaminants: products released by aluminium-based galvanic anode degradation (A), aluminium chloride (B), zinc chloride (c), cocktail of aluminium and zinc chloride based on aluminium concentrations (D).



Supplementary data 5 : Synthesis of studies on the impact of aluminum and zinc on the larval phase of marine organisms. In the column Tested concentrations, the number of concentrations tested is indicated in brackets when it is mentioned in the article.

| Species                              | Chemical Species                     | Exposure Time | Tested concentrations         | Main results                                                                                                                    | Reference                        |
|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------|-------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <b>Aluminium</b>                     |                                      |               |                               |                                                                                                                                 |                                  |
| <i>Crassostrea virginica</i>         | AlCl <sub>3</sub>                    | 42-48 h       | 1000-7500 µg L <sup>-1</sup>  | No effect observed                                                                                                              | Calabrese et al. (1973)          |
| <i>Saccostrea glomerata</i>          | Lixiviat de sol                      | 48 h          | 100-800 µg L <sup>-1</sup>    | NOEC = 100 µg L <sup>-1</sup>                                                                                                   | Wilson et al. (1997)             |
| <i>Mytilus edulis</i>                | AlCl <sub>3</sub>                    | 72 h          | 1-10 000 µg L <sup>-1</sup>   | EC <sub>10</sub> = 250 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Golding et al. (2015)            |
| <i>Saccostrea echinata</i>           | AlCl <sub>3</sub>                    | 48 h          | 1-10 000 µg L <sup>-1</sup>   | EC <sub>10</sub> = 410 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Golding et al. (2015)            |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i>     | Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> )   | 48 h          | 1,5-15 000 µg L <sup>-1</sup> | NOEC = 2,7 µg L <sup>-1</sup>                                                                                                   | Pagano et al. (1996)             |
| <i>Crassostrea gigas</i>             | AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 48 h          | 12 concentrations             | EC <sub>50</sub> = 195 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Markich (2021)                   |
| <i>Saccostrea glomerata</i>          | AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 48 h          | 12 concentrations             | EC <sub>50</sub> = 202 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Markich (2021)                   |
| <i>Xenostrobus securis</i>           | AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 48 h          | 12 concentrations             | EC <sub>50</sub> = 228 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Markich (2021)                   |
| <i>Scaechlamys livida</i>            | AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 48 h          | 12 concentrations             | EC <sub>50</sub> = 261 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Markich (2021)                   |
| <i>Anadara trapezia</i>              | AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 48 h          | 12 concentrations             | EC <sub>50</sub> = 291 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Markich (2021)                   |
| <i>Fulvia tenuicostata</i>           | AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 48 h          | 12 concentrations             | EC <sub>50</sub> = 352 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Markich (2021)                   |
| <i>Hiatula alba</i>                  | AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 48 h          | 12 concentrations             | EC <sub>50</sub> = 377 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Markich (2021)                   |
| <i>Barnea australasiae</i>           | AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 48 h          | 12 concentrations             | EC <sub>50</sub> = 397 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Markich (2021)                   |
| <i>Spisula trigonella</i>            | AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 48 h          | 12 concentrations             | EC <sub>50</sub> = 460 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Markich (2021)                   |
| <i>Irus crenatus</i>                 | AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 48 h          | 12 concentrations             | EC <sub>50</sub> = 498 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Markich (2021)                   |
| <i>Helicodaris tuberculata</i>       | AlCl <sub>3</sub>                    | 72 h          | 1-10 000 µg L <sup>-1</sup>   | No effect observed                                                                                                              | Golding et al. (2015)            |
| <i>Sphaerechinus granularis</i>      | Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> )   | 72 h          | 1,5-15 000 µg L <sup>-1</sup> | Dose-dependent decrease in fertilization success                                                                                | Pagano et al. (1996)             |
| <i>Paracentrotus lividus</i>         | Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> )   | 72 h          | 1,5-15 000 µg L <sup>-1</sup> | Few effects observed                                                                                                            | Pagano et al. (1996)             |
| <i>Psammehinus microtuberculatus</i> | Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> )   | 72 h          | 1,5-15 000 µg L <sup>-1</sup> | Dose-dependent larval mortality                                                                                                 | Pagano et al. (1996)             |
| <i>Lates calcarifer</i>              | AlCl <sub>3</sub>                    | 7 jours       | 1-10 000 µg L <sup>-1</sup>   | No effect observed                                                                                                              | Golding et al. (2015)            |
| <i>Acanthochromis polyacanthus</i>   | AlCl <sub>3</sub>                    | 7 jours       | 1-10 000 µg L <sup>-1</sup>   | No effect observed                                                                                                              | Golding et al. (2015)            |
| <i>Acropora tenuis</i>               | AlCl <sub>3</sub>                    | 3-18 h        | X                             | EC <sub>50</sub> = 2997 µg L <sup>-1</sup> (fertilization)<br>EC <sub>50</sub> = 1945 µg L <sup>-1</sup> (larval metamorphosis) | Negri et al. (2011)              |
| <b>Zinc</b>                          |                                      |               |                               |                                                                                                                                 |                                  |
| <i>Crassostrea gigas</i>             | ZnSO <sub>4</sub>                    | 5-10 jours    | 25-500 µg L <sup>-1</sup>     | Decreased larval growth and attachment                                                                                          | Boyden et al. (1975)             |
| <i>Crassostrea gigas</i>             | ZnSO <sub>4</sub>                    | 5 jours       | 50-500 µg L <sup>-1</sup>     | Developmental effects from 100 µg L <sup>-1</sup>                                                                               | Brereton et al. (1973)           |
| <i>Crassostrea virginica</i>         | ZnCl <sub>2</sub>                    | 48 h          | 0-200 µg L <sup>-1</sup>      | EC <sub>50</sub> = 205 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | MacInnes et al. (1980)           |
| <i>Crassostrea virginica</i>         | ZnCl <sub>2</sub>                    | 42-48 h       | X                             | EC <sub>50</sub> = 310 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Calabrese et al. (1973)          |
| <i>Crassostrea gigas</i>             | X                                    | 4 jours       | 10-100 µg L <sup>-1</sup>     | EC <sub>50</sub> (6 day old larvae) = 80 µg L <sup>-1</sup> EC <sub>50</sub> (16 day old larvae) = 95 µg L <sup>-1</sup>        | Watling (1982)                   |
| <i>Saccostrea cucullata</i>          | X                                    | 4 jours       | 10-100 µg L <sup>-1</sup>     | EC <sub>50</sub> (3 day old larvae) = 45 µg L <sup>-1</sup> EC <sub>50</sub> (13 day old larvae) = 85 µg L <sup>-1</sup>        | Watling (1982)                   |
| <i>Striostrea margaritacea</i>       | X                                    | 4 jours       | 10-100 µg L <sup>-1</sup>     | EC <sub>50</sub> (3 day old larvae) = 50 µg L <sup>-1</sup> EC <sub>50</sub> (13 day old larvae) = 85 µg L <sup>-1</sup>        | Watling (1982)                   |
| <i>Crassostrea gigas</i>             | ZnSO <sub>4</sub>                    | 48 h          | X                             | EC <sub>50</sub> = 119 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Martin et al. (1981)             |
| <i>Mytilus edulis</i>                | ZnSO <sub>4</sub>                    | 48 h          | X                             | EC <sub>50</sub> = 175 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Martin et al. (1981)             |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i>     | ZnSO <sub>4</sub>                    | 48 h          | 46-918 µg L <sup>-1</sup>     | EC <sub>50</sub> = 172 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Nadella et al. (2013)            |
| <i>Mytilus trossulus</i>             | ZnSO <sub>4</sub>                    | 48 h          | 46-918 µg L <sup>-1</sup>     | EC <sub>50</sub> = 135 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Nadella et al. (2013)            |
| <i>Magallana gigas</i>               | ZnCl <sub>2</sub>                    | 48 h          | 12 concentrations             | EC <sub>50</sub> = 46 µg L <sup>-1</sup>                                                                                        | Markich (2021)                   |
| <i>Saccostrea glomerata</i>          | ZnCl <sub>2</sub>                    | 48 h          | 12 concentrations             | EC <sub>50</sub> = 48,8 µg L <sup>-1</sup>                                                                                      | Markich (2021)                   |
| <i>Xenostrobus securis</i>           | ZnCl <sub>2</sub>                    | 48 h          | 12 concentrations             | EC <sub>50</sub> = 61,6 µg L <sup>-1</sup>                                                                                      | Markich (2021)                   |
| <i>Scaechlamys livida</i>            | ZnCl <sub>2</sub>                    | 48 h          | 12 concentrations             | EC <sub>50</sub> = 65,4 µg L <sup>-1</sup>                                                                                      | Markich (2021)                   |
| <i>Anadara trapezia</i>              | ZnCl <sub>2</sub>                    | 48 h          | 12 concentrations             | EC <sub>50</sub> = 83,9 µg L <sup>-1</sup>                                                                                      | Markich (2021)                   |
| <i>Fulvia tenuicostata</i>           | ZnCl <sub>2</sub>                    | 48 h          | 12 concentrations             | EC <sub>50</sub> = 104 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Markich (2021)                   |
| <i>Hiatula alba</i>                  | ZnCl <sub>2</sub>                    | 48 h          | 12 concentrations             | EC <sub>50</sub> = 124 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Markich (2021)                   |
| <i>Barnea australasiae</i>           | ZnCl <sub>2</sub>                    | 48 h          | 12 concentrations             | EC <sub>50</sub> = 152 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Markich (2021)                   |
| <i>Spisula trigonella</i>            | ZnCl <sub>2</sub>                    | 48 h          | 12 concentrations             | EC <sub>50</sub> = 172 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Markich (2021)                   |
| <i>Irus crenatus</i>                 | ZnCl <sub>2</sub>                    | 48 h          | 12 concentrations             | EC <sub>50</sub> = 190 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Markich (2021)                   |
| <i>Paragrapsus quadridentatus</i>    | ZnCl <sub>2</sub>                    | 96 h          | 800-2900 µg L <sup>-1</sup>   | EC <sub>50</sub> = 1230 µg L <sup>-1</sup>                                                                                      | Ahsanullah et al. (1978)         |
| <i>Cancer magister</i>               | ZnSO <sub>4</sub>                    | 96 h          | X                             | EC <sub>50</sub> = 456 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Martin et al. (1981)             |
| <i>Rhithropanopeus harrisi</i>       | Zn <sup>2+</sup>                     | 16 jours      | 0-50 µg L <sup>-1</sup>       | Delayed larval development à 50 µg L <sup>-1</sup>                                                                              | Benijts-Claus and Benijts (1975) |
| <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | ZnSO <sub>4</sub>                    | 72 h          | 83-1374 µg L <sup>-1</sup>    | EC <sub>50</sub> = 151 µg L <sup>-1</sup>                                                                                       | Nadella et al. (2013)            |

### Résultats majeurs

- Nous avons calculé des  $CE_{50}$  de  $193 \mu\text{g L}^{-1}$  pour le chlorure d'Al et de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  pour le chlorure de Zn.
- Pour le mélange des deux métaux sous leur forme chlorure, nous avons observé des effets additifs et synergiques.
- La  $CE_{50}$  de l'anode galvanique est de  $190 \mu\text{g L}^{-1}$  (basé sur la concentration en Al).
- Pour l'anode galvanique, nous avons observé des effets additifs et antagonistes.
- La concentration en Al de  $165 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $CE_{10}$  anode galvanique) ne doit pas être dépassée dans l'environnement pour le bon développement des larves d'huîtres.

## L'ormeau *Haliotis tuberculata*

### Article 3: Effects on growth of juvenile abalones *Haliotis tuberculata* under chronic exposition to metals released from the dissolution of an aluminium-based galvanic anode

Cet article est publié journal  
Archives of Environmental Contamination and Toxicology.



Published: 23 December 2022

#### Effects on Growth of Juvenile Abalones *Haliotis tuberculata* Under Chronic Exposition to Metals Released from the Dissolution of an Aluminium-Based Galvanic Anode

[Laureen Nivelais](#), [Alexandre Levallois](#), [Olivier Basuyaux](#), [Katherine Costil](#), [Jean-Marc Lebel](#), [Solveig Larssonneur](#), [Gwendoline Guichard](#), [Antoine Serpentine](#)  & [Christelle Caplat](#)

[Archives of Environmental Contamination and Toxicology](#) **84**, 32–44 (2023) | [Cite this article](#)

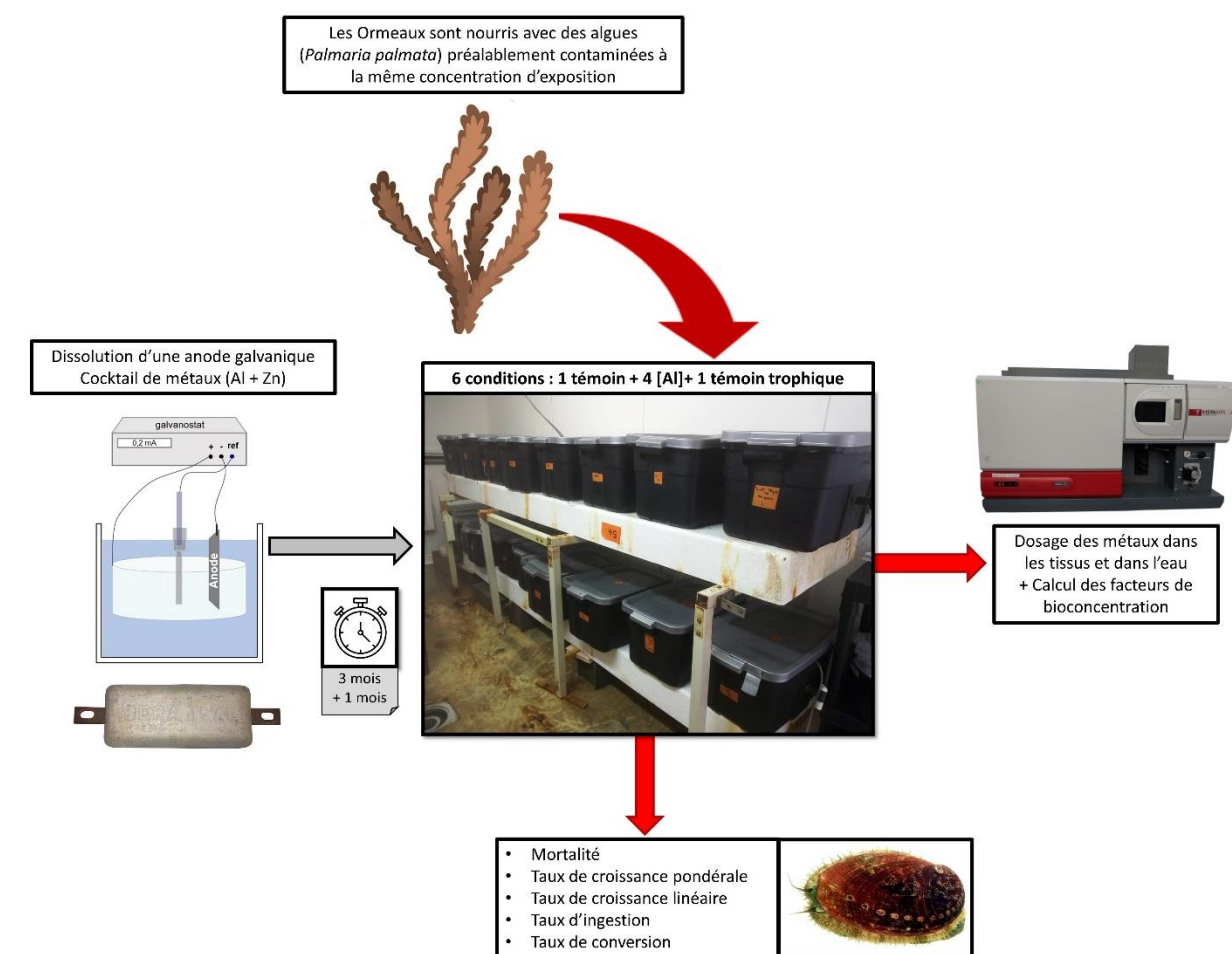
37 Accesses | 2 Altmetric | [Metrics](#)

#### Résumé de la publication

L'objectif de la présente étude était de réaliser une exposition chronique d'ormeaux juvéniles aux métaux issus de la dissolution d'une anode galvanique à base d'aluminium. Par rapport à la première exposition chronique réalisée sur les huîtres, trois paramètres ont changé dans la méthodologie : (i) après trois mois d'exposition les ormeaux ont été placés 1 mois supplémentaire dans une eau non contaminée (phase de décontamination), (ii) une concentration supplémentaire a été testée, (iii) une condition témoin trophique a été mis en place dans laquelle les ormeaux étaient dans une eau non contaminée mais nourris avec des algues, de l'espèce *Palmaria palmata*, préalablement exposées pendant 1 semaine. Au total, 6 conditions ont été testées : un témoin, 4 concentrations croissantes basées sur l'aluminium (75, 165, 495 et 1125  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) et un témoin trophique. Tous les ormeaux ont été marqués individuellement dans l'objectif d'étudier au mieux leur croissance. Toutes les 4 semaines, plusieurs paramètres ont été évalués avec notamment : le poids, la taille, le taux

d'ingestion, le taux de conversion ainsi que les concentrations en métaux dans les tissus. Après 12 semaines d'exposition, nous avons relevé 57 % de mortalité dans la condition la plus extrême. La croissance des ormeaux a été significativement plus faible à partir de la concentration d'aluminium de  $495 \mu\text{g L}^{-1}$ . Pour la plus forte concentration, les taux d'ingestion ont révélé que l'appétit des ormeaux a été affecté négativement. Les calculs du taux de conversion confirment cette tendance, avec une faible efficacité alimentaire considérant le gain de poids par rapport à la quantité d'algue ingérée. Le dosage des métaux dans les tissus des ormeaux a révélé que ces derniers ont d'avantage bioaccumulé l'aluminium comparativement au zinc. Au regard des ormeaux de la condition témoin trophique, l'alimentation n'apparaît pas comme la première source d'entrée des métaux dans l'organisme. Les concentrations qui ont impacté la croissance et la physiologie des ormeaux sont bien supérieures aux concentrations relevées dans l'environnement. Cependant, à partir d'une concentration de  $165 \mu\text{g L}^{-1}$  (du même ordre que les maximums environnementaux en milieu fortement pollué), nous avons relevé un enrichissement significatif dans le tissu des ormeaux. Le pied des ormeaux étant en contact permanent avec les parois du réservoir, les métaux peuvent être adsorbés en quantité par les mollusques. Cette bioconcentration de l'aluminium dans les tissus d'un consommateur primaire comme l'ormeau peut-être une potentielle source pour l'entrée du métal dans les réseaux trophiques. Des phénomènes de dépigmentation ont également été observés sur le pied de certains ormeaux exposés aux plus fortes concentrations. Des observations similaires ont déjà été rapportées dans la littérature chez d'autres organismes aquatiques dans le cas d'expositions au zinc ou au cadmium. Dans l'environnement, une telle dépigmentation peut affecter le camouflage de l'ormeau, entraînant une augmentation de la pression de prédation car un individu affecté serait alors plus visible pour les prédateurs. En parallèle de cette étude, nous avons exposé des ormeaux adultes sur lesquelles nous avons étudié les mêmes paramètres physiologiques que chez l'huître creuse. Les résultats de cette deuxième étude sont valorisés dans l'article 4.

## Récapitulatif du protocole expérimental



|                          |                                                     | T0                                                                  | T 4 semaines | T 8 semaines | T 12 semaines | T 16 semaines (phase de décontamination) |
|--------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|--------------|--------------|---------------|------------------------------------------|
|                          |                                                     | 31/03/21                                                            | 28/04/21     | 26/05/21     | 23/06/21      | 21/07/21                                 |
| Biomarqueurs individuels | Mortalité                                           | Vérifiée quotidiennement sur l'ensemble de la durée de l'exposition |              |              |               |                                          |
|                          | Taux de croissance pondérale                        | n = 15                                                              | n = 15       | n = 15       | n = 15        | n = 15                                   |
|                          | Taux de croissance linéaire                         | n = 15                                                              | n = 15       | n = 15       | n = 15        | n = 15                                   |
|                          | Taux d'ingestion                                    | n = 15                                                              | n = 15       | n = 15       | n = 15        | n = 15                                   |
|                          | Taux de conversion                                  | n = 15                                                              | n = 15       | n = 15       | n = 15        | n = 15                                   |
| Bioaccumulation          | Concentrations en métaux dans les différents tissus | n = 15                                                              | n = 15       | n = 15       | n = 15        | n = 15                                   |
|                          | Facteur de bioconcentration                         | n = 15                                                              | n = 15       | n = 15       | n = 15        | n = 15                                   |

**Effects on growth of juvenile abalones *Haliotis tuberculata* under chronic exposition to metals released from the dissolution of an aluminium-based galvanic anode**

Laureen Nivelais<sup>2a</sup>, Alexandre Levallois<sup>1a</sup>, Olivier Basuyaux<sup>2</sup>, Katherine Costil<sup>1</sup>, Jean-Marc Lebel<sup>1</sup>, Solveig Larssonneur<sup>2</sup>, Gwendoline Guichard<sup>2</sup>, Antoine Serpentine<sup>1</sup>, Christelle Caplat<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA) Université de Caen Normandie UNICAEN, Sorbonne Université, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UA, CNRS 8067, IRD, Esplanade de la paix, F-14032 Caen.*

<sup>2</sup> *Synergie Mer et littoral (SMEL), Zac de Blainville, F-50560 Blainville-sur-Mer.*

<sup>a</sup> These authors contributed equally to the work

**Abstract:**

In the marine environment, the galvanic anode cathodic protection system (GACP) undergoes oxidation and releases metals in the forms of ions or oxy-hydroxides into the environment. The objective of the present study was to investigate the toxicity of a cocktail of metals released from the dissolution of an aluminium-based galvanic anode (~95% Al, ~5% Zn) on the abalone *Haliotis tuberculata*. Juveniles were exposed for 16 weeks (i.e. 12 weeks of exposure and 4 weeks of decontamination phase) and their growth, intake rate, conversion rate and metallic concentrations were monitored. A total of 6 conditions were tested: a control, 4 concentrations based on Al and a trophic control. Results showed that the mortality reached 57% for individuals exposed to 1125 µg L<sup>-1</sup> of Al, and the abalone growth significantly decreased for an Al concentration greater than 495 µg L<sup>-1</sup>. At the highest exposure concentration, intake rate measurements revealed that the appetite of abalones was affected, supported by the large increase of the conversion rate which was indicative of a poor feed efficiency. The monitoring of metallic concentrations showed that *H. tuberculata* strongly bioconcentrated Al relative to zinc. The diet did not appear to be the primary pathway for metal entry. Concentrations that significantly impacted abalone growth and survival during the experiment were higher than those found in natural environment, but the bioconcentration of Al into the tissues of a primary consumer such as abalone may be a potential pathway for Al to enter food webs.

**Keywords:** galvanic anode, aluminium, *Haliotis tuberculata*, abalone, bioaccumulation

## 1. Introduction

Marine ecosystems, and particularly coastal and estuarine environments, are under pressure due to human activities. Since the beginning of the industrial period, the coastline anthropisation has dramatically accelerated, generating inputs of diverse substances such as metals, directly or indirectly

into environment. The seawater is a highly corrosive environment and it is common to apply corrosion protection systems on immersed metal structures such as cathodic protection by impressed current (ICCP) or by galvanic anodes (GACP). These latest are preferred for several reasons including an easy installation and less maintenance (Roche, 2015; Roy, 1968). The GACP consists of controlling the corrosion of a metal surface by means of an anode, of which electrochemical potential is lower than that of the structure to be protected (Guibert, 2009). The anodes are metallic alloys composed in majority by one metal, aluminium (Al) or zinc (Zn) and trace concentrations of other elements. Al is preferred over Zn, due to its high current capacity, low specific weight as well as a high thermal and electrical conductivity and the use of aluminium-based galvanic anodes for cathodic protection of metal structures has been practiced since the early 1960s (Roy, 1968; Shibli et al., 2007). Reactions of oxidation occur with the dissolution of the anodes and induce the release in seawaters of the metals that compose them. Throughout their lifetime, the anodes thus contribute to the release of Al and Zn but also toxicologically important trace elements such as cadmium and lead (Reese et al., 2020). If anodes are usually installed on all types of immersed metal structures (boat hulls and in harbors), their contribution to an enrichment of metals in the marine environment was extended to the growing settlements of offshore wind farms. If we consider a wind farm offshore of about 75 wind turbines, aluminium-based galvanic anodes can represent a mass of about 15 tons per foundation, which corresponds to an estimated transfer of metals into water of  $105 \text{ kg day}^{-1}$  or around 45 tons of Al and 2 tons of Zn per year (Kirchgeorg et al., 2018).

Overall, the contribution of aluminium-based galvanic anodes to metal concentrations in marine waters has been reported to be limited to confined areas presenting low hydrodynamic conditions and low depths, where aggregation of corrosion products were observed in surface of sediments located only at proximity of the anodes (Caplat et al., 2020; Deborde et al., 2015). In these particular conditions, it has been shown that the sediments were more enriched by Zn than Al (Caplat et al., 2020). This result contrasts with the abundance of Al in the anode composition and may suggest a potentially toxic effect on benthic organisms in relation to the fate of Zn released from the aluminium-based galvanic anodes.

If some studies related the Al effect on some marine organisms (Gillmore et al., 2016; Golding et al., 2015; Harford et al., 2011), authors focused on the acute toxicity of Al with bioassays performed from Al salt solutions (often Al chloride). Recently, Bell et al (2020) investigated the effect of galvanic anodes during acute exposures on an amphipod species, *Corophium volutator*, a diatom, *Phaeodactylum tricornutum*, and a bacterium, *Aliivibrio fischeri*, but without considering the dissolution of the anode from the electrochemical reactions involved in real conditions. Further research is thus needed to assess the chronic impact of galvanic anodes on marine organisms.



The main objective of our study was to examine in conditions closed to *in situ*, the chronic toxicity of metals released from an aluminium-based galvanic anode on juvenile abalone, *Haliotis tuberculata* (Linnaeus, 1758). The abalone is a grazing gastropod that feeds on various macroalgae and preferentially on the red alga *Palmaria palmata*. Besides their ecological importance as primary consumers, abalones are economically important since they are widely consumed in Asian countries, and among the most studied models as marine gastropods in ecotoxicological studies (Bryan et al., 1977; Huang et al., 2010; Liu et al., 2011; Minguez et al., 2014; Mottin et al., 2010). Several studies have already investigated the bioaccumulation of metals by abalone which appears to be a sensitive organism (Guo et al., 1998; Huang et al., 2010; Skinner et al., 2004; Torres et al., 2020), but none has ever considered the bioaccumulation of aluminium, leading to the choice of *Haliotis tuberculata* for this experiment. Juvenile abalones (around 1 year for  $20.2 \pm 0.1$  mm) were exposed for 12 weeks to 6 experimental conditions using an electrochemical device reproducing the dissolution of an aluminium-based galvanic anode in a marine environment. The 6 conditions tested were: a control, a trophic control (non-contaminated water + contaminated algae), and 4 increasing concentrations of aluminium-based galvanic anode degradation products. After 12 weeks of exposure, all the surviving individuals were exposed for a further 4 weeks in natural seawater for a decontamination phase. Every 4 weeks, ingestion rate is calculated, and the abalone were measured and weighed in order to calculate several indices such as growth rate and conversion rate. Finally, the bioaccumulation of the different metals constituting the galvanic anode was measured in the whole tissues of abalones but also in algae used to feed the abalones in order to study the involvement of feed in the bioaccumulation processes.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Biological materials

The abalone, *Haliotis tuberculata*

The experiment was performed on abalones from the France Haliotis farm located in Plouguerneau (Brittany, France). They averaged  $20.2 \pm 0.1$  mm in shell length (around 1 year). After an acclimatization period of 7 weeks, the 630 abalones were separated into groups of 35 individuals homogeneous in size (ANOVA,  $p > 0.05$ ), each group placed in 20 L tanks for 16 weeks (12 weeks of exposure and 4 weeks of decontamination phase). In order to carry out growth measurements, abalones were individually marked with varnish on the shell (circular mark) after being dried. The animals were fed once a week with the red alga *Palmaria palmata*. Five ingestion control tanks containing water and contaminated algae at different concentrations were also used to determine the amount of naturally degraded algae in an abalone-free environment.

The red algae, *Palmaria palmata*

The algae for the abalone feed were harvested along the west coast of Cotentin (Normandy, France) every month. The algae were conditioned for one week in separate tanks of 250 L with the same metallic concentrations as the abalone exposure tanks before being distributed to animals (70 g/abalone tank). Abalones of the trophic control, which were in uncontaminated water, were fed with algae exposed to condition C2 (described below). A quantity of algae ( $28 \pm 8$  g) was collected every month to monitor metallic concentrations in *Palmaria palmata*.

## 2.2. Experimental device

All experiments were realized at Blainville-sur-mer (west coast of Normandy, France) in the experimental center « Synergie mer et littoral » (SMEL), in a thermoregulated room (16°C) with a supply of natural sea water passed through a sand filter.

A total of 6 seawater conditions based on total Al concentration determination were tested: control (C), trophic control (TC),  $74.7 \pm 5.7 \mu\text{g L}^{-1}$  (C1),  $165.5 \pm 11.3 \mu\text{g L}^{-1}$  (C2),  $494.9 \pm 51.3 \mu\text{g L}^{-1}$  (C3) and  $1124.5 \pm 205.0 \mu\text{g L}^{-1}$  (C4) each in triplicate, leading to a total of 18 tanks. We targeted these concentrations because the lowest was near from concentrations measured in polluted sites and the others allowed the study of effects on organisms. All tanks were equipped with a bubbling system and the water was renewed 3 times a week by siphoning. Physicochemical parameters were daily controlled and remained stable between the different conditions throughout the experiment: temperature of  $16.4 \pm 0.05$  °C, salinity of  $34.0 \pm 0.1$  ‰, and pH of  $8.00 \pm 0.02$ .

## 2.3. Electrochemical device

An electrochemical experimental device with natural seawater was settled to simulate the dissolution of an aluminium-based galvanic anode (GACP) in order to obtain a transfer of metals with the same chemical speciation as in the marine environment. The device was equipped with a saturated calomel electrode (SCE), a platinum-titanium alloy counter electrode (CE) and an Al anode (Al Bera15, Bac Corrosion® Control) immersed in a single tank. The assembly was electrically connected to a galvanostat (Amel, 2049 model) as already described in other publications (Caplat et al., 2010). The water was agitated by an air diffuser. The galvanic anode was composed of seven elements (Al, Zn, Fe, Si, In, Mn and Cu) with the mass percentages of each metal given by the supplier: 93.2 % to 97.1 % for Al, 2.5 % to 6.5 % for Zn, 0.13 % max for Fe, 0.1 % max for Si, 0.01 % to 0.03 % for In, 0.01 % max and 0.006 % max for Mn and Cu, respectively. In order to accelerate the dissolution of the anode, it was submitted to a controlled electric current of 200 mA over a period of 22 hours. The operating time of the galvanostat was controlled by a programmer.

Each day, every 20 L tanks were emptied, rinsed and filled with natural seawater contaminated by the stock solution. After 22 hours, the seawater solution was collected at a high concentration of anode degradation products ( $[Al] = 7,624 \pm 656 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $[Zn] = 357 \pm 36 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Dilutions were made with seawater 3 times a week in the different exposure tanks to reach the target concentrations.

## 2.4. Measures of metallic concentrations in water and in biota

Every week, seawater samples were collected to monitor the total concentrations of Al and Zn by atomic absorption spectrometry (AAS). Al was analyzed by a Zeeman Atomic Absorption Spectrometer Z-AAS (AA240Z – Varian) equipped with a graphite tube atomizer (FTA 120, Varian) and a programmable sample dispenser (PSD 120, Varian). Analyzes were performed with a matrix modifier solution ( $2 \text{ g L}^{-1}$  of  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ) and a temperature program developed for the seawater matrix. Each digested sample was analyzed 4 times, and the mean of values was used for evaluation. Zn was analysed by atomic absorption spectrometry in an air–acetylene flame (F-AAS, Varian AA240F). Non-specific absorptions were corrected with a deuterium lamp. Each sample was analyzed in triplicate, and mean values were used for evaluation. The limit of detection (DL) was defined as three times standard deviation (SD) of blank analyses. A DL of  $3.1 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $n = 30$ ) and of  $6.6 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $n = 45$ ) were given for Zn and Al, respectively.

Five abalones were collected in each tank (3 x 5 individuals per condition of concentration) to monitor metallic concentrations in all tissues at T0, 4 weeks, 8 weeks, 12 weeks and 16 weeks. The total visceral mass was weighed and then placed in an oven at  $80^\circ\text{C}$  to dehydrate the samples. Algae were also analysed to monitor metallic concentrations. Once removed from the contaminated water, the algae were rinsed with natural uncontaminated seawater before being placed in the incubator at  $80^\circ\text{C}$  for dehydration. Samples were then crushed with Teflon balls and mineralized using a microwave digestion technique. Around  $0.2000 \pm 0.0010 \text{ g}$  of tissues were exactly weighed and transferred to Teflon Microwave bomb containing 10 mL of nitric acid (69% VWR - AnalR NORMAPUR) and placed in a microwave oven (Berghof®, MWS-2) under controlled temperature and power ( $200^\circ\text{C}$ , 1000 W). The digested solution was transferred to labelled bottles adding ultrapure water to 50 mL final volume and stored at  $4^\circ\text{C}$  up to metal analyses. Total concentrations of several elements (Al, Ag, As, Ca, Cd, Cu, Fe, In, K, Mg, Mn, Ni, Pb and Zn) were measured by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES, Vista MPX, Agilent Technologies Santa Clara, USA). Results were expressed in  $\mu\text{g L}^{-1}$  for seawaters and in  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight (dw) for abalones and algae. To assess the quality of the biota treatment procedure, a standard reference material SRM NIST-1566b oyster's tissue (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) was analyzed at the same time as samples. The relative errors were less than 10% for all metal concentrations recorded in both standard reference materials, excepted for Pb and Al concentrations which were ranged between 10% and 40%.

Bioconcentration factors (BCFs) were used to assess the capacity of organisms to accumulate Al and Zn taking into consideration all pathways as contaminated water and food (Adams et al., 2000). BCFs were calculated as the following ratio:

$$BCF = \frac{\text{metal concentration in the organism (mg kg}^{-1}\text{fw)}}{\text{metal concentration in water (mg L}^{-1}\text{)}}$$

The metal concentration in abalones in fresh weight (fw) was calculated from the average water content of the abalones. For the algae, BCFs have been calculated from the average metal concentration of all algae used during the experimentation.

Biomagnification factors (BMFs) were used to assess the transfer of Al and Zn from algae to abalones (Gray, 2002). BMFs were calculated as the following ratio:

$$BMF = \frac{\text{metal concentration in abalones (mg kg}^{-1}\text{fw)}}{\text{metal concentration in algae (mg kg}^{-1}\text{fw)}}$$

The metal concentration in abalones and algae in fresh weight (fw) was calculated from the average water content of the abalones and algae.

## 2.5. Mortality and growth assessment

The health status of abalones was daily checked to remove dead individuals and calculate mortality rates.  $TL_{50}$ , time at which mortality reaches 50%, have been calculated from cumulated mortality according time. When cumulated mortality reached 50%, the number of weeks was recorded to determine the  $TL_{50}$ .

At each study date, all the individuals were dried with paper towel and then weighed (to the nearest 0.01 g) and measured (to the nearest 0.01 mm). These data were used to calculate the growth of abalones through the weight growth rate (WGR in %  $d^{-1}$ ) and the linear growth of the shell (LG in mm  $d^{-1}$ ) determined as follows:

$$WGR = \left( \left( \frac{fW}{iW} \right)^{\frac{1}{t}} - 1 \right) \times 100$$

$$LG = \frac{fL - iL}{t}$$

With  $iW$  = initial weight (g),  $fW$  = final weight (g),  $iL$  = initial length (mm),  $fL$  = final length (mm),  $t$  = duration of experimentation (days).

## 2.6. Intake rate and conversion rate assessment

Every week, the remaining algae from each tank was collected in a sieve, drained with a salad spinner and weighed. The intake rate (IR in g of feed.  $ind^{-1}day^{-1}$ ), and the conversion rate (CR in g of

feed intake. g of fresh weight increase<sup>-1</sup>) were calculated after the 12 weeks of experimentation as follows:

$$IR = \frac{(iW - fW) - Td}{n \times t}$$

$$CR = \frac{(iW - fW) - Td}{g}$$

With iW = the total weight of initial algae supplied (in g), fW = the final weight of algae remaining in the tanks (in g), Td = the total weight of algae degraded in the ingestion controls (in g), n = the number of individuals considered over the 12 weeks, t = the duration of the experiment (in days) and g = The average weight increase of abalone between T0 and the 12<sup>th</sup> week (in g).

## 2.7. Statistical analyses

Statistical analyses were carried out with R studio software version 3.6.3. The normality of the data was tested with the Shapiro-Wilk test and the homogeneity of variances with a Bartlett test. In the case where the data verified these hypotheses, an analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey post-hoc test was performed to compare the parameters. If the data did not follow a normal distribution and/or homoscedasticity, a non-parametric Kruskal-Wallis (KW) test followed by Dunn's test was used. Differences were considered significant at p-value < 0.05. All results were presented as mean ± SEM (Standard Error of the Mean). In order to calculate various EC<sub>x</sub> values, we realised non-linear regressions (using the Hill equation) through the Excel® macro REGTOX (Vindimian, 2012). For each dose response curve, the EC<sub>10</sub>, EC<sub>20</sub>, and EC<sub>50</sub> of weight growth rate and linear growth were calculated using the Al concentrations measured in the water during the exposure and Al concentrations measured in abalones' tissues after 12 weeks of exposure.

## 3. Results

### 3.1. Metallic concentrations in waters and abalones and bioconcentration factors

The mean of Al and Zn concentrations effectively measured in seawaters exposed to Al-based anode and prepared in the 5 conditions of tanks are presented in Table XII.

Table XII : Aluminium and zinc concentrations measured in water ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{SEM}$ ) during the exposure period for the different conditions.

| Conditions<br>( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | Control        | C1             | C2               | C3               | C4                 |
|----------------------------------------|----------------|----------------|------------------|------------------|--------------------|
| Aluminium                              | $10.1 \pm 3.0$ | $74.7 \pm 5.7$ | $165.5 \pm 11.3$ | $494.9 \pm 51.3$ | $1124.5 \pm 205.0$ |
| Zinc                                   | $11.2 \pm 0.6$ | $14.2 \pm 0.6$ | $16.4 \pm 0.8$   | $26.5 \pm 2.5$   | $46.9 \pm 8.8$     |

Before the start of exposure, the basal value of Al content in abalone was  $33.7 \pm 4.1 \text{ mg kg}^{-1}$  dw and that of Zn about  $195.3 \pm 29.8 \text{ mg kg}^{-1}$  dw (Figure 36). As soon as 4 weeks, the results showed a clear increase in the average amount of Al recorded accumulated in abalone tissues in relation to the different concentrations (Figure 36A). Indeed, it was 48 times higher in condition C4 ( $2,390.4 \pm 211.2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) than in the control ( $49.9 \pm 13.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) after 4 weeks of exposure (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Moreover, it can also be noticed that abalone from the TC condition ( $164.2 \pm 39.1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) incorporated significantly more Al into their tissues compared to those from the control condition (ANOVA,  $p < 0.05$ ). During the decontamination phase, the Al level significantly decreased in tissues of abalones exposed to all conditions; this decrease reached 85% for the C3 concentration. In the same time, the Zn concentrations (Figure 36B) varied considerably less than the Al concentration throughout the exposure. Before the depuration period (12 weeks), only the abalones exposed to condition C3 and C4 showed a significantly higher Zn concentration compared to the control (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

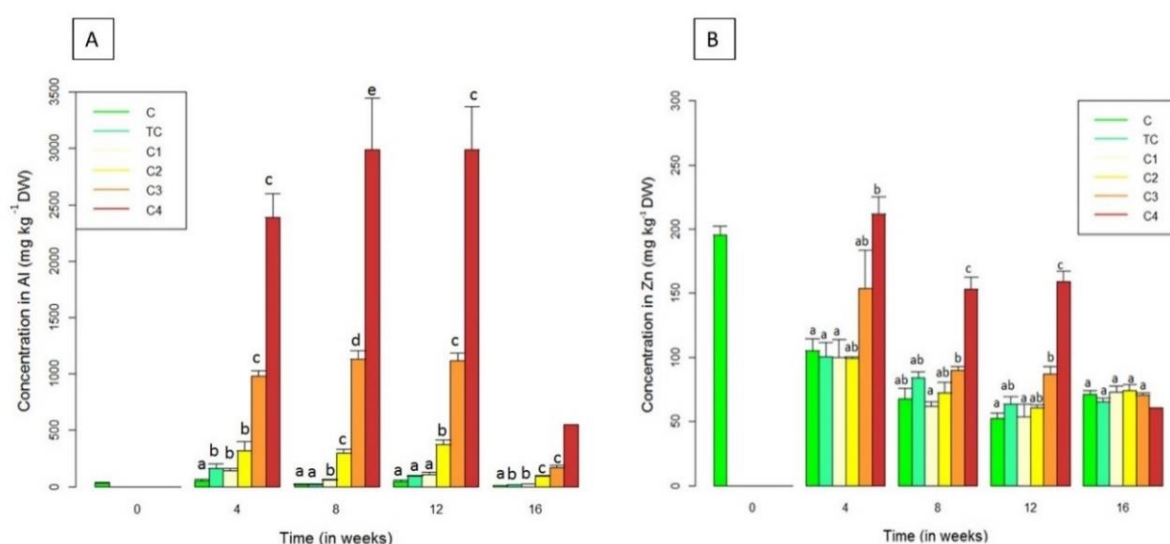


Figure 36 : Concentrations of aluminium (A) and zinc (B) in abalones for the 12 weeks of exposure and 4 weeks of decontamination under the 6 experimental conditions. Metals levels are expressed as  $\text{mg kg}^{-1}$  of flesh (mean values  $\pm \text{SEM}$ ,  $n=3$ ). The significance of data is presented for each date compared to the control. For each time exposure, a letter common to two conditions indicates that there is no significant difference between them.

Figure 37 shows the evolution of BCF values related to Al and Zn over time under the different experimental conditions. At the start of the exposure, the Al BCF was  $902 \pm 109$ . At 4 weeks, Al concentration in water was below the limit of detection for the abalones under control and TC conditions, as the result BCF could not be calculated. Few differences were found between the different conditions, except during the decontamination period when BCF increased significantly from  $164 \pm 41$  for the control to  $2,462 \pm 230$  for C3 condition. Between the 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> week, there was a significant increase for BCF value of TC condition (ANOVA,  $p < 0.05$ ), other values remained stable over time (ANOVA,  $p > 0.05$ ). For Zn, at the start of the exposure, the bioconcentration factor was  $5,223 \pm 18$ . During the 4<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> week, BCF values of animals under C and TC conditions were significantly higher than values recorded for C4 condition. Throughout the exposure, BCFs values significantly decreased by 50 % for the control and by 45 % for C1. During the decontamination period, there was no significant difference between conditions (ANOVA,  $p > 0.05$ ). Supplementary data 6 summarises the specific concentrations and BCFs of Al and Zn in abalones during exposure.

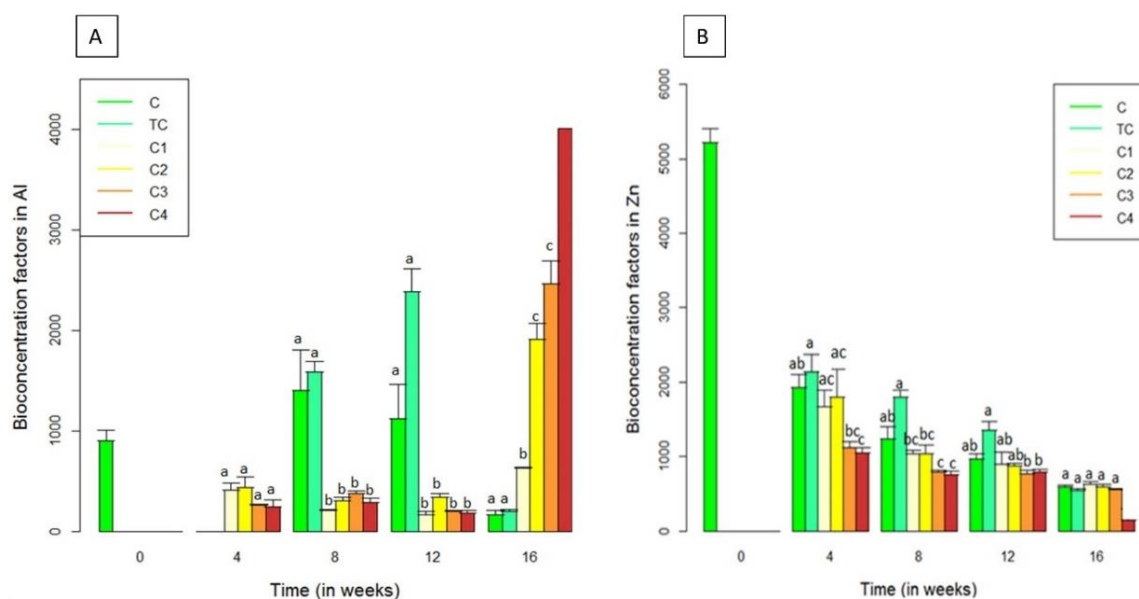


Figure 37 : Bioconcentration factors of aluminium (A) and zinc (B) in abalones for the 16 weeks of exposure (12 weeks of exposure and 4 weeks of decontamination) under the 6 experimental conditions (mean values  $\pm$  SEM,  $n=3$ ). The significance of data is presented for each date compared to the control. For each time exposure, a letter common to two conditions indicates that there is no significant difference between them.

Except for Zn and Al, the concentrations of the other elements analyzed in abalones (i.e. Ag, As, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, Pb) did not show significant variations (ANOVA,  $p > 0.05$ ). The biomagnification factor (BMF) of Al and Zn in the trophic control condition was also calculated in abalones using the metal content in the algae. After 8 weeks of exposure, BMF for Al was  $0.17 \pm 0.04$  for the control,  $0.13 \pm 0.01$  for the trophic control and  $2.17 \pm 0.18$  for the C4 condition (KW,  $p < 0.05$ ). Concerning Zn, after 8 weeks of exposure, BMF did not show significant differences (KW,  $p > 0.05$ ).

### 3.2. Metallic concentrations in *Palmaria palmata*

The concentration for Al and Zn and BCFs in the algae *Palmaria palmata* under the 6 experimental conditions after two weeks of exposure are presented in supplementary data 7. Al concentrations in algae significantly increased from  $310.6 \pm 54.7 \text{ mg kg}^{-1}$  for the control to  $2,281 \pm 372 \text{ mg kg}^{-1}$  for C3 condition (KW,  $p < 0.05$ ). In the same time, Zn concentrations in the algae significantly increased from C3 ( $156.8 \pm 25.6 \text{ mg kg}^{-1}$ ) compared to the control ( $39.6 \pm 1.6 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

### 3.3. Mortality rates

After 12 weeks of exposure, mortality rate for the C4 condition was significantly different from other conditions and reached 57 %. The values allow to establish a  $TL_{50}$  of 11.5 weeks. For other conditions, mortality rate averaged 3%.

### 3.4. Growth, intake rate and conversion rate

The concentration of the anode degradation products significantly influenced the weight growth (WGR) and the linear growth (LG) (ANOVA,  $p < 0.05$ ) after 12 weeks of the experiment (Figure 38A and 38B). In both cases, the values decreased when concentrations increased. The WGR decreased by 33% between the control and C3, from  $1.26 \pm 0.03 \text{ \%j}^{-1}$  to  $0.85 \pm 0.06 \text{ \%j}^{-1}$  whereas for condition C4, the weight growth rate decreased by 80%, from  $1.26 \pm 0.03 \text{ \%j}^{-1}$  to  $0.26 \pm 0.14 \text{ \%j}^{-1}$ . Regarding the LG, effects were also significant from concentration C3 onwards with a 30% decrease observed compared to the control, and a 70% drop for concentration C4. For the trophic control, we did not observe a significant difference in abalones' growth (ANOVA,  $p > 0.05$ ).  $EC_{50}$  of WGR and LG were evaluated to  $1,690.7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  and  $2,007.6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  respectively based on Al concentrations in water (Table XIII). On the other hand, the  $EC_{50}$  were respectively about  $702.6 \text{ mg kg}^{-1}$  and  $762.7 \text{ mg kg}^{-1}$  based on Al concentrations in abalones' tissues.

Table XIII : Ecotoxicological parameters of the weight growth rate and the linear growth calculated in juveniles *H. tuberculata* using the Al concentrations measured in the water during the exposure and Al concentrations measured in abalones' tissues after 12 weeks of exposure.  $EC_x$  = effective concentration (in  $\mu\text{g L}^{-1}$  or in  $\text{mg kg}^{-1}$ ) which induced an effect of X% on the population (10- 50%).

|           | Al concentration in water ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) |               | Al concentration in abalone ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) |               |
|-----------|----------------------------------------------------|---------------|-----------------------------------------------------|---------------|
|           | Weight growth rate                                 | Linear growth | Weight growth rate                                  | Linear growth |
| $EC_{10}$ | 309.8                                              | 217.7         | 167.3                                               | 103.7         |
| $EC_{20}$ | 442.8                                              | 494.2         | 284.1                                               | 216.6         |
| $EC_{50}$ | 1690.7                                             | 2007.6        | 702.6                                               | 762.7         |



The intake rate (IR) and conversion rate (CR) significantly varied according to the concentrations tested (Figure 38C and 38D). The IR decreased with increasing concentrations; it was about  $0.16 \pm 0.01$  g of feed. ind<sup>-1</sup>day<sup>-1</sup> for the control,  $0.12 \pm 0.01$  g of feed. ind<sup>-1</sup>day<sup>-1</sup> for the C3 condition and  $0.08 \pm 0.001$  g of feed. ind<sup>-1</sup>day<sup>-1</sup> for the C4 condition. On the other hand, the IR for the trophic control was significantly higher, about  $0.16 \pm 0.01$  g of feed. ind<sup>-1</sup>day<sup>-1</sup>. In contrast, the CR increased and reached a value of  $11.1 \pm 1.1$  g of feed intake. g of fresh weight increase<sup>-1</sup> for the C4 condition. There was no significant difference (KW,  $p > 0.05$ ) between the values of the other conditions and the control, which range from  $5.76 \pm 0.03$  to  $7.23 \pm 0.25$  g of feed intake. g of fresh weight increase<sup>-1</sup>.

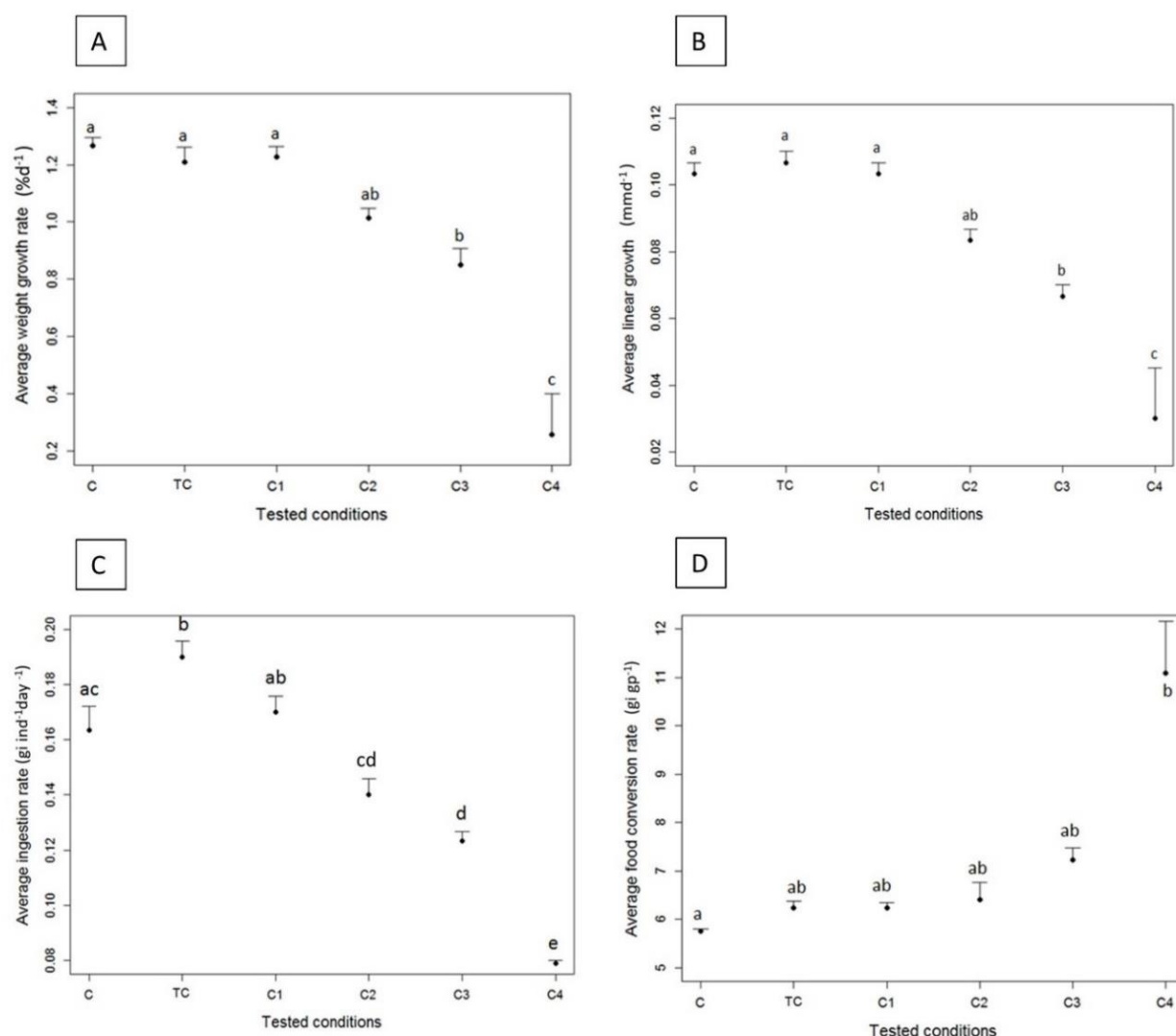


Figure 38 : Evolution of the average weight growth rate (in % d<sup>-1</sup> ± SEM) (A), the average linear growth (in mm d<sup>-1</sup> ± SEM) (B), the average intake rate (IR in g feed intake individual<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) (C), and the average conversion rate (CR in g feed intake<sup>-1</sup> g of fresh weight gain<sup>-1</sup>) (D) of abalones after 12 weeks of exposure according to the experimental conditions. A letter common to two conditions indicates that there is no significant difference between them.

### 3.5. Depigmentation phenomenon

We also observed depigmentation at the foot of some abalone in concentrations C3 and C4. This phenomenon appeared at the end of the contamination phase when some individuals had the middle and the border of the foot completely depigmented (Figure 39).

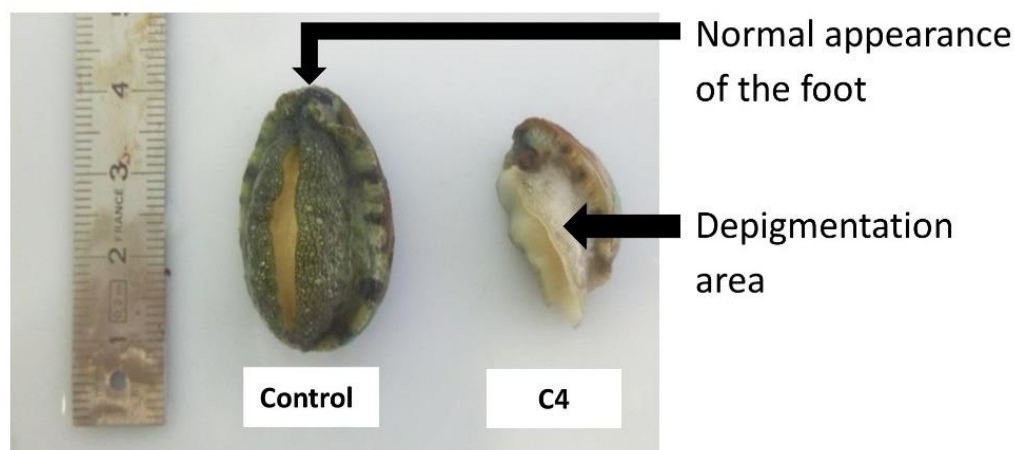


Figure 39 : Depigmentation phenomenon observed in abalones for the C4 condition after 12 weeks of exposure compared to an abalone from the control group.

## 4. Discussion

As shown in previous studies, the toxicity of aluminum salts cannot be extended to the toxicity of aluminum-based galvanic anodes because of the cocktail effect of the metals and the difference in bioavailability of the chemical species to organisms (Caplat et al., 2010). To our knowledge, the present study is the first one to focus on the chronic impact of an aluminium-based galvanic anode on a gastropod, the abalone *H. tuberculata*.

Results of metallic concentration monitoring confirmed that abalones differently assimilated the principal constituents (Al and Zn) of the galvanic anode. A previous study showed that Zn concentrations in the tissues of *H. tuberculata* collected in the English Channel were less variable than those of other metals, particularly in muscles (Bryan et al., 1977). Zn concentration in the foot, viscera and digestive gland varied from 28 to 656 mg kg<sup>-1</sup> depending on the sampling site. Analyses of 12 trace metals in different organs of *Haliotis rubra* from two sites in Victoria, Australia revealed that Al was below the detection limits of the instrumental techniques used which were 1 mg kg<sup>-1</sup> (Skinner et al., 2004). Zn concentrations for wild populations were higher than those measured for cultivated abalones, and ranged from 8 to 13 mg kg<sup>-1</sup> depending on the site. These authors found that copper and Zn concentrations decreased with increasing abalone length. In the present study, metals basal values were higher but that confirmed the Zn/Al ratio in abalone tissues. After only 4 weeks of exposure, our results showed a clear increase in the average concentration of Al in abalone tissues compared to the control individuals, 20 times higher for C3 concentration and 48 times higher for C4 concentration.

From 8 weeks of exposure, Al levels remained almost unchanged, probably suggesting an equilibrium between metal entry and detoxification mechanisms (Gupta and Singh, 2011). Zn concentrations showed a different profile, after 8 weeks of exposure, a decrease in levels of approximately 30% was observed for all conditions suggesting that the abalones had already reached the maximum of Zn concentrations at the beginning of the exposure, and were therefore in the process of detoxification. At the end of the decontamination phase, only Al concentrations in abalone drastically dropped for all exposure conditions, suggesting that abalones were able to depure this metal from their tissues once in an uncontaminated water. Only the C4 concentration, induced a significant mortality rate (57%), indicating that abalones were largely affected by this high concentration after 12 weeks of exposure whereas for the concentrations less than or equal to  $495 \mu\text{g L}^{-1}$  of Al, concentrations significantly higher than those found in the environment, the mortality rate did not exceed 3%. Indeed, in coastal waters, total Al concentrations commonly vary from 0.1 to  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  but in heavily polluted ports much higher concentrations have already been reported as on the Egyptian coast ( $106 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Abdel Ghani, 2015), on the northern coast of Chile ( $132 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Valdés et al., 2011), or in Port Botany ( $151 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Jahan and Strezov, 2017) which is close to our C2 and C1 conditions. Considering that  $\text{EC}_{10}$  and  $\text{EC}_{20}$  as equivalent to No Observed Effect Concentration (NOEC), and Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) (OECD 201, 2006), the most polluted sites would not cause any direct effect on the growth of abalones ( $\text{EC}_{10} = 309.8 \mu\text{g L}^{-1}$  for WGR,  $\text{EC}_{10} = 217.7 \mu\text{g L}^{-1}$  for LG). Nevertheless, it is significant to mention that an extreme concentration of  $1,170 \mu\text{g L}^{-1}$  has already been reported in the port of Yamba in Australia, where the authors found an average concentration as high as  $224 \mu\text{g L}^{-1}$  (Jahan and Strezov, 2017). For such concentration, we can expect significant effects in abalone that are close to what we observed for conditions C3 and C4 in our experimental conditions.

It is important to keep in mind that the degradation of galvanic anodes is a cocktail of metals and it is difficult to determine the origin of the toxicity, which may be attributed to a synergic effect between aluminum and zinc. From this, we can deduce that the tolerance limit of a young abalone to the metals released from the anode is between C3 ( $[\text{Al}] = 495 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{Zn}] = 26.5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and C4 ( $[\text{Al}] = 1124 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $[\text{Zn}] = 46.9 \mu\text{g L}^{-1}$ ) in our experimental conditions.

Bioavailability of Al and therefore its toxicity essentially depends on its chemical speciation (Gagnon and Turcotte, 2007). Al speciation and solubility are dependent on a large range of environmental parameters including pH, temperature, dissolved organic carbon content and the presence of many ligands (Gensemer and Playle, 1999). In the marine environment (pH  $\sim 8$ ), Al speciation is dominated by the soluble aluminate ion  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$  and by the neutral insoluble Al hydroxide  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (Tria et al., 2007). Golding et al. (2015), and Angel et al. (2016) have reported that the solubility of Al depends of its concentration level with a solubility limit of  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  and a solution

which should be dominated by the soluble form  $Al(OH)_4^-$ . Between  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $1,000 \mu\text{g L}^{-1}$  the solution would be divided in dissolved and particulate Al hydroxide ( $Al(OH)_3$ ) and above  $1,000 \mu\text{g L}^{-1}$ , particulate Al would become dominant. Zn could also be found in different forms: divalent ionic ( $Zn^{2+}$ ), hydrated ions ( $Zn(H_2O)^{2+}$ ), Zn complexed by organic ligands (fulvic and humic acids). In the marine environment, approximately 64% of the total release of Zn is recovered as the free ion  $Zn^{2+}$ , 14% is complexed with chloride ( $ZnCl_2$ ), 10% with carbonate ( $ZnCO_3$ ), 6% with hydroxide ( $Zn(OH)_2$ ), 5% with sulfate ( $ZnSO_4$ ) and 1% with bicarbonate ( $ZnHCO_3^+$ ) (Stanley Jr and Byrne, 1990). For a pH of 8.1, the dissolved limit for Zn has been evaluated at  $1,160 \mu\text{g L}^{-1}$  which is slightly higher than the value for the Al (Rousseau et al., 2009).

All organisms naturally accumulate metals without suffering any adverse effects up to a defined level; some elements are essential for biological functions (such as Zn) and are therefore subject to homeostatic regulation (Adams et al., 2000). However, for non-essential metals such as Al, there is not necessarily a regulatory mechanism (McGeer et al., 2003). Zn is an essential trace element for the functioning of many cellular processes, but in excess it is toxic and generates ROS that damage the organism (Boyden et al., 1975; Mottin et al., 2012; Sies, 1986). For a marine organism, a metal can become available by two major ways: dissolved uptake, which requires no energy investment; and the ingestion of particulates associated with food which become available to abalones. Absorption of Al by dissolution in various forms can be effected by different routes including paracellular transport, transcellular transport, active transport, ion channels and adsorptive or receptor-mediated endocytosis (Exley and Mold, 2015). BCF measures the ability of an organism to accumulate an element in its tissues regarding the concentration of that element in the water (McGeer et al., 2003). It is important to take into consideration that in natural aquatic environments, contaminants adsorb more onto suspended organic matter, but low amount of dissolved or suspended organic matter occurring in controlled conditions (in relation to decantation and sand filtration processes), can increase the levels of contaminants to which the organisms are exposed. *H. tuberculata* lives in the low levels of the intertidal zone, in rocky environments where it hides in crevices. Unlike bivalves that feed by filtering and absorbing large volumes of water, the abalone is a macroalgal grazer. This difference in feeding mode may potentially change the mechanisms involved in contaminant entry processes in abalone. It was this initial hypothesis that led this study to add the trophic control (TC) condition by feeding abalone with algae that had assimilated the metals released from aluminium-based galvanic anode. Results were of particular interest as it was found that after 4 weeks of exposure, abalone from the TC condition incorporated significantly more Al than those from the control condition. For Zn, levels of the TC condition were not significantly higher than the control but concentrations ( $63.6 \text{ mg kg}^{-1}$ ) were of the same order as in condition C2 ( $60.4 \text{ mg kg}^{-1}$ ). These results confirm that Al and Zn are equally

incorporated by the trophic pathway. A study in a close species, *Haliotis diversicolor*, showed that under natural conditions, Ag, Cd and Hg (non-essential metals) accumulated more through the diet during an exposure of 3 hours (Huang et al., 2008). Biokinetic measurements of these toxic metals indicated that they were highly assimilated by abalones from ingested macroalgae. These metals also had a higher potential for biomagnification due to their high dietary assimilation. Dietary uptake is the dominant route for these elements but in our study, the dominant contamination pathway for Al appears to be the exposure medium as illustrated by measuring the BMF after 4 weeks of exposure for the trophic control ( $0.12 \pm 0.03$ ) which showed no significant difference from the control ( $0.24 \pm 0.07$ ). In another study, exposure to Zn showed that *Haliotis discus hannai* had a low Zn accumulation potential (Guo et al., 2013). The incoming Zn was mainly deposited in the viscera. Furthermore, the authors did not find any impact on growth at a concentration of  $300 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $\text{ZnCl}_2$ ) but the significant metallothionein induction indicated that this species could efficiently detoxify the bioaccumulated metal (Guo et al., 2013). As a trace essential element, Zn appears to be more incorporated by the diet in the present study as shown by the increase of the BMF after 8 weeks of exposure for the trophic control (BMF of  $3.8 \pm 0.1$ ) compared to the control (BMF of  $3.0 \pm 0.2$ ); despite this increase there was a non-significant increase in Zn concentrations in abalones for the trophic condition compared to the control.

Results of this study show different responses between abalone and the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to the same anode in a previous study (Levallois et al., 2022). First, basal Al concentrations in oysters ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ ) were lower than in abalones ( $33.7 \text{ mg kg}^{-1}$ ) while basal Zn levels in oysters were 3 times higher ( $672 \text{ mg kg}^{-1}$ ) than in abalones ( $195 \text{ mg kg}^{-1}$ ). In the present study, the Al accumulation rate for the C3 concentration was 33 compared to T0 whereas for a similar exposure concentration to C3, it was only about 5,25 for oysters. Regarding Zn, the inverse trend was observed as Zn concentrations were much higher and more gradual in the oyster. The Zn accumulation rate after 3 months of exposure was 4.09 compared to 0.81 in abalones showing that the young gastropod does not bioaccumulate Zn in its tissues at all. Abalones regulated this metal in their tissues, resulting in a Zn concentration decrease over the exposure period for all conditions. On the other hand, it is only during the decontamination phase that the abalone eliminate the Al previously accumulated. However, Al is not completely removed, because the accumulation rate for the C4 concentration at 16 weeks of exposure compared to T0 is still 16.35, which may explain why there is an increase of Al BCF at the end of exposure. This was not the case for oysters, which regulated Al during exposure, as concentrations decreased in the tissues during the entire exposure period without a decontamination phase. These first results of metals accumulation on two mollusc models show different inputs

processes related to the metal, the Pacific oyster preferentially bioconcentrate Zn while abalone preferentially bioconcentrate Al.

Our results of the different parameters reflecting the growth and nutrition of young abalones under control conditions are in agreement with values found in a previous study focusing on the importance of *Palmaria palmata* in the diet of *H. tuberculata* (Basuyaux et al., 2018). As shown in the results, all parameters were significantly affected from 494.9  $\mu\text{g L}^{-1}$  of Al. The drop of the IR from concentration C3 suggests that the appetite of abalones was affected. The slight increase of the IR for the trophic control condition may be the result of a slight hormetic effect. It is common during exposures that some physiological functions are stimulated at low concentrations before dropping drastically at higher concentrations (Calabrese and Baldwin, 2001). This could be related to overcompensation in response to disturbances as have already been shown in several bivalve species during Zn exposure (Sauve et al., 2002). For healthy young abalones, a CR of 6  $\text{gi gp}^{-1}$  is considered to be the standard (Basuyaux, 1997), which is in agreement with our results for the control condition (5.76  $\text{gi gp}^{-1}$ ). A large increase of the CR at the C4 condition (11.1  $\text{gi gp}^{-1}$ ) is indicative of poor feed efficiency. Exposure to the degradation products of galvanic anodes greatly affected the physiology of abalones from C3 concentration. The abalone organism may be under excessive stress due to contamination, involving energy in detoxification processes to the detriment of growth. Decreased appetite and bioavailability of nutrients may also be the origin; once contaminated at high concentrations, algae may be less attractive to abalone. Depigmentation phenomena observed on the foot of some abalone exposed to the highest concentrations, attesting of a strong effect on the physiology of gastropods. Similar phenomena have already been reported in literature, notably in juveniles of *Haliotis rufescens* exposed to supersaturated oxygen, which showed depigmentation, lethargy and swelling of the tissues (Elston, 1983). Depigmentation phenomena have also already been observed in several Indian carp species in response to cadmium and Zn (40  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) alone and in combinations (Rani et al., 2017). As the foot of abalones is in constant contact with the tank walls, metals may be adsorbed in quantity by the molluscs. In the environment, such depigmentation can affect the camouflage of abalone, resulting in increased predation pressure as an affected individual would be more visible to predators.

Even if Al has no biological function, it has already been shown that it can substitute for essential metals in some biochemical processes, as in the case of its complex with ATP and perhaps other nucleotides where  $\text{Al}^{3+}$  can replace  $\text{Mg}^{2+}$  ions; it is also an effective and occasional competitor to  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  (Exley and House, 2011). To our knowledge, very few studies have investigated the biological effects of aluminium-based galvanic anode on marine organisms. No acute toxicity of Al from galvanic anodes was reported on the bacterium *A. fischeri*, low effects on algal growth on

*P. tricornutum* and significant mortalities on the amphipod *C. volutator* were found but at a concentration of  $100 \text{ mg L}^{-1}$  which is not environmentally relevant (Bell et al., 2020). The global conclusions of the authors indicated no direct environmental impact of galvanic anodes on the tested organisms. Considering Al in all its forms, various  $\text{CL}_{50}$  values have been reported in the bibliography:  $3,000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  for the coral *Acropora tenuis* (Negri et al., 2011);  $10 \text{ mg L}^{-1}$  for the copepod *Nitocra spinipes* (Bengtsson, 1978) and  $28 \text{ mg L}^{-1}$  in the sea urchin *Heliocidaris turberculata* (Golding et al., 2015). Nevertheless, it is important to consider that the different chemical species of Al influence its bioavailability and therefore its toxicity for marine organisms, as demonstrated by Caplat et al (2010) who compared the biological effects of Al and Zn released from galvanic anodes to their conventional sulphate salt. The study involved exposed embryos and sperms of the sea urchin, *Paracentrotus lividus*, with developmental abnormalities, fertilization rate and mitotic abnormalities as biomarkers. The results showed that Al and Zn from the dissolution of the galvanic anode were less toxic than sulphate salts. The use of Al salts is consequently not the right solution to assess the ecotoxicological effects of galvanic anodes on marine organisms which is why it is necessary to study the effect of GACP more specifically.

In contrast to Al, Zn is an essential trace element for the regulation of many cellular processes (Watanabe et al., 1997). One of the few studies on zinc-based galvanic anodes indicated that oysters *C. gigas* were sensitive to acute Zn toxicity ( $10.2 \pm 1.2 \text{ mg L}^{-1}$ ), 81.8% of the oysters died at the end of the short-term assay, but the bivalves were only moderately affected by chronic Zn exposure ( $0.53 \pm 0.04 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Mottin et al., 2012). *In vitro* exposure of abalone *H. tuberculata* hemocytes to  $\text{ZnCl}_2$  demonstrated a decrease in cell viability as well as morphological and physiological changes in cells at a concentration of  $6,538 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (Mottin et al., 2010). A study on young abalones of the species *Haliotis discus hannai* concluded that the minimum requirement for dietary Zn was  $16\text{-}18 \text{ mg kg}^{-1}$  from ZnMet against  $35 \text{ mg kg}^{-1}$  from  $\text{ZnSO}_4$  because its bioavailability was lower for juvenile abalone (Tan and Mai, 2001). These concentrations were higher compared to the environmental concentration of Zn. In the present study, the Zn concentration in water reached a maximum of  $47 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ . Referring to the recommendations of Tan and Mail (2001) on a closely related species, the Zn concentrations in the algae fed to abalone in the control condition ( $39 \text{ mg kg}^{-1}$ ) are sufficient for optimal growth. These Zn concentrations increased to  $193 \text{ mg kg}^{-1}$  for the algae in condition C4 indicating that just by feeding, the amount of Zn provided to abalones is much higher than their requirements. Bioconcentration results obtained suggest that Al is more important as a cause of the observed biological effects but the metal cocktail effects should be taken into consideration in further study.

## 5. Conclusion

The uptake by abalone of Al and Zn from the degradation of an aluminium-based galvanic anode is very different. Abalone regulated Zn in their tissues leading to a decrease of the concentrations in their tissues during the exposure period while a clear increase in Al concentrations in abalone tissues was recorded in relation to the different exposure concentrations. Only the highest concentration tested resulted in significant mortality and we did not observe any significant difference between the other conditions more closed to the *in situ* Al concentrations. Results showed a significant decrease in ingestion rate and growth as well as depigmentation phenomena in the abalones from an Al concentration of  $495 \mu\text{g L}^{-1}$  and the  $\text{EC}_{50}$  for weight and linear growth were estimated at  $1,690.7 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $2,007.6 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. In view of the environmental concentrations, the degradation products of aluminium-based galvanic anodes do not appear to present a direct risk to *H. tuberculata*. In order to estimate the global environmental risk of galvanic anodes, it is necessary to consider other species and other stages of development. In a future study, it could be also interesting to focus on older abalones which may be more resistant but some physiological processes (i.e. reproduction) may be affected. Moreover, the literature generally shows that the larval stages of molluscs are more sensitive than juveniles. Growth restriction caused by a contaminant leads to a prolongation of the pelagic life of the larvae and therefore an increase in the risk of predation, disease and dispersal, resulting in reduced population recruitment. In addition, galvanic anodes will be used more and more in the next few years, particularly on offshore wind farms and in port structures. This could modify basal level of metal concentrations (such as Al and Zn) in waters, especially in ports or in closed areas with low water circulation.

### *Acknowledgements*

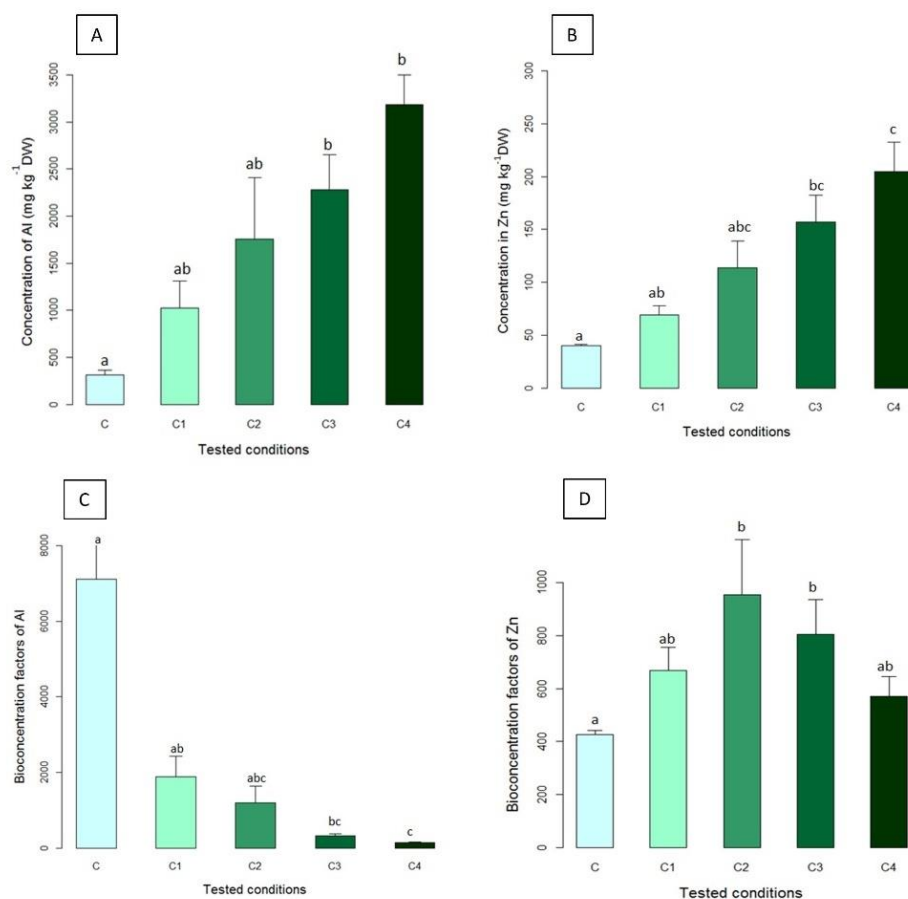
The authors thank the Normandy region and the Seine Normandy water agency (AESN) for their funding.



Supplementary data 6 : Concentrations and bioconcentration factors of aluminium and zinc in abalones for the 16 weeks of exposure under the 6 experimental conditions. Metals levels are expressed as mg kg<sup>-1</sup> of flesh (mean values  $\pm$  SEM, n=3). A letter common to two conditions indicates that there is no significant difference between them. \*Zn was high in abalones at the beginning of the experiment and it was probably brought in from the animals prior to the experiment rather than being a tissue concentration based on control water Zn concentration. This explains why the BCF was very high at T0.

| Exposure conditions                                 |                 | Exposure time (weeks)             |                                 |                                 |                                 |                              |
|-----------------------------------------------------|-----------------|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
|                                                     |                 | 0                                 | 4                               | 8                               | 12                              | 16                           |
| Aluminium in abalones' flesh (mg kg <sup>-1</sup> ) | Control         |                                   | 49.9 $\pm$ 13.3 <sup>a</sup>    | 17.7 $\pm$ 5.0 <sup>a</sup>     | 42.8 $\pm$ 13.0 <sup>a</sup>    | 7.8 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>   |
|                                                     | Trophic control |                                   | 164.2 $\pm$ 39.1 <sup>ab</sup>  | 20.0 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>     | 91.4 $\pm$ 8.4 <sup>a</sup>     | 19.2 $\pm$ 1.7 <sup>ac</sup> |
|                                                     | C1              | 33.7 $\pm$ 4.08 <sup>ac</sup>     | 141.3 $\pm$ 23.1 <sup>ab</sup>  | 59.9 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>     | 103.9 $\pm$ 23.9 <sup>a</sup>   | 27.5 $\pm$ 0.1 <sup>ac</sup> |
|                                                     | C2              |                                   | 320.7 $\pm$ 77.7 <sup>ab</sup>  | 297.0 $\pm$ 36.0 <sup>ac</sup>  | 374.5 $\pm$ 38.1 <sup>ac</sup>  | 91.4 $\pm$ 7.4 <sup>ac</sup> |
|                                                     | C3              |                                   | 980.4 $\pm$ 46.2 <sup>ab</sup>  | 1128.9 $\pm$ 80.0 <sup>ac</sup> | 1115.7 $\pm$ 68.0 <sup>ac</sup> | 171.2 $\pm$ 16 <sup>c</sup>  |
|                                                     | C4              |                                   | 2390.4 $\pm$ 211.2 <sup>b</sup> | 2987.4 $\pm$ 461.1 <sup>c</sup> | 2989.4 $\pm$ 381.3 <sup>c</sup> | 551.3                        |
| BCF Aluminium                                       | Control         |                                   |                                 | 4694 $\pm$ 1339 <sup>ab</sup>   | 3744 $\pm$ 1140 <sup>ab</sup>   | 548 $\pm$ 136 <sup>a</sup>   |
|                                                     | Trophic control |                                   |                                 | 5317 $\pm$ 359 <sup>a</sup>     | 8000 $\pm$ 736 <sup>a</sup>     | 673 $\pm$ 62 <sup>ab</sup>   |
|                                                     | C1              | 3020 $\pm$ 364 <sup>ab</sup>      | 1372 $\pm$ 224 <sup>ac</sup>    | 702 $\pm$ 31 <sup>b</sup>       | 552 $\pm$ 127 <sup>b</sup>      | 2115 $\pm$ 5 <sup>ab</sup>   |
|                                                     | C2              |                                   | 1917 $\pm$ 151 <sup>a</sup>     | 1013 $\pm$ 123 <sup>ab</sup>    | 1123 $\pm$ 114 <sup>ab</sup>    | 6395 $\pm$ 519 <sup>ab</sup> |
|                                                     | C3              |                                   | 872 $\pm$ 41 <sup>c</sup>       | 1252 $\pm$ 89 <sup>ab</sup>     | 660 $\pm$ 40 <sup>ab</sup>      | 8241 $\pm$ 768 <sup>b</sup>  |
|                                                     | C4              |                                   | 683 $\pm$ 60 <sup>c</sup>       | 964 $\pm$ 149 <sup>ab</sup>     | 604 $\pm$ 77 <sup>ab</sup>      | 13434                        |
| Zinc in abalones' flesh (mg kg <sup>-1</sup> )      | Control         |                                   | 104.9 $\pm$ 9.4 <sup>b</sup>    | 67.5 $\pm$ 8.4 <sup>b</sup>     | 52.5 $\pm$ 4.1 <sup>b</sup>     | 71.1 $\pm$ 3.1 <sup>b</sup>  |
|                                                     | Trophic control |                                   | 100.3 $\pm$ 11.2 <sup>b</sup>   | 84.3 $\pm$ 4.4 <sup>b</sup>     | 63.6 $\pm$ 5.5 <sup>bc</sup>    | 65.2 $\pm$ 2.9 <sup>b</sup>  |
|                                                     | C1              | 195,27 $\pm$ 29.75 <sup>a *</sup> | 99.9 $\pm$ 13.7 <sup>b</sup>    | 62.0 $\pm$ 3.1 <sup>b</sup>     | 53.6 $\pm$ 10 <sup>b</sup>      | 72.9 $\pm$ 4.7 <sup>b</sup>  |
|                                                     | C2              |                                   | 99.1 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>     | 72.3 $\pm$ 8.3 <sup>b</sup>     | 60.4 $\pm$ 2.2 <sup>bc</sup>    | 74.2 $\pm$ 4.8 <sup>b</sup>  |
|                                                     | C3              |                                   | 127.2 $\pm$ 8.6 <sup>b</sup>    | 90.1 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>     | 86.9 $\pm$ 5.7 <sup>c</sup>     | 70.8 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>  |
|                                                     | C4              |                                   | 211.9 $\pm$ 13.3 <sup>a</sup>   | 153.1 $\pm$ 9.6 <sup>c</sup>    | 158.8 $\pm$ 8.2 <sup>d</sup>    | 60.5                         |
| BCF Zinc                                            | Control         |                                   | 6465 $\pm$ 581 <sup>bc</sup>    | 4158 $\pm$ 516 <sup>b</sup>     | 3235 $\pm$ 254 <sup>bc</sup>    | 1978 $\pm$ 85 <sup>b</sup>   |
|                                                     | Trophic control |                                   | 7149 $\pm$ 797 <sup>b</sup>     | 6008 $\pm$ 313 <sup>c</sup>     | 4536 $\pm$ 397 <sup>b</sup>     | 1838 $\pm$ 81 <sup>b</sup>   |
|                                                     | C1              | 17848 $\pm$ 620 <sup>a *</sup>    | 5575 $\pm$ 766 <sup>bc</sup>    | 3459 $\pm$ 173 <sup>b</sup>     | 2988 $\pm$ 558 <sup>bc</sup>    | 2095 $\pm$ 136 <sup>b</sup>  |
|                                                     | C2              |                                   | 6022 $\pm$ 1252 <sup>bc</sup>   | 3479 $\pm$ 398 <sup>b</sup>     | 2908 $\pm$ 115 <sup>bc</sup>    | 1984 $\pm$ 129 <sup>b</sup>  |
|                                                     | C3              |                                   | 3752 $\pm$ 253 <sup>bc</sup>    | 2658 $\pm$ 81 <sup>b</sup>      | 2563 $\pm$ 167 <sup>c</sup>     | 1867 $\pm$ 34 <sup>b</sup>   |
|                                                     | C4              |                                   | 3517 $\pm$ 221 <sup>c</sup>     | 2541 $\pm$ 159 <sup>b</sup>     | 2635 $\pm$ 138 <sup>c</sup>     | 1521                         |

Supplementary data 7 : Concentrations of aluminium (A) and zinc (B), and BCFs (C and D) in the algae *Palmaria palmata* under the 6 experimental conditions after two weeks of exposure. Metals levels are expressed as mg kg<sup>-1</sup> of flesh (mean values  $\pm$  SEM, n=7). A letter common to two conditions indicates that there is no significant difference between them.



## Résultats majeurs

- Les ormeaux exposés à la plus forte concentration de métaux libérés par une anode galvanique à base d'aluminium ( $1\,125 \pm 205 \mu\text{g L}^{-1}$  d'aluminium) ont enregistré un taux de mortalité de 57%.
- La croissance a diminué de manière significative pour une concentration d'aluminium supérieure à  $495 \pm 52 \mu\text{g L}^{-1}$ . Les mesures du taux d'ingestion ont montré que l'appétit des ormeaux était affecté, ce qui est corroboré par la forte augmentation du taux de conversion qui est indicative une mauvaise efficacité alimentaire.
- Les résultats de la condition témoin trophique semblent indiquer que l'alimentation n'est pas la principale voie d'entrée des métaux dans l'organisme des ormeaux.
- *H. tuberculata* a fortement bioconcentré l'aluminium par rapport au zinc dont l'entrée dans les organismes semble régulée, surtout lorsqu'ils ont été exposés à la plus forte concentration
- La physiologie des ormeaux n'a été affectée que pour des concentrations supérieures à celles rencontrées dans l'environnement naturel.

## Article 4: Impact assessment of metals released by aluminium-based galvanic anode on the physiology of the abalone *Haliotis tuberculata* in a controlled environment

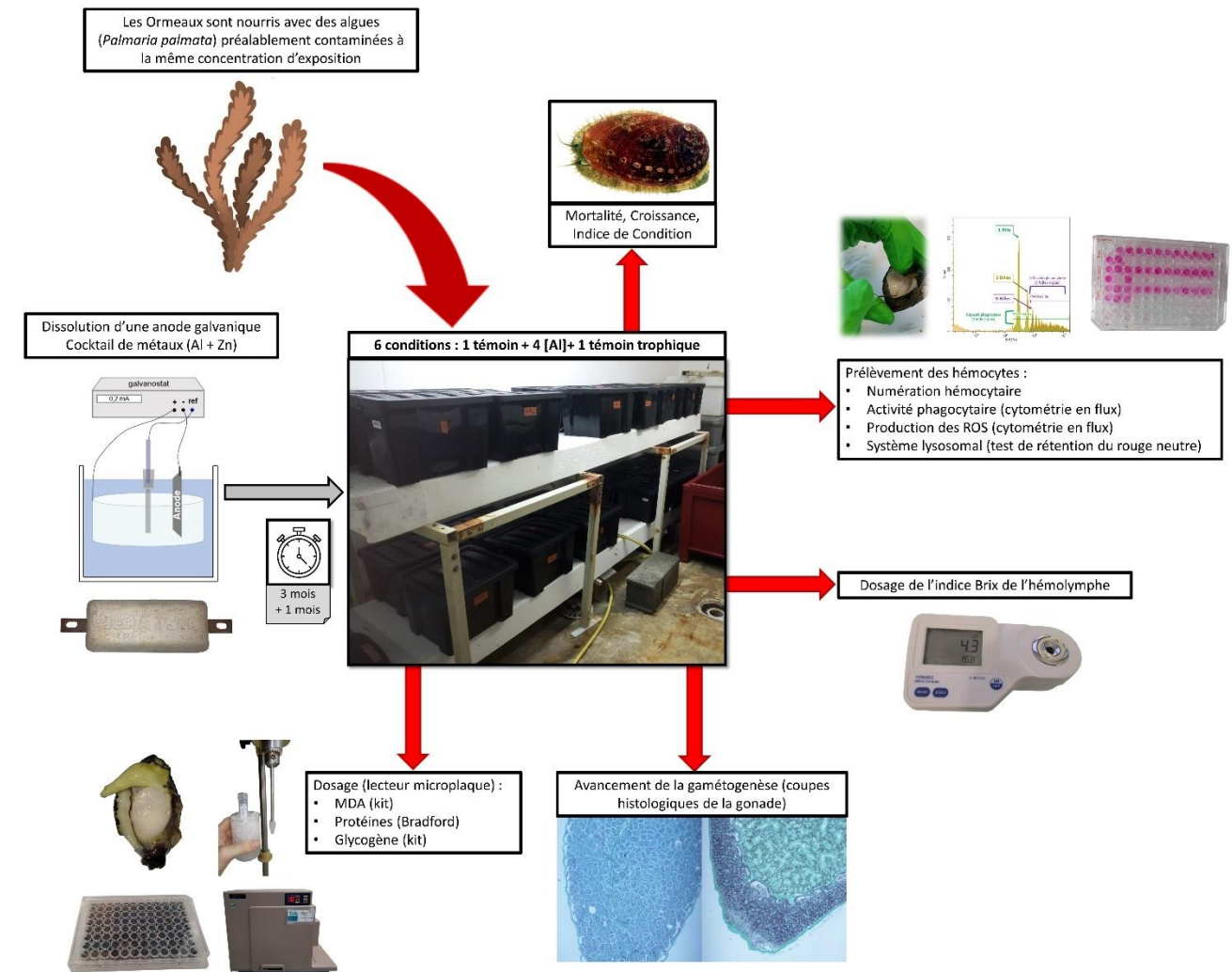
Cet article a fait l'objet d'une soumission dans le journal Ecotoxicology

### Résumé de la publication

En parallèle de l'expérimentation sur les ormeaux juvéniles, des ormeaux adultes ont également été exposés aux métaux issus de la dissolution d'une anode galvanique à base d'aluminium. Les gastéropodes ont été exposés pendant 16 semaines (12 semaines d'exposition et 4 semaines de phase de décontamination) à 6 conditions dont un contrôle, 4 concentrations basées sur l'aluminium total (86, 425, 1096 et 3549  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) et un contrôle trophique tout comme l'expérimentation précédente. L'impact des métaux a été étudié *via* des marqueurs individuels tels que la mortalité, le taux de croissance pondéral, le taux de croissance linéaire, les taux d'ingestion et de conversion ainsi que l'indice de condition. Dans un objectif de comparaison des modèles ormeau et huître, la même batterie de biomarqueurs a été mise en place avec notamment la numération hémodocytaire, l'activité phagocytaire des hémocytes, la production de ROS des hémocytes et le système lysosomal en ce qui concerne l'immunité. De plus, les niveaux de glycogène, l'indice brix de l'hémolymphe, les teneurs en MDA et en protéines dans la glande digestive et les branchies ont été quantifiés. Enfin, le stade de gamétogenèse pour les ormeaux des différentes conditions expérimentales a été vérifié au cours de l'exposition à l'aide de l'observation de coupes histologiques. Les résultats ont révélé que l'anode à base d'aluminium ne semble pas avoir d'effet sur l'état de santé des individus pour des concentrations d'aluminium réalistes d'un point de vue environnemental. Cependant, des effets significatifs ont été rapportés pour des concentrations d'aluminium à partir de 1 096  $\mu\text{g L}^{-1}$ , notamment en ce qui concerne la croissance et le taux d'ingestion qui ont diminué significativement indiquant que l'appétit des ormeaux pour l'algue *Palmaria palmata* a été affecté au cours de l'exposition. La forte augmentation du taux de conversion pour les ormeaux exposés aux plus fortes concentrations est indicatrice de la mauvaise efficacité alimentaire des gastéropodes. Les réserves énergétiques en glycogène et la reproduction des ormeaux ont été perturbées par la contamination de l'anode galvanique. À partir de 57 jours d'exposition, il y a une diminution du MGI (indice gonadique moyen) des ormeaux exposés à 1 096  $\mu\text{g L}^{-1}$  et 3 550  $\mu\text{g L}^{-1}$  d'aluminium. Ces résultats suggèrent que l'exposition à de fortes

concentrations de métaux libérés par l'anode galvanique a accéléré la gamétogenèse des ormeaux ou bien que les ormeaux aient résorbé leurs gamètes afin de récupérer de l'énergie. Cette dernière hypothèse serait en accord avec la hausse de la teneur en glycogène constatée après 85 jours chez les ormeaux exposés à la plus forte concentration. Sans une accumulation d'énergie suffisante pendant le temps d'exposition, les ormeaux pourraient avoir commencé à résorber leurs gamètes afin d'augmenter leurs réserves de glycogène. La diminution du nombre d'hémocytes suggère également que le système immunitaire peut être affecté, entraînant un affaiblissement de l'organisme. Au regard des résultats des ormeaux de la condition trophique, l'alimentation de semble pas être la principale voie de contamination affectant les mollusques, ce qui est en accord avec les résultats déjà rapportés chez les ormeaux juvéniles.

## Récapitulatif du protocole expérimental



|                            |                                | T0                                                                 | T 29 jours | T 57 jours | T 85 jours | T 113 jours<br>(phase de décontamination) |
|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------|------------|------------|-------------------------------------------|
|                            |                                | 24/03/21                                                           | 22/04/21   | 20/05/21   | 17/06/21   | 15/07/21                                  |
| Biomarqueurs individuels   | Mortalité                      | Vérfiée quotidiennement sur l'ensemble de la durée de l'exposition |            |            |            |                                           |
|                            | Taux de croissance pondérale   | n = 15                                                             | n = 15     | n = 15     | n = 15     | n = 15                                    |
|                            | Taux de croissance linéaire    | n = 15                                                             | n = 15     | n = 15     | n = 15     | n = 15                                    |
|                            | Indice de Condition            | n = 15                                                             | n = 15     | n = 15     | n = 15     | n = 15                                    |
| Biomarqueurs histologiques | Avancement de la gamétogénèse  | n = 15                                                             | n = 15     | n = 15     | n = 15     | n = 15                                    |
| Biomarqueurs biochimiques  | Dosage du MDA                  | n = 8                                                              | n = 8      | n = 8      | n = 8      | n = 8                                     |
|                            | Dosage des protéines           | n = 8                                                              | n = 8      | n = 8      | n = 8      | n = 8                                     |
|                            | Dosage du glycogène            | n = 8                                                              | n = 8      | n = 8      | n = 8      | n = 8                                     |
|                            | Indice Brix                    | n = 15                                                             | n = 15     | n = 15     | n = 15     | n = 15                                    |
| Biomarqueurs immunitaires  | Numération hémocytaire         | n = 15                                                             | n = 15     | n = 15     | n = 15     | n = 15                                    |
|                            | Activité phagocytaire          | n = 15                                                             | n = 15     | n = 15     | n = 15     | n = 15                                    |
|                            | Espèces réactives de l'oxygène | n = 15                                                             | n = 15     | n = 15     | n = 15     | n = 15                                    |
|                            | Système lysosomal              | n = 15                                                             | n = 15     | n = 15     | n = 15     | n = 15                                    |

**Impact assessment of metals released by aluminium-based galvanic anode on the physiology of the abalone *Haliotis tuberculata* in a controlled environment**

Levallois Alexandre<sup>1</sup>, Laureen Nivelais<sup>2</sup>, Caplat Christelle<sup>1</sup>, Basuyaux Olivier<sup>2</sup>, Costil Katherine<sup>1</sup>,  
Serpentini Antoine<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA) Université de Caen Normandie UNICAEN, Sorbonne Université, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UA, CNRS 8067, IRD, Esplanade de la paix, F-14032 Caen.*

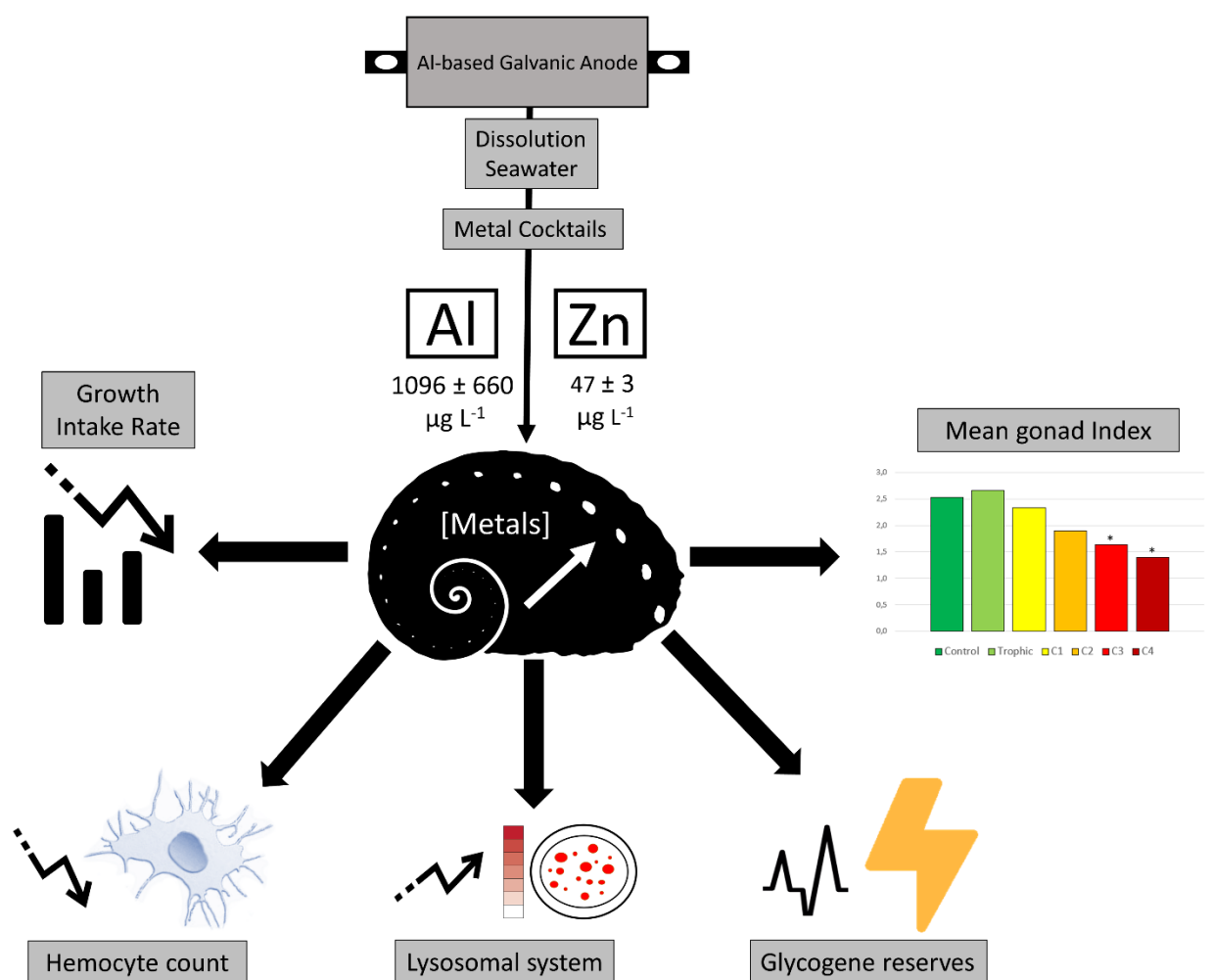
<sup>2</sup> *Synergie Mer et littoral (SMEL), Zac de Blainville, F-50560 Blainville-sur-Mer.*

**Abstract:**

In order to protect metal structures immersed in the sea from corrosion, the galvanic anode cathodic protection system (GACP) is often applied. However, this association leads to a continuous oxidation of the galvanic anode and therefore to a release of a metal cocktail in the forms of ions or oxy-hydroxides. Therefore, the main objective of our study was to investigate the toxicity of elements released from the dissolution of an aluminium-based galvanic anode (~95% Al, ~5% Zn, <0.1% for In, Cu, Cd, Mn, Fe) on a grazing gastropod, the abalone *Haliotis tuberculata*. Gastropods were exposed for 16 weeks (12 weeks of exposure and 4 weeks of decontamination phase) to 6 conditions including a control, 4 concentrations based on total aluminium level (86, 425, 1,096 and 3,549 µg L<sup>-1</sup>) and a trophic control, corresponding to abalones placed in non-contaminated natural seawater but fed with contaminated algae. The effects of metals on growth, glycogen levels, brix index of hemolymph, MDA levels in digestive gland and gills, hemocyte phagocytic activity, ROS production, lysosomal system and the progress of gametogenesis were investigated throughout the entire exposure allowing the realization of kinetics. The results revealed that the aluminium-based anode does not seem to have an effect on the health status of the individuals for environmentally tested realistic concentrations. However, in extreme conditions strong effects were reported on the growth, immune system and reproduction of abalone.

**Keywords:** galvanic anode, aluminium, zinc, *Haliotis tuberculata*, abalone.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## 1. Introduction

Since the industrial revolution, the marine environment is increasingly subjected to pressures of anthropic origin. The installation of metallic structures submerged in the sea such as wind turbines, oil platforms or port infrastructures implies the establishment of protection systems against corrosion due to direct exposure to aggressive environmental conditions, such as marine atmospheres. Because of its comparatively low weight and high electrochemical capacity, aluminium-zinc-indium alloys are commonly applied as galvanic anode cathodic protection system (GACP) since the early 1960s (Roy, 1968). The anodes are metallic alloys composed in majority by one metal (> 96% in mass), aluminium (Al) or zinc (Zn) with other trace elements (< 0.1%). The galvanic anode is directly connected to the steel structure and transfers electrons to the cathode (steel surface), thus minimized the oxidation of the iron of steel and contributes to the release of metals in their ions or oxy-hydroxides forms into the environment. Throughout their lifetime, the anodes thus contribute to the release of ecotoxicologically important elements (Reese et al., 2020). A conservative estimate reveals a current annual release of



around 1,900 tons of Al and 90 tons of Zn exclusively in the North Sea (Kirchgeorg et al., 2018). A typical park of 75 offshore wind turbines equipped with aluminum-based galvanic anodes represents an annually transfer of 45 tons of Al and 2 tons of Zn. Moreover, with a view to energy transition, Europe has fixed the objective of increasing its proportion of renewable energy, which implies tripling the cathodic protection requirements for marine energy (Kirchgeorg et al., 2018).

In the port environment, high concentrations of Al in the order of  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  have been reported such as in the port city of Antofagasta (Valdés et al., 2011), the Egyptian coast (Abdel Ghani, 2015) or Port Curtis in Australia (Angel et al., 2016). A 42-month study in the port of Calais revealed that the dissolution of aluminium-based galvanic anodes induced a higher Zn enrichment in the sediments compared to Al (Caplat et al., 2020). This contrasts with the proportion of these elements in the composition of the anode (mainly composed of Al). The metal enrichment in sediments does not mainly depend on the composition of the anode but more on the environmental turbulence conditions. Therefore, the Zn should not be underestimated in the study of the impact of aluminium-based galvanic anodes.

The impact of a GACP raises questions regarding potential environmental effects on marine organisms either directly or along the food chain across trophic levels, and nowadays there is very few studies about the implications of the electrochemical system itself. The impact of Al and Zn in their chloride or sulphate forms has been studied in literature (Gillmore et al., 2016; Golding et al., 2015; Negri et al., 2011; Wilson and Hyne, 1997), but the influence of their presence in a cocktail on their marine chemical speciation in the context of the dissolution of galvanic anodes has been only marginally investigated. Adverse effects of aluminium-based galvanic anode dissolution were previously studied in the sea urchin *Paracentrotus lividus* and it is interesting to note that the release of Al and Zn from the galvanic anode was less toxic for the fertilization rates than their dissolution from sulphate salts (Caplat et al., 2010). In another study, a 4-week exposure to  $530 \mu\text{g L}^{-1}$  of Al released by anode, induced the accumulation up to  $1,706 \text{ mg kg}^{-1}$  of Al in the digestive gland of the mussel *Mytilus edulis* (Mao et al., 2011). Recently, Bell et al. (2020) demonstrated that acute exposure to high concentrations of metals from aluminium-based galvanic anode dissolution did not result in toxicity for the bacterium *Aliivibrio fischeri* and only slight effects on the growth of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Authors observed a significant increase in mortality in the amphipod *Corophium volutator*, at a high concentration of Al ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), which is far from the environmental maximums (Bell et al., 2020). The present study follows a recent investigation carried out to assess the chronic effects of the aluminium-based galvanic anode on the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Levallois et al., 2022). The induced metal dissolution was associated to biological effects for a high total Al

concentration ( $296 \mu\text{g L}^{-1}$ ) released in seawater, especially the MDA levels recorded in the digestive gland.

The main objective of the present study was to examine the chronic toxicity of metals released from an aluminium-based galvanic anode on another mollusc the abalone, *Haliotis tuberculata* (Linnaeus, 1758). The abalone is a grazing gastropod which feeds on various macroalgae and preferentially on the red alga *Palmaria palmata* (Basuyaux et al., 2018). Besides their ecologically importance as primary consumers, abalones are economically important since they are widely consumed in Asian countries, and are among the most studied models used as marine gastropods in ecotoxicological studies (Bryan et al., 1977; Huang et al., 2010; Liu et al., 2011; Mottin et al., 2010). In this work, we investigated a battery of biomarkers of important physiological functions including the immune system, the reproduction and the metabolic state of the abalones.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Organisms

The experiment was performed with abalones provided by France Haliotis® farm located in Plouguerneau (Brittany, France), and their shell length averaged  $53.35 \pm 2.59$  mm and weight  $21.43 \pm 2.97$  g. After an acclimatization period of 7 weeks, 342 abalones were separated into groups of 19 individuals homogeneous in size (ANOVA,  $p > 0.05$ ). Each group was placed in 40 L tanks for a period of 85 days (from march 24 to june 17, 2021) and then extended to 113 days for a decontamination phase (until July 15). Animals were fed once a week with algae (11 g per abalone), *Palmaria palmata*, harvested along the west coast of Cotentin (Normandy, France) every month. The algae were conditioned for a week in separate tanks with the same metallic concentrations as the abalones exposure tanks before being distributed. A quantity of algae ( $28 \pm 8$  g,  $n = 54$ ) was collected every month to monitor metallic concentrations in all tissues.

### 2.2. Experimental device

The experiment was realized at Blainville-sur-mer (West coast of Normandy) in the experimental center « Synergie mer et littoral » (SMEL), in a dedicated thermoregulated room ( $16^{\circ}\text{C}$ ) equipped with a supply of natural seawater passed through a sand filter.

The electrochemical device used to reproduce the release of metals from the aluminium-based galvanic anode (GACP) was developed in previous works and described in Levallois et al. (2022). Briefly, the device was equipped with a reference electrode (SCE), a platinum-titanium alloy counter electrode (CE) and an Al anode (Al Bera15, Bac Corrosion® Control) which were immersed in 140 L of aerated natural seawater and connected 22 hours to a galvanostat (Amel, 2049 model). The obtained leachate

constituted the stock solution of metals released from the anode which was in mass composed of seven elements (93.2 % to 97.1 % for Al, 2.5 % to 6.5 % for Zn, 0.13 % max for Fe, 0.1 % max for Si, 0.01 % to 0.03 % for In, 0.01 % max and 0.006 % max for Mn and Cu). The stock solution was renewed each day and the total concentrations given for principal metals were  $[Al] = 7,624 \pm 656 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $[Zn] = 357 \pm 36 \mu\text{g L}^{-1}$ . Dilutions were performed with natural seawater, 3 times a week in different tanks of 100 L to reach the target concentrations of the exposition conditions.

Six conditions were tested: control (C), trophic control (TC) where abalones were exposed to non-contaminated water but fed with contaminated algae; and a gradient of four concentrations based on Al level. The lower targeted concentration (C1) was specific to chemical conditions found in harbor environment with around  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  (Abdel Ghani, 2015; Angel et al., 2016; Jahan and Strezov, 2017; Valdés et al., 2011) and the targeted higher concentrations (C4) was chosen to be not realistic in case of extreme contamination of Al. Each condition was tested in triplicate, given a total of 18 tanks. All tanks were equipped with a bubbling system and the water was fully changed 3 times a week. Physicochemical parameters were daily recorded with a multiparameter probe (NKE©, model STYPS+30-SI) and remained stable between the different conditions throughout the experiment: temperature, salinity and pH were  $16.27 \pm 0.27 ^\circ\text{C}$ ,  $34.44 \pm 1.04$  PSU and  $8.06 \pm 0.08$ , respectively.

### 2.3.Measures of metallic concentrations in water

Seawater samples were collected every week to monitor total concentrations of Al and Zn by atomic absorption spectrometry (AAS). Al was analyzed by a Zeeman Atomic Absorption Spectrometer Z-AAS (AA240Z – Varian®) equipped with a graphite tube atomizer (FTA 120, Varian®) and a programmable sample dispenser (PSD 120, Varian®). Analyzes were performed with a matrix modifier solution ( $2 \text{ g L}^{-1}$  of  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ) and a temperature program developed for the seawater matrix. Each digested sample was analyzed five times, and the mean of values was used for evaluation. Zn was analysed by atomic absorption spectrometry in an air–acetylene flame (F-AAS, Varian® AA240F). Non-specific absorptions were corrected with a deuterium lamp. Each sample was analyzed in triplicate, and mean values were used for evaluation. The limit of detection (DL) was defined as mean plus three times standard deviation (SD) of blank ( $33 \text{ g L}^{-1}$  of sodium chloride, > 99%, in  $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$  water) analyses. A DL of  $3.1 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $n = 30$ ) and of  $6.6 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $n = 45$ ) were given for Zn and Al, respectively.

### 2.4.Mortality, growth and conversion rate

In each experimental condition, the abalones were daily checked to discard dead individuals and calculate mortality rates. Abalones collected were measured in length, and width (to the nearest 0.01 mm), the total weight (TW), the drained visceral mass and the empty shell weigh (SW) were also

recorded (to the nearest 0.01 g). Abalones status was assessed using the following condition index (Friedman et al., 1997):

$$(1) \text{ Index Condition} = \frac{TW - SW}{TW}$$

The weight growth (WGR in % d<sup>-1</sup>) rate was calculated using the total initial weight (iW) of each abalone at the beginning of the experiment and the total final weight (fW) after the 85 days (t) of exposition:

$$(2) \text{ WGR} = \left( \left( \frac{fW}{iW} \right)^{\frac{1}{t}} - 1 \right) \times 100$$

The linear growth of the shell (LG in mm d<sup>-1</sup>) was determined with the initial length of the shell (iL) of each abalone and the final length of the shell (fL) after the 85 days (t) of exposition:

$$(3) \text{ LG} = \frac{fL - iL}{t}$$

Every week, the initial algae given to abalones were weighed (iA), the remaining algae from each tank was collected in a sieve, drained with a salad spinner and weighed (rA). Five ingestion control tanks containing water and contaminated algae at different concentrations were also used to determine the weight of naturally degraded algae in an abalone-free environment (dA). The intake rate (IR in g of feed. ind<sup>-1</sup>day<sup>-1</sup>), and the conversion rate (CR in g of feed intake. g of fresh weight increase<sup>-1</sup>) were calculated after the 85 days of exposition as follows:

$$(4) \text{ IR} = \frac{(iA - rA) - dA}{\text{Number of abalones} \times 85 \text{ (Days of exposition)}}$$

$$(5) \text{ CR} = \frac{(iA - rA) - dA}{\text{Fresh weight increase between T0 and 85 days}}$$

## ***Biomarkers***

Five abalones were collected in each tank (i.e. 3 x 5 individuals for each exposure concentration) to study a battery of biomarkers after 29, 57, 85 and 113 days of exposure.

### **2.5.Hemolymph removing and hemocyte counting**

After a medio-lateral incision in the abalone foot, the hemolymph was withdrawn using a 20 mL syringe with a 25 G needle. Hemolymph from each abalone was transferred into an individual tube containing 1 mL<sup>-1</sup> of cooled sterile anticoagulant modified Alsever's solution (115 mM glucose; 27 mM sodium citrate; 11.5 mM EDTA; 382 mM NaCl) (Bachère et al., 1988) on ice. For each sample, a fraction was examined under light microscopy to check the quality of the sample and potential contamination.

A Thoma counting chamber was used to determine the concentration of cells per mL. For each tube, a volume of hemolymph was calculated in order to obtain 100,000 cells per tube.

## 2.6. Phagocytic activity and reactive oxygen species production

The phagocyte capacity of hemocytes was determined by adding fluorescent beads (Fluospheres® F8823, Invitrogen®) to the medium. These beads were coupled with fluorescein (FITC) which allowed, after phagocytosis, their detection by flow cytometry. From a stock solution of  $3.6 \cdot 10^{10}$  beads mL<sup>-1</sup>, these were added to the medium at a rate of 100 beads per cell. A stock solution was prepared using 5.6 µL of fluorescent beads added to 194.4 µL of Molluscan Physiological Saline (MPS) ( $4 \cdot 10^{-1}$  M NaCl;  $1 \cdot 10^{-1}$  M MgSO<sub>4</sub>;  $2 \cdot 10^{-2}$  M HEPES;  $1 \cdot 10^{-2}$  M CaCl<sub>2</sub>;  $1 \cdot 10^{-2}$  M KCl). After 40 min incubation at 17°C, Hoechst 33342 (H3570, Trihydrochloride, Trihydrate, Invitrogen®) was added to 2 µg mL<sup>-1</sup> (final concentration). This compound binds to the DNA of living cells and can be detected by fluorescence allowing the elimination of debris from the cytogram. After a further 20 min incubation time, the cells were fixed with 3% formaldehyde. All samples were stored at 4°C until analysis by flow cytometry (*Beckman® Coulter CytoFLEX*). In total, 10,000 events were counted for each sample, and the phagocytosis efficiency of cells was evaluated as the percentage of hemocytes that had engulfed at least three beads (Delaporte, 2003).

The determination of reactive oxygen species (ROS) was also performed by flow cytometry on the same abalone hemolymph samples. For this, 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma®, final concentration = 1 µM) which diffuses into the cells during the 1-hour incubation time was used (Lambert et al., 2003). The oxidation of intracellular DCFH is quantitatively related to the oxidative metabolism of hemocytes and is mediated by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). After 1 hour of incubation, the samples were fixed with 3% formaldehyde and stored at 4°C until flow cytometry analysis. The results of ROS production were expressed as the percentage of cells showing fluorescence.

## 2.7. Lysosomal system

The lysosomal system was evaluated with the neutral red retention assay (NRRA) according to the protocol used by Minguez et al. (2014). The hemolymph was deposited in the wells of a 24-well plate. After 30 min of incubation at 17°C to allow the hemocytes to adhere to the well bottom, 200 µL of neutral red (NR) solution were added in each well. The solution was prepared with 10 µg of NR (N7005, Sigma Aldrich®) diluted in 347 µL of DMSO and filtered with a 0.22 µm syringe. Then, 10 µL of filtrate were diluted with 5 mL of MPS. NR is absorbed into the cells by membrane diffusion where it is trapped in the lysosomal compartment (Lowe and Pipe, 1994; Rashid et al., 1991). After 1 hour of incubation at 17°C, wells were rinsed twice with 300 µL of MPS to remove the excess NR not incorporated in the lysosomes. Two hundred microliters of lysis buffer (1:50:49 acetic acid, absolute ethanol, ultrapure

water) were added to each well and the plate was darkened for 30 min at room temperature to lysis the cells and release the neutral red from the lysosomes. Absorbance measurement was performed with the microplate reader at 540 nm (Flexstation 3, Molecular Device®).

## 2.8. Malondialdehyde content and protein content

Malondialdehyde (MDA) accumulation in the gills and digestive gland was used as a lipid peroxidation marker. Samples were homogenized with a Potter-Elvehjem homogenizer for 1 min at 1400 rpm in PBS (NaCl 500 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.1 mM, pH 7.4) containing butylated hydroxytoluene which is an antioxidant agent. Samples were then centrifuged (10,000 x g, 10 min, 4°C) and the supernatants were aliquoted and stored at -80°C until analyse. The same aliquot was used for determining both levels of proteins and malondialdehyde. The protein assay was performed according to the protocol of Bradford (Bradford, 1976). The MDA assay was performed with a test kit (MDA-586 Oxis-Research®) following manufacturer's instructions and as described in previous studies (Levallois et al., 2022; Séguin et al., 2017). Samples were diluted in half in ultrapure water to a concentration between 1 and 8 mg protein mL<sup>-1</sup>. The plate was read with a microplate reader at 586 nm (Flexstation 3, Molecular Device®). Results were expressed in nmol MDA mg protein<sup>-1</sup>.

## 2.9. Histological observations

For histology analysis, a sample of the entire conical appendage of abalone was fixed in Davidson's solution (1 vol. glycerol, 2 vol. 37% formaldehyde, 3 vol. 95% ethanol and 3 vol. filtered seawater). Tissue samples were then routinely processed, and the 3 µm paraffin-embedded sections were stained according to the trichromatic protocol of Prenant Gabe (Gabe, 1968). For each individual, the sex and stage of gametogenesis were determined based on Capinpin's method after modifications (Capinpin et al., 1998): briefly, stage I: preproliferative; stage II: proliferative; stage III: maturing; stage IV: ripe; stage V: partial spawning, stage VI : advanced spawning.

A mean gonad Index (MGI) reflecting the progress of gametogenesis and making possible to follow the global cyclic changes in the reproductive tissues of a group of individuals (Gosling, 2003) was calculated. A coefficient was assigned to each stage according to its progress in gametogenesis (stage I = 0; stage II = 1; stage III = 2; stage IV = 3; stage V = 1.5, stage VI = 0.5. The MGI was calculated by multiplying the number of individuals from each stage with the coefficient and divided by the number of individuals:

$$MGI = \frac{(\text{number of individuals at stage } n \times \text{coefficient of the stage } n) + \dots + (\text{number of individuals at stage } n + 1 \times \text{coefficient of the stage } n + 1)}{\text{total number of individuals}}$$

## 2.10. Energy reserves

Glycogen levels were used as a marker of energy reserves in oysters. After removing the mantle edge and gills, a sample of the remaining visceral mass was taken, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. After defrosting on ice, ultra-pure water was added to each tube in a proportion by volume: weight (100 µL for 0.01g). Tissues were homogenized with a Potter-Elvehjem for 1 min at 1,400 rpm. The samples were then boiled for 5 min to inactivate the enzymes and then centrifuged (3000 x g, 5 min, 4°C). The supernatant was recovered and centrifuged again (13,000 x g, 5 min, 4°C). Finally, the supernatants were aliquoted and stored at -80°C until assayed. After thawing, the samples were diluted 1/1000 with ultrapure water. The glycogen assay was performed with glycogen test kit (MAK016-1KT Sigma-Aldrich®) following manufacturer's instructions and as described in previous studies (Levallois et al., 2022; Séguin et al., 2017). The plate was read with the microplate reader at 570 nm (Flexstation 3, Molecular Device®). Results were expressed in mg glycogen. g flesh<sup>-1</sup>.

In addition, hemolymph was used to measure the Brix index using a digital refractometer with automatic temperature compensation (Hanna Instruments®, HI96801). Ultrapure water was used as a blank between each sample. Hemolymph of 10 abalones per condition and sampling date was individually analyzed. To this end, 100 µL of hemolymph were centrifuged (3,000 x g, 5 min, 4°C) and supernatant was deposited on the optical reader of the refractometer. Results were expressed in Brix degree.

## 2.11. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using R software version 3.4.4. The normality of the data was tested with the Shapiro-Wilk test and homoscedasticity with F-test. If the data followed a normal distribution and homoscedasticity was respected, analyses of variance (ANOVAs) followed by Tukey post-hoc tests were used to determine homogeneous groups. When the data did not meet the conditions of application, non-parametric Kruskal-Wallis (K-W) tests followed by Dunn's tests were performed. Differences were considered significant at p-value < 0.05. All results are presented as mean ± SEM (Standard Error of the Mean).

## 3. Results

The average of total Al and Zn concentrations effectively measured in exposure tanks during the experiment are presented in Table XIV. The highest concentration tested was 3,550 ± 1,707 µg L<sup>-1</sup> of Al and 130.5 µg L<sup>-1</sup> of Zn.

Table XIV : Averages of aluminium and zinc concentrations measured in water ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{SEM}$ ) during the 85 days of exposure for the different conditions. LD = limit detection.

| Conditions | Control     | C1            | C2                | C3                 | C4                  |
|------------|-------------|---------------|-------------------|--------------------|---------------------|
| Aluminium  | LD          | $86 \pm 27.1$ | $424.6 \pm 262.1$ | $1096.3 \pm 659.9$ | $3549.9 \pm 1707.4$ |
| Zinc       | $8.1 \pm 0$ | $10 \pm 1.4$  | $25 \pm 4.5$      | $46.7 \pm 3$       | $130.5 \pm 0$       |

### 3.1.Mortality, growth and conversion rate

During the 85 days of exposure, the percentages of abalone mortality for the different experimental conditions were 3.51 %, 0 %, 0 %, 1.75 %, 1.75 % and 8.77 % for the control, trophic control, C1, C2, C3 and C4 conditions, respectively.

Table XV : Results of the different indicators calculated from the biometric data after 85 days of exposure. Weight growth rate is expressed in  $\% \text{ d}^{-1}$ , linear growth of the shell in  $\text{mm d}^{-1}$ , IR in  $\text{g feed intake individual}^{-1} \text{ day}^{-1}$  and conversion rate in  $\text{g feed intake}^{-1} \text{ g of fresh weight gain}^{-1}$ . All results are presented  $\pm \text{SEM}$ . An « \* » indicates a significant difference compare to control.

| Conditions                 | Control           | Trophic Control   | C1                | C2                | C3                 | C4                |
|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| Condition Index            | $0.74 \pm 0.01$   | $0.75 \pm 0.01$   | $0.74 \pm 0.01$   | $0.72 \pm 0.01$   | $0.70 \pm 0.01$    | $0.69 \pm 0.01$   |
| Weight growth rate         | $0.22 \pm 0.01$   | $0.21 \pm 0.02$   | $0.21 \pm 0.01$   | $0.15 \pm 0.03$   | $0.02 \pm 0.02$    | $-0.07 \pm 0.02$  |
| Linear growth of the shell | $0.027 \pm 0.004$ | $0.033 \pm 0.005$ | $0.031 \pm 0.005$ | $0.031 \pm 0.004$ | $0.019 \pm 0.004$  | $0.016 \pm 0.002$ |
| Intake rate                | $0.65 \pm 0.02$   | $0.70 \pm 0.04$   | $0.66 \pm 0.05$   | $0.59 \pm 0.02$   | $0.46 \pm 0.02$    | $0.46 \pm 0.02$   |
| Conversion rate            | $13.44 \pm 0.58$  | $14.18 \pm 1.22$  | $14.42 \pm 0.92$  | $15.18 \pm 2.59$  | $135.45 \pm 75.61$ | NA                |

The Table XV resumes the results of the different indicators calculated from the biometric data. For the condition index, we measured a significant difference for abalones of conditions C3 and C4 compared to control individuals (KW,  $p < 0.05$ ). Regardless of the conditions, abalones did not show variations of the linear growth of the shell. In contrast, we observed significantly lower weight growth rates of abalones in conditions C3 and C4 over the 85 days of exposure. The growth rate of abalones in condition C4 ( $-0.07 \pm 0.02$ ) was negative indicating a loss of weight (ANOVA  $p < 0.05$ ). After 85 days of exposure, the intake rate (IR) of abalones in conditions C3 ( $0.46 \pm 0.02$ ) and C4 ( $0.46 \pm 0.02$ ) was significantly lower than that of control abalones ( $0.65 \pm 0.02$ ), meaning that abalones exposed to the higher concentrations consumed less algae (ANOVA  $p < 0.05$ ). The conversion rate (CR) could not be calculated for abalones in condition C4 due to negative weight gain. Otherwise, the CR reached a value of  $135.45 \pm 75.61$  for the C3 condition compared to the other conditions which range from 13.44 to 15.18.



### 3.2. Hemocyte count

The Figure 40a shows that the number of hemocytes per mL<sup>-1</sup> of hemolymph was significantly lower for abalones in conditions C3 and C4 compared to control abalones after 85 days of exposure (ANOVA,  $p < 0.05$ ). There was no difference at the beginning of exposure and only the C4 concentration after 57 days of exposure there presented a significant decrease. However, there was no more significant difference between the different conditions after the decontamination phase. The hemocyte count returned to a level described as normal for the highest concentrations: for condition C4, it increased from  $1.52 \cdot 10^6$  after 85 days of exposure to  $4.47 \cdot 10^6$  hemocytes mL<sup>-1</sup> at the end of the decontamination phase. Control abalones did not show significant changes in hemocyte count over time.

### 3.3. Phagocytic activity and reactive oxygen species

Regarding the phagocytic activity of hemocytes (Figure 40b), few variations were globally observed at different exposure times. Over the whole experiment, for all experimental conditions, the phagocytic efficiency of hemocytes varied between 29.89 and 60.50 %. After 57 days of exposure, there was a significant decrease in the phagocytic efficiency of abalones under the trophic control condition compared to the control. Then, after 85 days of exposure and for the decontamination phase, a slight decrease was observed only for abalones in the C2 condition (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Furthermore, we did not observe any modulation in the production of ROS by hemocytes (ANOVA,  $p > 0.05$ ) (*data not shown*).

### 3.4. Lysosomal system

The neutral red retention assay indicates that exposure to the degradation products of the aluminium-based galvanic anode had an effect on the lysosomal system condition (Figure 40c). Indeed, after 29 days of exposure, there was a significant decrease in optical density (OD) compare to the control for the trophic control and C4 conditions of 53 and 59%, respectively (KW,  $p < 0.05$ ). However, after 57 days of exposure, the trend was reversed as there was a significant increase in OD by 70, 103 and 182 % for abalones in trophic control, C3 and C4 conditions, respectively (KW,  $p < 0.05$ ). After 85 days of exposure, the same pattern was found and despite the decontamination period (113 days), lysosomes from trophic control, C3 and C4 conditions remained significantly higher compared to the control by 69, 85 and 77%, respectively (KW,  $p < 0.05$ ).

### 3.5. Proteins and MDA levels

Exposure to the metals cocktail of aluminium-based galvanic anodes had an effect on protein levels in the abalones' digestive gland. Indeed, after 57 days of exposure, protein levels in the digestive

gland were significantly lower for abalones in the C4 condition ( $29.34 \pm 2.56 \text{ mg mL}^{-1}$ ) and significantly higher for abalone in the trophic control condition ( $63.26 \pm 1.58 \text{ mg mL}^{-1}$ ) compared to the control ( $48.17 \pm 5.63 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (ANOVA,  $p < 0.05$ ) (Figure 40d). After 85 days, there was also a decrease in protein content for abalones in condition C4. At the end of the decontamination phase (113 days), the protein contents in the digestive gland were again equivalent between the different conditions. Overall, protein concentrations in the gills were lower than in the digestive gland and there was not significant difference (*data not shown*). There were no significant differences in MDA levels in the gills and digestive gland compared to the control at all exposure times because of the high variability of the results (KW,  $p > 0.05$ ) (*data not shown*).

### 3.6. Glycogen and Brix index

Regarding glycogen levels, there was a decrease of about 90% in all conditions compared to T0 after the first month of exposure, from  $10.76 \pm 2.09$  to  $1.32 \pm 0.26 \text{ mg g}^{-1}$  of flesh on average (Figure 40e). Nevertheless, after 57 days of exposure, glycogen levels increased in all conditions except in condition C4 (KW,  $p < 0.05$ ). This trend of increasing energy reserves was confirmed after 85 days of exposure, the glycogen level of abalones in condition C4 increased by 20-fold in 1 month from  $0.73 \pm 0.13$  to  $15.02 \pm 2.94 \text{ mg g}^{-1}$  of flesh. Glycogen levels then stabilized for all conditions during the decontamination phase, and there were no more significant differences (KW,  $p > 0.05$ ).

After 29 days of exposure, the Brix index was significantly higher in the hemolymph of abalones in condition C4 ( $6.03 \pm 0.08$  °brix) compared to the control individuals ( $5.59 \pm 0.08$  °brix) as shown on the Figure 40f (KW,  $p < 0.05$ ). After 57 days of exposure, it can be seen that except for condition C1, the Brix values of all other conditions were significantly higher than those of the control condition (KW,  $p < 0.05$ ). Then, whether after 85 days of exposure or after the decontamination phase at 113 days, there were no more significant differences between the different conditions (KW,  $p > 0.05$ ).

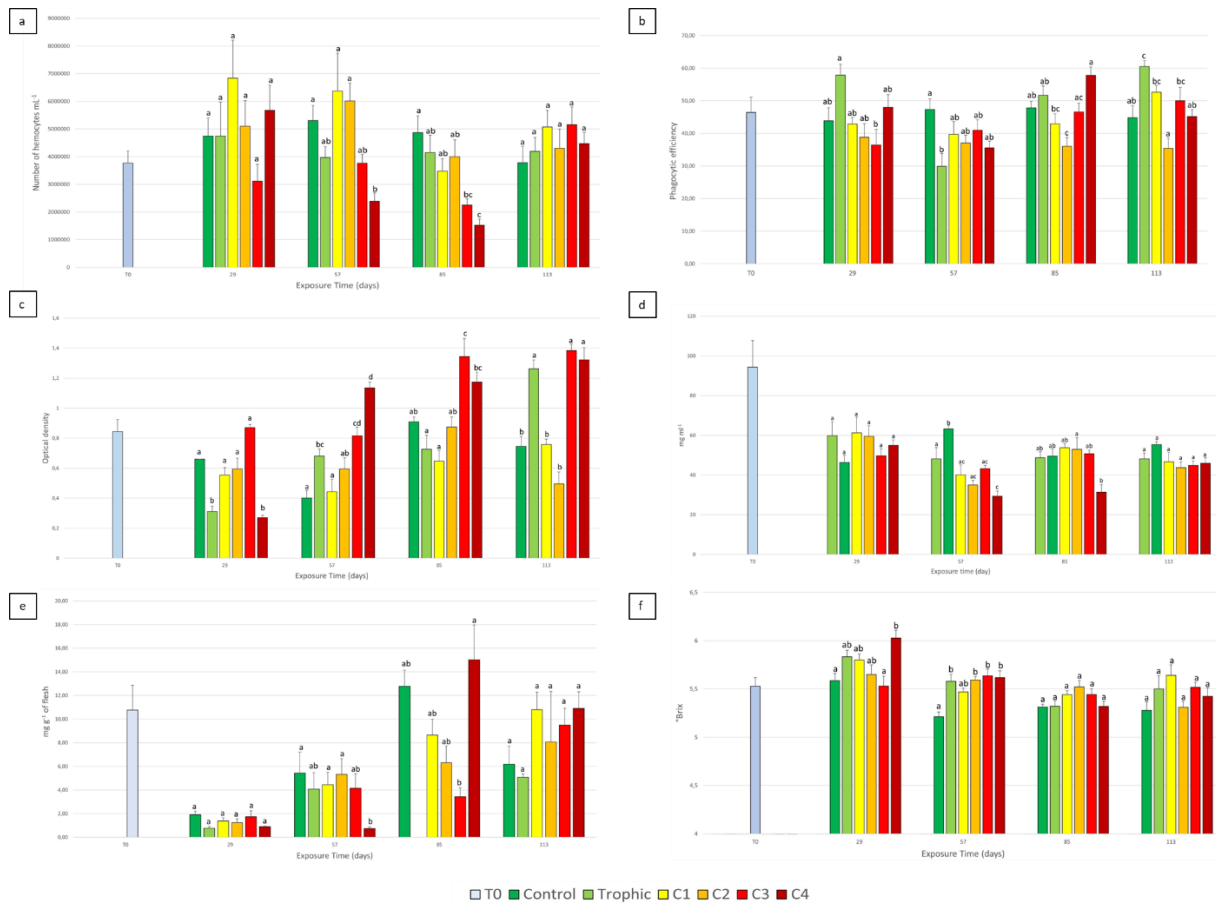


Figure 40 : Kinetics of the different biomarkers studied in abalones during 113 days of exposure including the decontamination phase. The number of hemocytes per  $\text{mL}^{-1}$  (a). The phagocytic efficiency which corresponds as the percentage of hemocytes that had engulfed at least three beads (b). The lysosomal system expressed by the optical density (c). Proteins levels measured in the digestive gland expressed in  $\text{mg mL}^{-1}$  (d). The glycogen content expressed in  $\text{mg g}^{-1}$  of flesh (e). The Brix index expressed in  $^{\circ}\text{Brix}$  (f). A letter common to two conditions indicates that there is no significant difference between them.

### 3.7. Gametogenesis stages

The Figure 41a presents the kinetics of MGI of control and exposed abalones over the exposure period. From 57 days of exposure, there was a decrease in the MGI of abalones in conditions C3 and C4, then after 85 days of exposure the MGI were, respectively, 1.63 and 1.39 which was significantly lower compared to the MGI of abalones in the control condition: 2.53 (KW,  $p < 0.05$ ). In Figure 41b, it can be observed that abalones from conditions C3 and C4 showed more advanced stages of gametogenesis, with a majority of abalones in stage V (partial spawning) and stage VI (advanced spawning), while stage IV (mature) was dominant for abalones from the control condition with even some individuals still in stage III (maturation).

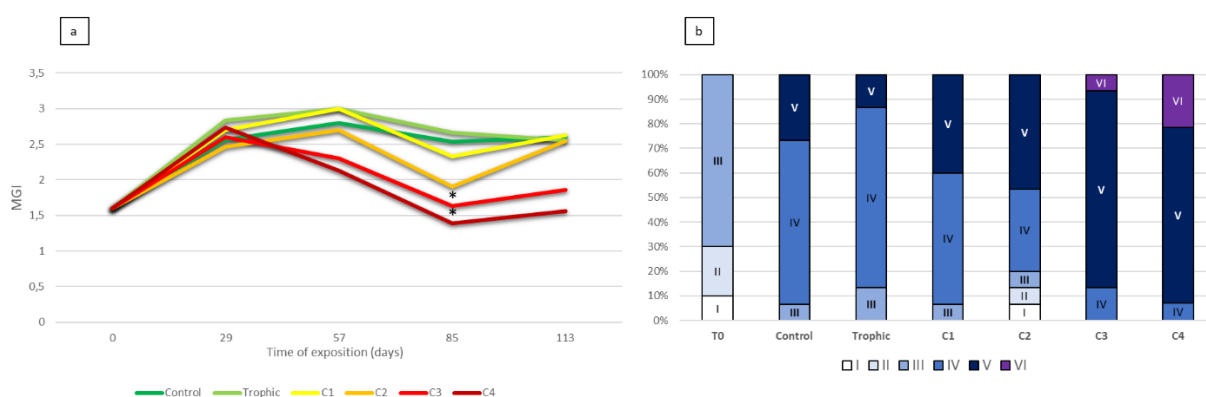


Figure 41 : Changes in the Mean gonad Index (MGI) of abalones along the 113 days of exposure (a) and percentages of the different stages of gametogenesis at T0 and after 85 days of exposure (b) according to the experimental conditions. Stages of gametogenesis were determined by considering the description established by Capinpin et al. (2018). Data from male and female were compiled as no significant differences were found between the two sexes.

## 4. Discussion

The present study was conducted through an experimental integrative approach, and designed to complement the previously published results in order to deepen knowledge of the biological effects of galvanic anodes. Over the total duration of exposure, the recorded mortality rates of abalones were very low for all conditions except for condition C4 (8.77%), which suggests that from this concentration onwards ( $3,550 \mu\text{g L}^{-1}$ ), the seawater contaminated by the anode caused lethal effects although not massive. These results indicated a relative resistance of abalones to high concentration of aluminium compared to the toxicity of this metal (aluminum chloride or aluminum sulfate) for further marine organisms such as algae (Gillmore et al., 2016; Golding et al., 2015; Leleyter et al., 2016), fishes (Golding et al., 2015; Poléo and Hytterød, 2003) or echinoderms (Golding et al., 2015; Pagano et al., 1996). The results of index condition, weight growth rates, ingestion rates and conversion rates showed that significative sublethal effects appear starting from condition C3. The abalones in conditions C3 and C4 ingested significantly less algae, so suggesting that the contaminated water affected the appetite of the abalones or the appetite for food also exposed to contaminated waters prior being given to abalones. Furthermore, over the 85 days of exposure, the abalones of condition C4 showed a weight loss ( $\text{WGR} = -0.07 \pm 0.02$ ) despite the consumption of algae. The conversion rate was very high which indicates that the abalones did not make reserves at all during the exposure and probably used all the energy for detoxification. The low glycogen content of abalones in condition C4 after 57 days of exposure confirms this hypothesis. During the decontamination phase, the abalones exposed to the C3 concentration have gained weight as shown by their macroalgal appetite and feeding efficiency which was returned to normal levels (compare to the control). The abalones from condition C4 showed a slight increase of their weight which however remained significantly lower than for the other conditions, suggesting that their physiology had been greatly impacted by the contaminated water

during the 85 days of exposure. The ingestion rate was very low for C4 abalones which explains their low glycogen content after 57 days of exposure. However, there was a large increase (20-fold) in the glycogen content of C4 abalone after 85 days of exposure. This important glycogen storage can be correlated to the MGI. At this period of the reproductive cycle, the sharp drop in MGI reflect a massive spawning of abalones, and the results suggest that exposure to high concentrations of metals released by galvanic anodes accelerated abalones' gametogenesis. It has been already observed that chemical contaminations could induced significant spawning in bivalves, notably pesticides in the Pacific oyster (*C. gigas*) (Buisson et al., 2008), and norfluoxetine for the zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and dark false mussels (*Mytilopsis leucophaeata*) at concentrations as low as 5  $\mu$ M (Fong and Biel, 2008). Spawning in marine mollusks is a great energy-demanding process, and it often results in lethal and sublethal stresses during the post-spawning period (Li et al., 2010). However, such a phenomenon can also indicate that the abalones have resorbed their gametes in order to recover energy. Without sufficient energy accumulation during the exposure time, C4 abalones might have started to resorb their gametes in order to increase their glycogen reserves, as observed at 85 days. From a histological point of view, this translates into the dominance of stage V (partial spawning), and stage VI (advanced spawning) while the control abalones were just mature (stage IV).

The present study is the first one to use the Brix index as a biomarker in a gastropod. As a reminder, the Brix index is an indicator of the nutritional status, strongly correlated to the concentrations of proteins, triglycerides, cholesterol, calcium and phosphorus in the hemolymph (Berry et al., 2019). We observed that the Brix index was significantly higher in the hemolymph of abalones exposed to contaminated water at the beginning of the exposure but values returned to the same level as the control at the end of the exposure, suggesting that the abalones acclimated to the high concentrations and regulated their physiology in accordance with the tested experimental conditions.

Regarding results of NRRA assay, there was a strong increase of optical density (OD) for the high exposure concentrations C3 and C4 compared to control, stating an impact on the lysosomal system. A variation of OD can be interpreted by different manners: a change in the stability of lysosomal membranes or a variation in the number and/or the size of lysosomes which constitute the major site of accumulation and homeostasis of metals (Viarengo et al., 1984). Exposure to high metal concentrations in water may overload sequestering capacity of abalones thereby rendering the lysosomal membrane particularly susceptible to excessive ambient concentrations (Viarengo et al., 1981). The release of the neutral red dye into the cytosol following membrane damage could be due to impairment of lysosomal membrane proton pump (Lowe and Pipe, 1994). The internal acid environment of lysosomes is maintained by a membrane  $Mg^{2+}$ ATPase dependent  $H^{+}$  ion proton pump

(Ohkuma et al., 1982). Dysfunction of the pump would lead to a marked increase of the intralysosomal pH and, in the absence of any gradient, free passage of the lysosomal contents, including neutral red into the cytosol. Failure or dysfunction of the proton pump may be a direct consequence of the contamination by metals such as Al and Zn released from anode, or alternatively the result of a reduction in ATP synthesis following contaminant damage to the mitochondria. Thus, damage of the lysosome membrane stability could be the beginning of apoptotic pathway (Nicholson, 2003). In several marine species (e.g. *M. edulis*, *Prochilodus lineatus*, *Carcinus aestuarii*), exposure to trace metals such as Pb or Cu induced a destabilization of the lysosomal system (Aliko et al., 2015; V. Monteiro et al., 2011; Nicholson, 2003). In the present study, exposure to the anode releasing Al and Zn concentrations respectively of the order of 1,096  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 46.7  $\mu\text{g L}^{-1}$  induced disruption of the abalone lysosomal system.

The decrease in hemocyte count confirms the response of the abalone immune system to environmental chemical contamination. In reaction to a pathogen, there is often a short-term increase in circulating hemocytes in abalones which is an inflammatory response to rapidly confront invading microorganisms (Dubief et al., 2017). However, in response to sublethal levels of a pollutant, significant decreases in hemocyte density have been observed in different abalone species (Gopalakrishnan et al., 2009; Min et al., 2015; Mottin et al., 2010). Sublethal levels of nickel drastically reduced the number of hemocytes in the abalone *Haliotis discus hannai* (Min et al., 2015). Moreover, these authors also found an increase in phagocytosis activity and lysosomal activity. In contrast to Al, Zn is an essential trace element for the regulation of many cellular processes (Watanabe et al., 1997). However, in excess, Zn is toxic and generates ROS that damage the organism (Calabrese et al., 1973; Mottin et al., 2012). In a previous study, the *in vitro* exposure of *H. tuberculata* hemocytes to high concentrations of  $\text{ZnCl}_2$  (13.6 and 136  $\text{mg L}^{-1}$ ) has induced a significant decrease in the number of viable hemocytes, a decrease of ROS production, a release of phenoloxidase, an inhibition of phagocytosis capacity, a decrease in acid and alkaline phosphatase activities, as well as an increase in non-specific esterase and lysosome activities and lastly morphological changes in hemocytes (Mottin et al., 2010). Concentrations tested were much higher than in our study but similar effects were reported, especially in terms of hemocyte count. Another study on the Pacific oyster, *C. gigas*, has reported a stimulation of the immune system during a 10 weeks chronic exposure to Zn released by zinc-based galvanic anode (0.53  $\text{mg L}^{-1}$ ) while immune parameters were inhibited during the one week acute exposure (10.2  $\text{mg L}^{-1}$ ) (Mottin et al., 2012). Recently, it was demonstrated in the same oyster species that the exposure to 296  $\mu\text{g L}^{-1}$  of Al resulting from the dissolution of an aluminium-based galvanic anode had induced a 40% decrease for phagocytic efficiency, a 25 % increase of the lysosomal response and a decrease in MDA levels in the digestive gland (Levallois et al., 2022). In the present study, the phagocytic activity

of hemocytes and MDA levels appeared to be only slightly altered by the metallic contamination linked to the galvanic anode degradation but the decrease of the hemocyte density and the modulation of the lysosomal system may be indicative of a weakened immune system. The current C2 concentration was of the same order as the highest concentration tested in the previous study. The absence of biological effect in abalones at this concentration suggested a higher resistance of gastropods compared to bivalves, possibly involving the trophic pathway as the abalone is a grazer and not a filter. Such a difference in feeding regime can potentially modify the mechanisms involved in the intake of contaminants by the abalone. This was the initial hypothesis which led us to add the trophic control (TC) condition. Considering all the biomarkers tested in this study, abalone from the trophic control condition varied significantly for only two parameters: phagocytic activity after 57 days of exposure and after the decontamination phase; and the lysosomal system for all exposure times except 85 days of exposure. The feeding of metal-contaminated algae appeared to have a slight impact on the immunity of abalone, sometimes by stimulating it and sometimes by altering it.

In environment, the highest concentrations of Al measured exceeded  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  in highly polluted seawaters such as in the port city of Antofagasta (Valdés et al., 2011), the Egyptian coast (Abdel Ghani, 2015) or Port Curtis in Australia (Angel et al., 2016). Generally, these are densely populated areas subject to multiple economic and industrial activities as well as waste from old mining operations. In general, Al concentrations in coastal waters rarely exceed  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  while measurements in the open ocean have shown a consistently lower range of dissolved Al concentrations (Tria et al., 2007). In this context, we can suppose that aluminium-based galvanic anodes do not represent a direct health risk to abalones in the marine environment. It is important to remember the importance of zinc and other trace metals such as indium released in the same time by the aluminum-based galvanic anodes. Metal cocktails can result in additive, synergistic, or antagonistic sensitivity (Liu et al., 2017). For example, Cu and Zn mixture has previously been shown to have synergistic effects on embryolarval development in the oyster, *Crassostrea virginica* (MacInnes, 1981), or Cu and Ni in the mussel *M. edulis* (Deruytter et al., 2017). It is generally accepted that the larval stages of animals including molluscs are more sensitive than the adults (Mohammed, 2013). The  $\text{EC}_{50}$  Zn concentrations in embryos of *Haliotis rufescens* were reported at  $68 \mu\text{g L}^{-1}$  for a 48-hour exposure and  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  for a 9-day exposure (Hunt and Anderson, 1989). Therefore, it would be especially interesting to study the impact of aluminium-based galvanic anode degradation products on the larval phases of abalones in order to better characterize the effects on the life cycle of the abalone.

## 5. Conclusion

The present study showed that the metals (principally Al) released by aluminium-based galvanic anodes appears to have some important effects on the health of the abalone *Haliotis tuberculata* but only in case of extremely contaminated environments. We observed marked effects from a determined concentration (C3) ( $[Al] = 1,096 \mu\text{g L}^{-1}$ ), including growth inhibition, disruption of energy reserves and reproductive processes. Results concerning the hemocyte count and the lysosomal system also suggested that the immune system can be affected leading to weakening of the organism and its ability to detoxify, also making them more vulnerable to bacterial infection or environmental stressors. On the other hand, under conditions that are representative of environmental concentrations ( $86.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), the contamination did not induce significant effects in abalones. This study increased the existing database on the biological impact of galvanic anodes, which becomes essential in a context of increasing urbanization of coasts involving corrosion protection systems.

### Acknowledgements

The authors thank the Normandy region and the Seine Normandy water agency (AESN) for their funding. We thank Gwendoline Guichard, Solveig Larssonneur and Vincent Lefebvre from the SMEL structure for their technical assistance.

### Résultats majeurs

- À partir d'une concentration en Al de  $1096 \mu\text{g L}^{-1}$  (concentrations supérieures à celles rencontrées en milieu naturel), des effets négatifs ont été observés sur la physiologie de l'ormeau.
- La croissance a diminué de façon significative et les mesures du taux d'ingestion ont révélé que l'appétit des ormeaux était affecté, ce qui est confirmé par la forte augmentation du taux de conversion qui indique une mauvaise efficacité alimentaire.
- Les réserves énergétiques en glycogène et la reproduction des ormeaux ont été perturbées par la contamination de l'anode galvanique.
- La numération des hémocytes et le système lysosomal suggèrent que le système immunitaire peut être affecté, entraînant un affaiblissement de l'organisme à partir de  $1096 \mu\text{g L}^{-1}$  d'Al.
- La voie trophique ne semble pas être la principale source de contamination.



# Discussion : comparaison des effets des métaux relargués par une anode galvanique à base d'aluminium chez les mollusques

Les résultats des différentes expérimentations présentées dans le chapitre 3 nous permettent d'avoir un premier aperçu de la sensibilité des mollusques aux métaux issus de la dissolution d'une anode galvanique à base d'aluminium. Comme démontré dans le chapitre 1, l'aluminium est reconnu pour être moins toxique que le zinc aux mêmes concentrations et l'effet du cocktail des deux métaux libérés par l'anode n'a jamais été investigué chez les mollusques. Au cours de leur évolution, les mollusques ont développé un ensemble de stratégies efficaces pour se protéger des pathogènes et des stress environnementaux. Cependant, dans un contexte de pollutions aquatiques, les organismes qui y vivent doivent faire face à de nouvelles contraintes qui peuvent affecter considérablement leur santé, par exemple en dégradant leur système immunitaire ou en dérégulant leur capacité de reproduction ce qui peut à terme impacter les populations. L'huître et l'ormeau sont deux mollusques qui présentent deux modes de vie bien distincts. Le premier, en tant qu'organisme sessile, est exposé à des nombreux stress environnementaux comme les variations de température et de salinité, la dessiccation prolongée ainsi que l'exposition à des eaux potentiellement contaminées sans possibilité de se déplacer. De plus, l'huître est amenée à filtrer de grands volumes d'eau pour se nourrir et respirer ce qui peut favoriser un enrichissement en contaminants dans ses tissus. Le deuxième, en tant qu'organisme vagile, a la possibilité de se déplacer si l'environnement est jugé trop stressant. Néanmoins, l'ormeau est un gastéropode qui utilise son pied musculeux comme moyen de locomotion, ce qui l'oblige à rentrer en contact directement avec des substrats ou des sédiments potentiellement contaminés. L'autre grande différence entre les deux modèles réside dans la fonction d'alimentation puisqu'il y a d'un côté un bivalve filtreur microphage qui se nourrit surtout de phytoplancton et de microzooplancton et de l'autre un gastéropode qui broute des macroalgues ainsi que du microphytobenthos lors de ses premiers stades de vie. Nous tâcherons donc dans cette partie de comparer et de détailler point par point les effets que nous avons observé chez les deux espèces.

## 1. Bioaccumulation

La quantification des métaux dans les tissus des huîtres et des ormeaux nous a permis de comparer la bioaccumulation entre les deux espèces. Chez l'huître, les niveaux basals d'aluminium dans les tissus étaient de  $19,70 \pm 5,69 \text{ mg kg}^{-1}$ , tandis que les niveaux basals de zinc étaient beaucoup plus élevés ( $672,46 \pm 96,42 \text{ mg kg}^{-1}$ ). La bioaccumulation de l'aluminium s'est faite très rapidement avec une concentration maximale qui a été atteinte dès les premières 24 heures d'exposition. Nous avons ensuite constaté une épuration de l'aluminium entamée dès la première semaine d'exposition. La bioaccumulation du zinc a été beaucoup moins rapide que l'aluminium mais à la différence de ce

dernier elle s'est faite graduellement, en continue pendant les 3 mois d'exposition. Les faibles BCF rapportés pour l'aluminium (environ 50) indiquent que le bivalve n'est pas hyper accumulateur de ce métal par rapport au zinc pour lequel les BCF ont été beaucoup élevés (environ 10 000).

Chez l'ormeau, les niveaux basals d'aluminium dans les tissus étaient légèrement plus élevés que chez l'huître ( $33,73 \pm 4,06 \text{ mg kg}^{-1}$ ), mais les niveaux basals de zinc étaient plus faibles d'un facteur 3 ( $195,27 \pm 6,92 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Les ormeaux ont bioaccumulé beaucoup plus l'aluminium comparativement aux huîtres. Pour la condition C3, qui présente une concentration en aluminium équivalente dans l'eau entre les deux expositions ( $296 \pm 29 \mu\text{g L}^{-1}$  pour l'huître et  $495 \pm 51 \mu\text{g L}^{-1}$  pour l'ormeau), *H. tuberculata* présentait une concentration d'aluminium dans les tissus de  $980 \pm 46 \text{ mg kg}^{-1}$  contre  $53 \pm 3 \text{ mg kg}^{-1}$  chez l'huître pour un même temps d'exposition de 30 jours, ce qui fait un facteur 18 de différence entre les deux espèces. En revanche, la bioaccumulation du zinc était très faible chez l'ormeau et seule la plus forte concentration d'exposition en métaux issus de l'anode ( $1124,5 \mu\text{g L}^{-1}$  d'Al et  $46,9 \mu\text{g L}^{-1}$  de Zn de la condition C4) a induit une accumulation de zinc significativement plus élevée par rapport au témoin. La différence d'incorporation de l'aluminium est peut-être expliquée par la part plus importante de l'aluminium particulaire pour les concentrations supérieures à  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ . Une fois déposées au fond des bacs, les particules seraient alors plus susceptibles d'être incorporées par les ormeaux qui se déplacent sur toutes les surfaces.

**Ainsi, les deux mollusques n'ont pas présenté les mêmes taux d'accumulation en aluminium et en zinc libérés par l'anode (Figure 42). L'huître a préférentiellement bioaccumulé le zinc tandis que l'ormeau a préférentiellement bioaccumulé l'aluminium.**

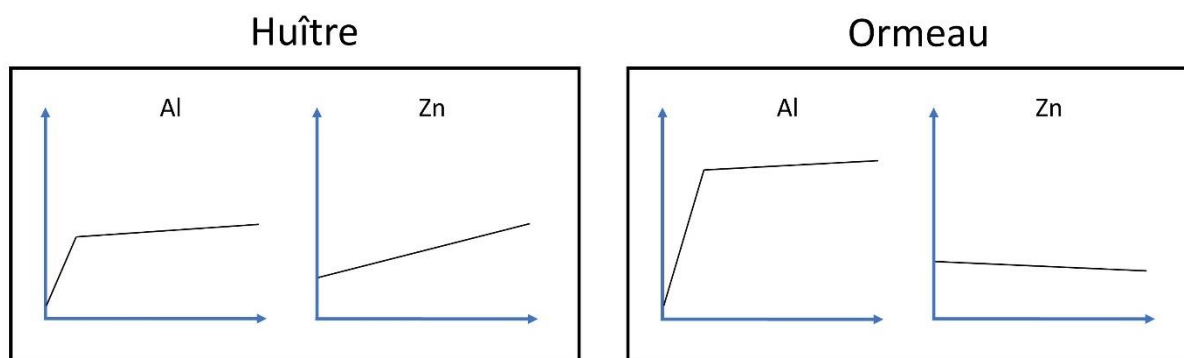


Figure 42 : Comparaison des profils de bioaccumulation au cours du temps de l'aluminium et du zinc issus de la dissolution de l'anode galvanique entre l'huître, *Crassostrea gigas* (article 1), et l'ormeau, *Haliotis tuberculata* (article 3).

Cependant, l'huître et l'ormeau ont montré des profils d'accumulation en aluminium relativement semblables : pour une plus forte concentration en aluminium dans le milieu, les individus analysés ont présenté une plus forte concentration en aluminium dans leurs tissus que les témoins et une fois cette concentration atteinte, elle n'a que très peu évolué au cours des trois mois d'exposition. On peut alors supposer l'atteinte d'un équilibre entre les processus d'entrée et de détoxification du

métal. L'aluminium qui entre dans le cytosol par endocytose s'accumule dans les lysosomes et peut ensuite être éliminé par les processus d'exocytose (Exley and Mold, 2015). Pendant la phase de décontamination, la concentration d'aluminium dans les ormeaux a ensuite drastiquement chuté ce qui conforte cette hypothèse. Les résultats de la condition témoin trophique indiquent que la voie trophique ne semble pas être la cause principale de la bioaccumulation des métaux chez *H. tuberculata*, et donc les ormeaux seraient d'avantage impactés par la pollution du milieu. Il n'a pas été possible de confirmer le même mécanisme chez l'huître pour laquelle nous n'avons pas pu mettre en place une phase de décontamination.

## 2. Croissance

La croissance des huîtres n'a pas été impactée de manière significative au cours de l'exposition. L'absence de marquage individuel lors de cette expérimentation n'a pas permis le calcul de taux de croissance aussi précis que lors de l'expérimentation des ormeaux. De plus, la plus forte concentration testée chez les huîtres ( $296 \mu\text{g L}^{-1}$  d'aluminium) n'a eu que très peu d'impact sur la physiologie des huîtres et il aurait fallu tester une concentration supplémentaire pour pouvoir calculer des  $\text{CE}_{50}$  et comparer ces données avec les ormeaux.

Les ormeaux se sont révélés être de très bons modèles pour étudier la croissance après 3 mois d'exposition grâce à leur croissance très rapide. Les  $\text{CE}_{50}$  de la croissance pondérale et de la croissance linéaire étaient respectivement de  $1\,690,7 \mu\text{g L}^{-1}$  et de  $2\,007,6 \mu\text{g L}^{-1}$  chez les juvéniles. On aurait pu s'attendre à ce que les ormeaux juvéniles soient beaucoup plus sensibles que les adultes, et pourtant concernant ces derniers, la  $\text{CE}_{50}$  pour la croissance pondérale a été évaluée à  $589,5 \mu\text{g L}^{-1}$  contre  $1\,690,7 \mu\text{g L}^{-1}$  chez les juvéniles. Par conséquent, la prise de poids des adultes a été d'avantage impactée que celle des juvéniles qui présentaient pourtant des courbes de croissance bien plus rapides. Dans les deux cas, le taux d'ingestion des ormeaux a été impacté systématiquement à partir de la concentration C3 ( $494,9 \mu\text{g L}^{-1}$  d'Al chez les ormeaux juvéniles et  $1\,096,3 \mu\text{g L}^{-1}$  d'Al chez les ormeaux adultes), ce qui indique que l'appétit des gastéropodes a été impacté par la forte contamination en aluminium dans le milieu. De plus, nous avons observé des phénomènes de dépigmentation chez les individus exposés aux conditions les plus fortes. Des phénomènes similaires ont déjà été rapportés dans la littérature, notamment chez des juvéniles de *Halotis rufescens* qui présentaient une dépigmentation en réponse à de l'oxygène sursaturé (Elston, 1983), ou chez plusieurs espèces de carpes indiennes en réponse au cadmium et au zinc ( $40 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Rani et al., 2017). Le pied des ormeaux étant en contact permanent avec les parois du réservoir, les métaux peuvent être adsorbés en quantité par les mollusques. Dans sa thèse, Barbarin (2022) a notamment constaté la formation d'un dépôt blanchâtre au fond des bacs après la dissolution d'une anode galvanique lors de leurs expérimentations sur les pétoncles (Barbarin, 2022). Ce dépôt calcomagnésien composé de

métaux sous formes dissoute, particulaire et nano particulaire (Refait et al., 2015), est peut-être à l'origine de la dépigmentation observée chez ormeaux. Dans l'environnement, une telle dépigmentation peut affecter le camouflage de l'ormeau, pouvant entraîner une augmentation de la pression de prédation car un individu affecté serait plus visible pour les prédateurs. En comparaison, en tant que bivalve l'huître est moins vulnérable à une dépigmentation de ses tissus mous.

**Les  $CE_{10}$  pour l'aluminium de la croissance pondérale des ormeaux adultes ( $333 \mu\text{g L}^{-1}$ ) et juvéniles ( $310 \mu\text{g L}^{-1}$ ) sont légèrement supérieures à la plus forte concentration testée chez l'huître ( $296 \mu\text{g L}^{-1}$ ) pour laquelle nous n'avons pas constaté d'effets de l'anode galvanique sur la prise de masse et la longueur de la coquille. Seules les concentrations plus élevées ont permis de mettre en évidence un impact chez l'ormeau. Par conséquent, il est difficile de dire lequel des deux mollusques a eu sa croissance la plus impactée mais il serait intéressant de refaire des expérimentations chez l'huître avec ces concentrations plus élevées afin de pouvoir comparer pleinement les 2 modèles.**

### 3. Hémocytes, activité phagocytaire et ROS

L'effet des métaux sur la numération hémocytaire et la phagocytose des hémocytes de mollusques est étudié depuis plusieurs dizaines d'années (Cheng and Sullivan, 1984; Geffard et al., 2001). De fortes concentrations en métaux peuvent entraîner la mort des hémocytes par lyse ainsi que des changements dans les proportions des différents types cellulaires, à savoir les granulocytes et les hyalinocytes. Ces phénomènes sont bien documentés chez plusieurs espèces de bivalves, comme chez la palourde *Tegillarca granosa* en réponse au cadmium (Shi et al., 2018), chez la moule *Mytilus edulis* en réponse au cuivre (Pipe et al., 1999), chez l'huître *Crassostrea hongkongensis* en réponse au zinc (Luo and Wang, 2022), ou encore chez *Crassostrea gigas* en réponse au zinc ( $10,2 \pm 1,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) issu de la dissolution d'une anode galvanique (Mottin et al., 2012). Dans nos conditions expérimentales, les concentrations testées n'ont pas eu d'impact sur la numération hémocytaire des huîtres pour des concentrations en zinc bien plus faibles. En comparaison, les résultats de l'article 4 révèlent une baisse significative du nombre d'hémocytes circulants chez les ormeaux à partir de la concentration C3 ( $[\text{Al}] = 1096 \mu\text{g L}^{-1}$  et  $[\text{Zn}] = 47 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Lors d'expositions *in vitro*, Mottin et al. (2010) ont défini la  $CL_{50}$  des hémocytes de *H. tuberculata* après 24 h à  $20\,529 \mu\text{g L}^{-1}$  de zinc ce qui est bien plus élevé que lors de notre exposition, mais dans cette étude le zinc était le principal constituant de l'anode galvanique (99,9% de la masse).

Au cours de nos études chez les deux espèces de mollusques, nous avons aussi constaté un effet sur l'activité phagocytaire des hémocytes (non significatif) et aucun effet sur la production de ROS des hémocytes. Les hémocytes des huîtres ont présenté une baisse de l'activité phagocytaire de près de 40 % pour la plus forte concentration d'Al testée ( $296 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Chez les ormeaux, après 85 jours d'exposition ainsi que pendant la phase de décontamination, une diminution de 25 % de l'activité

phagocytaire a été mesurée pour les ormeaux dans la condition C2 ( $425 \mu\text{g L}^{-1}$  d'Al), ce qui est une concentration proche de celle à laquelle des effets semblables ont été relevés chez l'huître. Cependant, pour les deux concentrations supérieures testées (C3 et C4), l'activité phagocytaire des hémocytes d'ormeaux a été stimulée. Généralement, pour la plupart des métaux, de faibles concentrations ont pour effet de stimuler la phagocytose tandis que de fortes doses vont induire une mortalité hémocytaire et ainsi inhiber l'activité phagocytaire des cellules (Sauve et al., 2002). Le processus de phagocytose est dépendant des propriétés membranaires, et certains auteurs ont suggéré que l'inhibition de la phagocytose aux métaux pourrait ainsi être due à des altérations de la membrane cellulaire et une désorganisation du cytosquelette, qui à terme entraîne une inhibition de la mobilité des hémocytes (Grundy et al., 1996; Hannam et al., 2009). L'affinité de certains métaux comme le zinc pour les groupes SH des protéines transmembranaires  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase pourrait expliquer cet effet (Viarengo et al., 1993). Mottin et al. (2012) avaient précédemment constaté que la production de ROS était positivement corrélée à la capacité de phagocytose, les deux biomarqueurs suivant une tendance de type hormétique. Lors d'expositions chroniques au zinc issu de la dissolution d'une anode galvanique, les auteurs ont observé une augmentation de la phagocytose et de la production de ROS chez l'huître creuse *C. gigas* tandis qu'une exposition aiguë à une plus forte concentration a induit une diminution des deux biomarqueurs. Dans notre étude, nous avons obtenu le résultat inverse avec le modèle ormeau. Cependant, l'anode utilisée est différente (anode en Al vs anode en Zn) et donc la quantité de zinc libérée est différente entre ces 2 études.

**Dans nos conditions expérimentales, malgré certains effets constatés sur la phagocytose et la numération hémocytaire, les concentrations d'aluminium et de zinc testées n'ont eu que peu d'impact sur la capacité immunitaire des hémocytes des huîtres et des ormeaux. En comparaison avec les niveaux de contamination retrouvés dans l'environnement, les mollusques possèdent encore une capacité d'adaptation immunitaire.**

#### 4. Système lysosomal

Le test du rouge neutre a permis une évaluation du système lysosomal des hémocytes chez les deux espèces de mollusques. Que cela soit chez l'huître ou chez l'ormeau, les résultats obtenus au spectrophotomètre indiquent une modulation du système lysosomal. Chez l'huître, la densité optique était légèrement plus élevée pour les concentrations C2 ( $[\text{Al}] = 125 \mu\text{g L}^{-1}$ ) et C3 ( $[\text{Al}] = 296 \mu\text{g L}^{-1}$ ) même si la différence par rapport au témoin n'était pas significative. Chez l'ormeau, nous avons constaté une hausse significative de la densité optique à partir de la concentration C3 ( $[\text{Al}] = 1\,096 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Cependant, pour une concentration équivalente à celle de l'huître, aucun effet n'est mesuré. Chez les deux espèces, cette variation peut être interprétée comme un changement dans la stabilité des membranes lysosomales, une déficience de la pompe à protons de la membrane lysosomal ou une variation du

nombre et/ou de la taille des lysosomes qui constituent le site majeur d'accumulation et d'homéostasie des métaux (Lowe and Pipe, 1994; Viarengo et al., 1981). Pour les fortes concentrations, l'aluminium et le zinc ont pu surcharger la capacité de séquestration des mollusques, rendant ainsi la membrane lysosomale particulièrement sensible aux concentrations ambiantes excessives.

**Les résultats enregistrés au cours de nos deux études témoignent de la sensibilité de ce biomarqueur chez les mollusques en réponse à l'exposition à de fortes concentrations de métaux issus de la dissolution de l'anode galvanique. Cependant, il n'y a aucun effet pour des concentrations environnementales.**

## 5. MDA

L'accumulation de MDA est une des manifestations du stress oxydant, un indicateur de la peroxydation lipidique correspondant à l'oxydation des acides gras polyinsaturés par des ROS ou des enzymes. L'ordre de grandeur des valeurs de MDA rapportées au cours de ces travaux de thèse chez l'huître et l'ormeau sont concordantes avec les résultats d'autres études sur des huîtres exposées aux pesticides (glyphosate et Roundup Express) qui étaient de l'ordre de 10 nmol mg de protéines<sup>-1</sup> (Mottier et al., 2015; Séguin et al., 2017). Chez les huîtres nous avons observé une baisse significative de la concentration en MDA dans la glande digestive pour la plus forte concentration d'exposition. Cette diminution de la peroxydation lipidique peut s'expliquer par une défense antioxydante assurée par d'autres enzymes et protéines plus sensibles (CATs, glutathion S-transférase, métallothionéines). Concernant les ormeaux, des concentrations d'aluminium bien plus élevées que chez l'huître n'ont pas engendré de variations significatives des niveaux de MDA, que cela soit dans la glande digestive ou dans les branchies.

**Nos résultats semblent indiquer que la peroxidation lipidique est un biomarqueur moins sensible au cocktail de l'anode galvanique chez *H. tuberculata* par rapport à *C. gigas*.**

## 6. Réserves énergétiques et reproduction

Les teneurs en glycogène dosées chez les deux espèces ont montré des fluctuations au cours des 3 mois d'exposition. On constate une tendance générale à la baisse de la teneur en glycogène des huîtres exposées aux plus fortes concentrations d'aluminium et de zinc malgré l'absence d'impact significatif, même à 296 µg L<sup>-1</sup> d'Al. Chez les ormeaux de la condition la plus extrême (3 550 µg L<sup>-1</sup> d'Al), les réserves énergétiques étaient significativement plus basses après 2 mois d'exposition mais de façon surprenante, la teneur en glycogène était près de 20 fois supérieure le mois d'après pour la même condition. Dans l'article 4, nous avons suggéré que cela était probablement en lien avec le décalage observé dans la gamétogenèse, les ormeaux des conditions les plus fortes ayant résorbé leurs gamètes afin de subvenir à leurs autres fonctions physiologiques. La lutte contre le stress qu'il soit chimique ou

environnemental a un impact important sur la balance énergétique des organismes aquatiques (Nicholson and Lam, 2005; Sokolova, 2013).

D'après Sokolova (2013), l'énergie des mollusques vivants dans les environnements contaminés est dirigée préférentiellement vers les processus de détoxification qui sont coûteux en énergie, comme en témoigne l'état du système lysosomal, au détriment de la mise en réserve et de la croissance. Les ormeaux exposés aux fortes concentrations n'ont ni été en mesure de stocker de l'énergie, ni de l'investir pleinement dans d'autres fonctions biologiques. Chez l'huître, les concentrations d'exposition était beaucoup moins élevées et nous n'avons pas observé d'effet aussi marqué que chez les ormeaux, mais on peut supposer qu'un temps d'exposition plus long ou une concentration plus élevée aurait également impacté les processus énergétiques des bivalves. Les résultats du dosage du glycogène sont donc en adéquation avec ce qui a été constaté dans le calcul du MGI chez les deux espèces. Aucun décalage dans l'avancement de la gamétogenèse n'a été constaté chez les huîtres car la contamination n'était pas encore suffisamment forte pour entraver la balance énergétique des bivalves tandis que le retard constaté chez les ormeaux des conditions C3 et C4 peut s'expliquer par la nécessité de mettre en place des réponses de détoxification coûteuses en énergie, qui ont eu pour conséquence la diminution de l'allocation d'énergie à la fonction de reproduction.

**Ainsi, la reproduction des ormeaux a été d'avantage impactée par les métaux libérés par l'anode galvaniques que celle de l'huître. Ces différences ont été mesurées pour des concentrations plus fortes que celles retrouvées dans l'environnement. Il faudrait tester des concentrations équivalentes chez l'huître afin de vérifier l'occurrence d'un décalage de la gamétogenèse.**

## 7. Phase larvaire

L'essai d'embryotoxicité de *C. gigas* présenté dans l'article 2 confirme que le stade larvaire est bien plus sensible que l'adulte comme ce qui est généralement constaté dans la littérature (Amiard-Triquet et al., 1986; Chan, 1988; Martin et al., 1981; Nadella et al., 2013; Watling, 1982). Cette plus grande sensibilité des larves peut s'expliquer par plusieurs raisons :

- (1) Le temps nécessaire pour que les substances toxiques atteignent les sites cibles peut être plus court dans les premiers stades de la vie, en raison de leur plus petite taille par rapport aux stades ultérieurs et aux adultes.
- (2) Les formes embryonnaires et larvaires ont des organes peu développés, une plus grande surface d'absorption pour les substances toxiques avec des membranes plus perméables qui, aux premiers stades de vie, sont le principal moyen de régulation ionique.

- (3) Chez les adultes, les polluants peuvent être séquestrés les empêchant d'atteindre les organes cibles. Les larves n'ont pas encore développé tous les mécanismes de régulation nécessaires à la détoxification et à la réduction des effets des substances toxiques.

Cette immaturité des voies de détoxification chez les premiers stades de vie est probablement à la base de la sensibilité observée chez l'huître (Mohammed, 2013). Le développement des larves D a été affecté à partir de concentrations de l'ordre de  $190 \mu\text{g L}^{-1}$  d'aluminium ( $\text{CE}_{50}$ ), ce qui est du même ordre de grandeur que les maximums environnementaux enregistrés sur des sites considérés comme pollués (Abdel Ghani, 2015; Jahan and Strezov, 2017; Valdés et al., 2011). Il suffit que les larves d'une espèce soient affectées pour que la phase de recrutement soit compromise (Markey et al., 2007). C'est pourquoi il est impératif d'inclure le stade larvaire des organismes dans les études écotoxicologiques. Nous n'avons pas eu l'occasion de réaliser d'essai embryotoxicité sur les larves d'*H. tuberculata* au cours de cette thèse, mais il aurait été très intéressant de comparer les résultats avec l'huître.

À titre d'indication, des concentrations en zinc de  $39 \mu\text{g L}^{-1}$  pour une exposition de 48 heures et de  $19 \mu\text{g L}^{-1}$  pour une exposition de 9 jours n'ont pas eu d'impact sur le développement larvaire de *Haliotis rufescens* (Hunt and Anderson, 1989). Les auteurs ont respectivement évalué les  $\text{CE}_{50}$  à  $68 \mu\text{g L}^{-1}$  et  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  pour les deux temps d'exposition. **Au regard des données de la littérature, le genre *Haliotis* serait donc plus sensible au zinc que *C. gigas* lors du développement larvaire. Cependant, à notre connaissance il n'existe pas de données dans la littérature concernant la sensibilité des larves d'ormeaux à l'aluminium.**

Les huîtres et les ormeaux adultes ne semblent pas avoir été affectés pour des concentrations d'aluminium et de zinc réalistes d'un point de vue environnemental. Pour une concentration de  $296 \mu\text{g L}^{-1}$  (Al) nous avons constaté une augmentation significative des niveaux de MDA dans la glande digestive des huîtres. La  $\text{CE}_{20}$  de la croissance pondérale des ormeaux juvéniles a été évaluée à  $442,8 \mu\text{g L}^{-1}$  (Al). Chez les ormeaux adultes, des effets significatifs ont été observés à partir de  $1\,096 \mu\text{g L}^{-1}$  (Al), notamment une diminution de la numération hématocytaire, une hausse de l'activité du système lysosomal, une baisse des réserves de glycogène associée à un décalage de la gamétogenèse. Les larves d'huîtres apparaissent comme le modèle d'étude le plus sensible avec une  $\text{CE}_{20}$  évaluée à  $174,5 \mu\text{g L}^{-1}$  (Al). La sensibilité des biomarqueurs étudiés n'était pas la même entre les deux mollusques. Chez les huîtres, le dosage du MDA et l'activité phagocytaire sont apparus comme les biomarqueurs les plus sensibles aux métaux ; tandis que chez les ormeaux ce sont la croissance, le système lysosomal et la gamétogenèse qui sont apparus comme les biomarqueurs les plus sensibles aux métaux. Les principaux résultats de toutes les expérimentations réalisées sur les mollusques sont synthétisés dans le tableau XVI.



Tableau XVI : Synthèse des effets rapportés chez les différents mollusques étudiés au cours des travaux de thèse. Les  $CE_x$  sont basées sur les concentrations d'aluminium dans l'eau.

| Mollusques                            | Huîtres adultes<br>(Article 1)                                                                                                                                                                                     | Larves d'huîtres<br>(Article 2)                                                                                                                                  | Ormeaux juvéniles<br>(Article 3)                                                                                                                                                                                  | Ormeaux adultes<br>(Article 4)                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bioaccumulation                       | Bioaccumulation Zn>Al<br>Pour la plus forte concentration d'exposition ([Al]=296 $\mu\text{g L}^{-1}$ ) :<br>• BCF Al = 60<br>• BCF Zn = 9395                                                                      | ND                                                                                                                                                               | Bioaccumulation Al>Zn<br>Pour la plus forte concentration d'exposition ([Al]=1124 $\mu\text{g L}^{-1}$ )<br>• BCF Al = 180<br>• BCF Zn = 787                                                                      | ND                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Croissance<br>Développement           | Pas d'effets significatifs à la plus forte concentration testée ([Al]=296 $\mu\text{g L}^{-1}$ )                                                                                                                   | $CE_{10} = 165,9 \mu\text{g L}^{-1}$<br>$CE_{20} = 174,5 \mu\text{g L}^{-1}$<br>$CE_{50} = 190,2 \mu\text{g L}^{-1}$<br><br>Toxicité $AlCl_3$ > Anode galvanique | Croissance pondérale<br>$CE_{20} = 442,8 \mu\text{g L}^{-1}$<br>$CE_{50} = 1690,7 \mu\text{g L}^{-1}$<br><br>Croissance linéaire<br>$CE_{20} = 494,2 \mu\text{g L}^{-1}$<br>$CE_{50} = 2007,6 \mu\text{g L}^{-1}$ | Croissance pondérale<br>$CE_{20} = 332,2 \mu\text{g L}^{-1}$<br>$CE_{50} = 589,5 \mu\text{g L}^{-1}$<br><br>Croissance linéaire<br>$CE_{20} = 352,4 \mu\text{g L}^{-1}$<br>$CE_{50} = 2175,6 \mu\text{g L}^{-1}$                                                                                   |
| Paramètres<br>biologiques<br>affectés | Diminution de l'activité phagocytaire de 40% mais non significatif ([Al]=296 $\mu\text{g L}^{-1}$ )<br><br>Augmentation significative des niveaux de MDA dans la glande digestive ([Al]=296 $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | Effets antagonistes et additifs du cocktail de métaux de l'anode<br><br>Effets additifs et synergiques du cocktail de métaux $AlCl_3$ et $ZnCl_2$                | Observation de phénomènes de dépigmentation du pied                                                                                                                                                               | Effets significatifs à partir d'une concentration d'exposition de [Al]=1096 $\mu\text{g L}^{-1}$<br><br>Décalage de la gamétogenèse associé à une baisse des réserves énergétiques de glycogène<br><br>Diminution de la numération hématocyttaire<br><br>Hausse de l'activité du système lysosomal |
| Sensibilité<br>de l'organisme         | Peu sensible                                                                                                                                                                                                       | Sensible                                                                                                                                                         | Peu sensible                                                                                                                                                                                                      | Peu sensible                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

## CHAPITRE IV – Effets d’une anode galvanique à base d’aluminium chez les producteurs primaires

# 1. Introduction

Dans le cadre de ces travaux de thèse, plusieurs expositions ont été réalisées sur trois compartiments biologiques de la production primaire : le phytoplancton, les macroalgues et le microphytobenthos. Trois indicateurs ont systématiquement été étudiés : (i) la croissance, (ii) l'absorption et l'adsorption des métaux par les organismes et (iii) les paramètres photosynthétiques. Évaluer la croissance des organismes est le biomarqueur le plus utilisé dans les études écotoxicologiques sur les organismes photosynthétiques. Le processus de division cellulaire demande une grande quantité d'énergie (Hunter and Laws, 1981), et une contamination du milieu peut engendrer une allocation de l'énergie pour les processus de detoxification au détriment de la croissance, reflétant donc un impact sur l'état de santé des organismes (Harford et al., 2011; Levy et al., 2007; Taylor and Maher, 2014; Trenfield et al., 2015).

## 1.1. La photosynthèse

La photosynthèse est le processus bioénergétique qui permet aux producteurs primaires de transformer l'énergie électromagnétique de la lumière en énergie chimique. Ce processus est apparu chez les cyanobactéries il y a 3 milliards d'années (Karl, 2002). Ce n'est que bien plus tard que certains groupes ont acquis la possibilité d'effectuer la photosynthèse suite à des endosymbioses successives (Bhattacharya et al., 2004). Deux photosystèmes situés dans les membranes des thylakoïdes, nommées photosystème I (PSI) et photosystème II (PSII), coopèrent au bon déroulement de la photosynthèse oxygénique (Schubert, 1998). D'un point de vue structurel, les photosystèmes sont des complexes protéiques transmembranaires composés d'un centre réactionnel (CR) surmonté d'une antenne pigmentaire. La photosynthèse se déroule en deux phases. Lors de la première phase dite « claire », un photon est absorbé par l'antenne photosynthétique (LHCII) qui achemine cette énergie lumineuse au niveau du PSII pour scinder les molécules d'eau ( $H_2O$ ) en oxygène ( $O_2$ ), en protons ( $H^+$ ) et en électrons ( $e^-$ ). Les  $H^+$  sont utilisés dans la formation d'une coenzyme qui stocke l'énergie chimique, l'ATP (adénosine triphosphate), alors que les  $e^-$  parcourent une chaîne de transfert entre les PSI et PSII aboutissant à la production d'une coenzyme réductrice, le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit), c'est la chaîne de transport des électrons. Lors de la seconde phase, dite « sombre » (cycle de Calvin), ces coenzymes sont alors utilisées pour l'absorption et la réduction du carbone dans le cytosol. L'aboutissement de ces deux étapes est la transformation du  $CO_2$  en glucose, indispensable à la formation des autres molécules organiques nécessaires à la physiologie de ces producteurs primaires.

Au cours de ces expérimentations, l'utilisation d'un fluorimètre de type PAM (pulse amplitude modulated fluorescence) a permis l'acquisition de résultats sur l'impact des produits de dégradation

d'une anode galvanique à base d'aluminium sur les mécanismes photosynthétiques des producteurs primaires. Plusieurs types de PAM ont été utilisés en fonction des différents modèles biologiques étudiés.

## 1.2.Principe du PAM et description des paramètres photosynthétiques

Lorsqu'une cellule végétale reçoit un rayonnement lumineux, elle absorbe l'énergie sous la forme de photons et la restitue sous trois autres formes : (i) des électrons pour la phase photochimique et la photosynthèse, (ii) de la chaleur, (iii) et de la fluorescence. Le PSII, composé d'enzymes oxydoréductases, capte une partie des photons et les convertit en électrons ce qui amorce le début de la phase photochimique. Ces électrons se fixent alors sur des accepteurs d'électrons, le principal étant la quinone A ( $Q_A$ ). De fait, le PSII catalyse une réaction de réduction du pool de  $Q_A$  en la transformant en plastoquinone, une coenzyme participant à la chaîne de transport des électrons vers le photosystème I (PSI) intervenant dans le cycle de Calvin. Une fois la  $Q_A$  saturée en électrons (centre réactionnel fermé), l'énergie lumineuse ne peut plus être dirigée vers le PSI et est donc convertie sous forme de fluorescence ou de chaleur (Figure 43). La capacité photosynthétique dépend de la concentration et/ou de l'activité de la Rubisco (enzyme clé de la photosynthèse permettant la fixation du dioxyde de carbone  $CO_2$ ), ainsi que des différents composants de la chaîne de transport des électrons (MacIntyre et al., 2002).

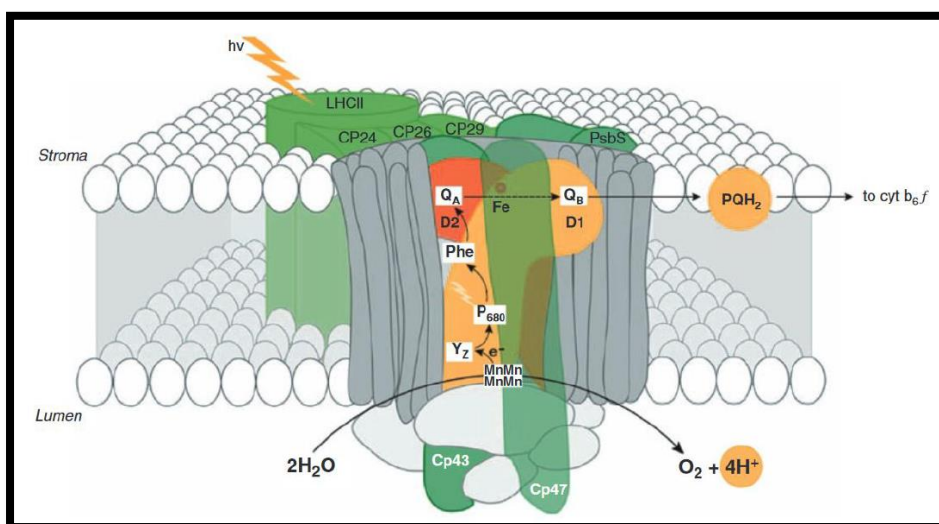


Figure 43 : Organisation du photosystème II (PSII) avec visualisation de la chaîne de transport des électrons. D'après (Suggett et al., 2010).

Le PAM est une technique qui se base sur la fluorescence de la chlorophylle a pour faire une estimation rapide des paramètres photosynthétiques de la production primaire (Schreiber et al., 1986). Pour cela, un échantillon (suspension d'algues) est exposé à des flashes lumineux d'intensité et de longueurs d'onde variables. Généralement l'échantillon est exposé d'abord à une lumière

déTECTrice qui oxyde partiellement le pool de  $Q_A$ . Ainsi, une partie des photons continue à être transformée en énergie photochimique et une autre partie est transformée en énergie fluorescente. Cette fluorescence est considérée comme la fluorescence de base des algues et se nomme  $F_0$ . L'échantillon est ensuite exposé à un flash lumineux de forte intensité qui oxyde tout le pool de  $Q_A$ . Une grande partie de l'énergie est convertie en fluorescence ce qui correspond à la fluorescence maximale des microalgues ( $F_m$ ).  $F_v$  correspond à la fluorescence variable ( $F_v = F_m - F_0$ ) et le rendement quantique maximal du PSII ( $F_v/F_m$ ) est calculé tel quel (Genty et al., 1989):

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{(F_m - F_0)}{F_m}$$

Cet indicateur est généralement utilisé comme un outil d'évaluation du stress dans la photosynthèse chez les végétaux. Sa valeur est relativement constante dans une culture non stressée et diminuée dans une culture stressée (White et al., 2011). Une valeur de  $F_v/F_m$  de l'ordre de 0,6 traduit un très bon état physiologique de la culture de microalgues et/ou d'une bonne acclimatation, une valeur de 0,4 un état physiologique moyen, et enfin une valeur de 0,2 correspond à un très mauvais état physiologique (Kromkamp et al., 1998).

D'autres indicateurs importants sont le taux de transport des électrons (ETR) ainsi que le taux de transport linéaire des électrons (rETR) qui sont corrélés avec la performance photosynthétique globale du phytoplancton (Juneau and Harrison, 2005). Ces indicateurs permettent de tracer une courbe production/énergie (PE) qui se caractérise par trois régions principales : la région limitée par la lumière, la région de saturation de la lumière et la région de photorégulation (Figure 44) (Schreiber, 2004). La pente observée aux faibles éclairissements correspond à l'efficacité maximale d'utilisation de la lumière et se nomme  $\alpha$ . Lorsque l'intensité lumineuse augmente, le taux de photosynthèse, qui est limité par la capacité de transport de la chaîne des électrons, atteint progressivement sa valeur maximale et on observe alors un plateau sur la courbe, c'est la région de saturation de la lumière. Cela nous renseigne sur le taux de transport maximum des électrons (ETRmax). Après l'atteinte du plateau, il peut se produire une réduction de l'activité photosynthétique ce qui correspond à de la photoinhibition provoquée par un temps d'exposition trop long ou par de la lumière trop intense. Le paramètre  $E_k$  peut également être calculé où  $E_k = \alpha / \text{ETRmax}$ , ce qui correspond à l'intensité lumineuse à partir de laquelle le nombre de photons arrivant au niveau du PSII dépasse la capacité de transport de la chaîne des électrons (intensité de saturation lumineuse). Ce paramètre est couramment utilisé pour décrire le niveau de photoacclimatation du phytoplancton. Graphiquement, la valeur  $E_k$  se situe au point d'intersection entre la pente initiale de la courbe et le plateau. Le quenching non photochimique (NPQ) est un autre indicateur lié à la dissipation non photochimique de la lumière absorbée. Le NPQ augmente avec la diminution de l'émission de fluorescence liée au PSII (Müller et

al., 2001), il constitue un mécanisme photoprotecteur important contre la photoinhibition, et dont l'excès d'énergie est dissipé sous forme de chaleur (Janik et al., 2008).

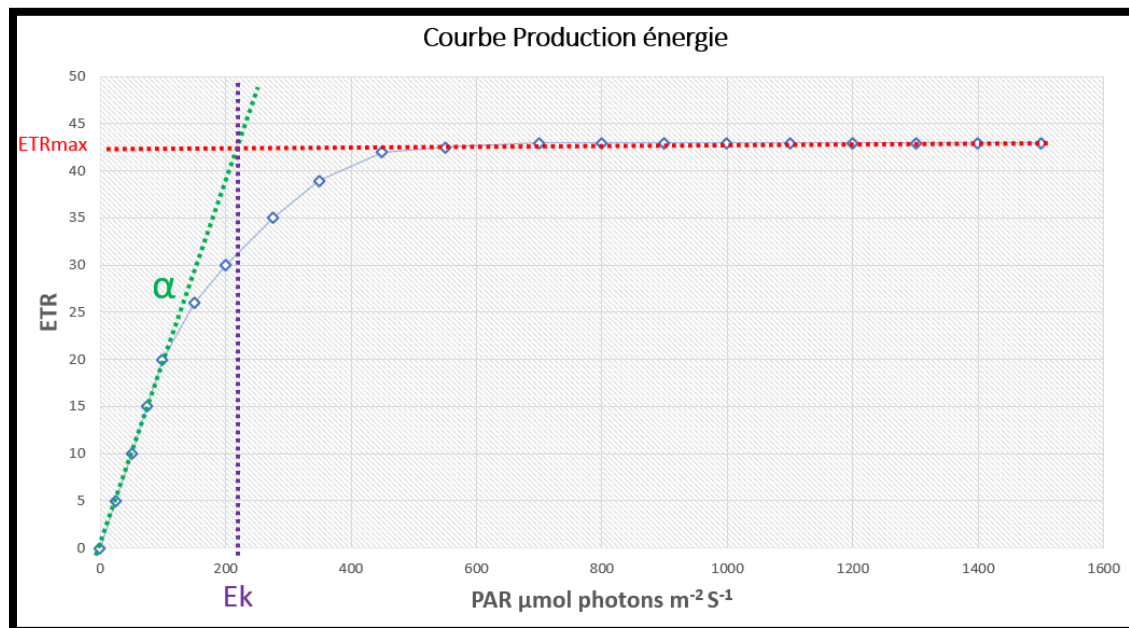


Figure 44 : Exemple d'une courbe production énergie (PE) avec les différents indicateurs photosynthétiques.  
© A. Levallois.

Par soucis de clarté, les méthodologies spécifiques à chaque expérimentation seront présentées séparément.

## 2. Le Phytoplancton

Les expérimentations réalisées sur le phytoplancton peuvent se diviser en deux approches distinctes.

- Approche 1 : Un premier volet d'investigations a démarré en février 2020, mais a été interrompu par la pandémie, avant d'être repris de novembre 2020 à mars 2021. Ces expositions se sont portées uniquement sur l'impact des métaux issus de la dissolution d'une anode galvanique à base d'aluminium sur la diatomée *Chaetoceros calcitrans*, où il avait été décidé à l'origine de ne pas enrichir le milieu d'exposition en sels nutritifs afin d'obtenir des conditions qui se rapprochent au mieux des conditions environnementales.
- Approche 2 : Un deuxième volet d'expérimentations a démarré en juin 2022 avec cette fois des expositions réalisées sur 3 espèces de microalgues de différents groupes taxonomiques présentant un certain intérêt écologique et/ou économique (*Emiliana huxleyi*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*). Il était question de comparer les résultats des effets du chlorure d'aluminium avec les métaux (Al et autres métaux traces) libérés par l'anode galvanique. Cette

fois-ci, les milieux d'exposition ont été enrichis en sels nutritifs afin de répondre au protocole de la norme AFNOR (NF EN ISO 10253, 2006).

## 2.1.Méthodologie

### 2.1.1. Origine des organismes

La souche de microalgue *Elmiliania huxleyi* (Ae481) a été fournie par Alcobank (Calvados, France). Les autres souches (*Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*) ont été fournies par le SMEL (Manche, France).

### 2.1.2. Protocole d'exposition

Toutes les microalgues ont été acclimatées aux conditions expérimentales plusieurs semaines avant le lancement des expérimentations. Toutes les cultures ont été disposées dans une pièce thermorégulée (16°C, photopériode de 14-10 h) avec une intensité lumineuse de 70  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Avant de démarrer l'exposition (5 à 6 jours avant), un inoculum de culture a été préparé avec du milieu nutritif afin de s'assurer que les microalgues étudiées soient en phase de croissance exponentielle. Lors des essais de l'approche 2, nous avons également ajouté du milieu nutritif dont la composition est décrite dans le Tableau XVII issu de la norme AFNOR (NF EN ISO 10253, 2006). Le  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  a été remplacé par de l'acide citrique car l'EDTA peut entraîner une perte de biodisponibilité des métaux pour les algues.

Tableau XVII : Concentrations des différents éléments nutritifs nécessaires à la réalisation des trois solutions mères nutritives (NF EN ISO 10253, 2006).

| Nutriment                                           | Concentration dans la solution mère | Concentration dans la solution d'essai               |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Solution mère 1</b>                              |                                     |                                                      |
| $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$           | 48 $\text{mg L}^{-1}$               | 149 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fe)                        |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$           | 44 $\text{mg L}^{-1}$               | 605 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Mn)                        |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$           | 45 $\text{mg L}^{-1}$               | 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Zn)                        |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$           | 0.157 $\text{mg L}^{-1}$            | 0.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cu)                        |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$           | 0.404 $\text{mg L}^{-1}$            | 1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Co)                        |
| $\text{H}_3\text{BO}_3$                             | 1 140 $\text{mg L}^{-1}$            | 3.0 $\text{mg L}^{-1}$ (B)                           |
| $\text{Na}_2\text{EDTA}$                            | 1 000 $\text{mg L}^{-1}$            | 15.0 $\text{mg L}^{-1}$                              |
| $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$                    | 606 $\text{mg L}^{-1}$              |                                                      |
| <b>Solution mère 2</b>                              |                                     |                                                      |
| Chlorhydrate de thiamine                            | 50 $\text{mg L}^{-1}$               | 25 $\mu\text{g L}^{-1}$                              |
| Biotine                                             | 0.01 $\text{mg L}^{-1}$             | 0.005 $\mu\text{g L}^{-1}$                           |
| Vitamine B12 (cyanocobalamine)                      | 0.10 $\text{mg L}^{-1}$             | 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$                            |
| <b>Solution mère 3</b>                              |                                     |                                                      |
| $\text{K}_3\text{PO}_4$                             | 3.0 $\text{g L}^{-1}$               | 3.0 $\text{mg L}^{-1}$ ; 0.438 $\text{mg L}^{-1}$ P  |
| $\text{NaNO}_3$                                     | 50.0 $\text{g L}^{-1}$              | 50.0 $\text{mg L}^{-1}$ ; 8.24 $\text{mg L}^{-1}$ N  |
| $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 14.9 $\text{g L}^{-1}$              | 14.9 $\text{mg L}^{-1}$ ; 1.97 $\text{mg L}^{-1}$ Si |

La décontamination chimique a été effectuée en faisant tremper pendant une nuit dans de l'acide nitrique 10% dans tous les erlenmeyers (250 mL) ayant servi aux expositions. Ces derniers ont ensuite été rincés 10 fois à l'eau ultrapure puis placés dans un four sec pour un cycle de stérilisation (décontamination biologique). Le matin du lancement de chaque exposition, la concentration de l'inoculum a été évaluée en cytométrie en flux (MUSE Cell Analyser, Millipore Sigma®).

L'eau de mer brute contaminée par l'anode galvanique a été récupérée grâce au dispositif expérimental décrit dans le chapitre II, elle est ensuite diluée en cascade afin d'obtenir les différentes concentrations testées au cours de l'exposition. Des expositions avec de l'eau de mer contaminée en chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ , 6  $\text{H}_2\text{O}$ ) ont également été réalisées pour les expositions de l'approche 2. Les microalgues ont été exposées dans un volume total de 100 mL. Un échantillon de chaque dilution, auquel deux gouttes d'acide nitrique 69 % ont été ajoutées, est conservé à 4°C jusqu'au dosage des concentrations en métaux par spectrométrie d'absorption atomique (SAA). Un volume de l'inoculum a été ajouté à chaque erlenmeyer en fonction de la densité cellulaire initiale souhaitée pour chaque espèce. Étant donné que les essais portent sur des échantillons d'eau contaminée, le milieu d'exposition a directement été dopé avec les solutions mères nutritives (Tableau X) aux bonnes concentrations afin d'éviter toute inhibition de croissance en raison d'une limitation en nutriments. Le pH est mesuré au début et à la fin de l'exposition dans toutes les conditions. Mise à part le tout premier essai (6 jours), tous les essais ont été réalisés sur une période de  $72 \pm 2$  h. Un échantillon des différents essais a régulièrement été prélevé et observé au microscope afin de confirmer l'absence de dommages aux cellules ainsi que les éventuelles contaminations biologiques extérieures.

### 2.1.3. Croissance des algues

Au début de l'exposition, puis toutes les  $24 \pm 2$  h jusqu'à la fin de l'essai, un prélèvement (1 mL) a été effectué dans chaque erlenmeyer afin de mesurer la densité cellulaire en cytométrie en flux (MUSE Celle Analyser, Millipore Sigma®). Une fois l'acquisition des données de densité cellulaire terminée, plusieurs indicateurs ont été calculés :

$$\text{Taux de croissance spécifique } (\mu) = \frac{\ln(\text{densité cellulaire finale}) - \ln(\text{densité cellulaire initiale})}{\text{Temps total d'exposition (heures)}}$$

$$\text{Pourcentage d'inhibition de croissance (PIC)} = \left( \frac{\mu_{\text{témoin}} - \mu_{\text{culture } x}}{\mu_{\text{témoin}}} \right) \times 100$$

### 2.1.4. Bioaccumulation des métaux par les algues

Des échantillons de culture ont été prélevés afin de mesurer les concentrations en métaux absorbés et adsorbés par les cellules. Le protocole a été ajusté par rapport à ce qui avait déjà été réalisé



lors de précédentes études sur la bioaccumulation des métaux chez le phytoplancton (Anu et al., 2016; Franklin et al., 2002). Au début et à la fin de l'essai, 3 échantillons de 50 mL (triplicat) ont été prélevés dans l'inoculum de chacune des espèces et placés dans des tubes falcon 50 mL. Les tubes ont été centrifugés (16°C, 3000 g, 20 min) et les surnageants récupérés afin de déterminer la concentration initiale et finale en aluminium et en zinc dans le milieu. Le culot de microalgues a été repris dans 20 mL d'EDTA (0,01 M) afin d'extraire les métaux adsorbés sur les cellules. Après 20 minutes d'incubation, l'échantillon a été de nouveau centrifugé (16°C, 3000 g, 20 min) et le surnageant d'EDTA a été récupéré pour le dosage des métaux adsorbés de la fraction extracellulaire. Deux gouttes d'acide nitrique 69% ont été ajoutées aux échantillons qui ont été conservés à 4°C jusqu'à leur analyse par SAA. Les culots de microalgues restants ont été stockés à -80°C avant d'être lyophilisés puis minéralisés pour le dosage des métaux de la fraction intracellulaire.

#### 2.1.5. Utilisation du multi-color PAM pour le phytoplancton

Les analyses des paramètres photosynthétiques des 4 espèces de microalgues ont été effectuées à l'aide d'un multi-color PAM (Waltz, Effeltrich, Germany), un appareil qui possède l'avantage de fournir six longueurs d'onde de lumière (400, 440, 480, 540, 590 et 625 nm) et six couleurs de lumière actinique avec des pics à 40, 480, 540, 590, 625 et 420-640 nm (Schreiber et al., 2012). Cet appareil permet des mesures très précises de l'évaluation du  $F_v/F_m$  et de l'absorption fonctionnelle du PSII en fonction de la longueur d'onde. Les progrès techniques récents dans le domaine des LED ont permis de développer une source lumineuse miniature extrêmement puissante, qui fournit toutes les qualités des lumière essentielles.

Dans chaque condition d'exposition, un échantillon de culture a été prélevé au début (T0) et à la fin des expérimentations. Avant la mesure au multi-color PAM, un blanc est effectué avec le même volume d'échantillon préalablement filtré (0,2  $\mu$ m) de façon à soustraire la chlorophylle dissoute à la mesure de fluorescence. Après avoir stocké l'échantillon 10 minutes à l'obscurité, l'échantillon est exposé à une lumière détectrice et un rayonnement lumineux de différentes intensités et de longueur d'onde fixe. Les résultats ont été récupérés et traités sur le logiciel R avec le package FRRF et le modèle de webb afin de calculer les 4 indicateurs recherchés :  $\alpha$ ,  $E_k$ ,  $rETR_{max}$  et  $F_v/F_m$ .

## 2.2. Résultats

### 2.2.1. Approche 1 : *Chaetoceros calcitrans* (sans enrichissement du milieu en sels nutritifs)

#### 2.2.1.1. Exposition sur une période de 144 heures

Une première exposition d'une durée de 144 heures (6 jours) a été réalisée sur *Chaetoceros calcitrans* au début des expérimentations. Les concentrations en aluminium et zinc testées sont présentées dans le Tableau XVIII.

Tableau XVIII : Concentrations totales en aluminium et en zinc pour les différentes conditions expérimentales du premier essai de 144 heures chez *Chaetoceros calcitrans*.

| Condition | [Al] dans l'eau ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | [Zn] dans l'eau ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) |
|-----------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| Témoin    | 26                                       | 11                                       |
| C1        | 192                                      | 22                                       |
| C2        | 337                                      | 31                                       |
| C3        | 658                                      | 48                                       |
| C4        | 1327                                     | 85                                       |
| C5        | 2829                                     | 301                                      |

Les résultats de l'inhibition de croissance par rapport au témoin sont présentés sur la Figure 42. Nous avons constaté une inhibition significative à partir de la concentration de  $658 \mu\text{g L}^{-1}$  ([Al]) (ANOVA,  $p < 0.05$ ). L'inhibition a atteint près de 64 % par rapport au témoin pour la plus forte concentration ([Al] =  $2829 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Le contrôle positif au cuivre s'est avéré très nocif pour les cellules algales étant donné qu'une inhibition de croissance de 118 % a été enregistrée.

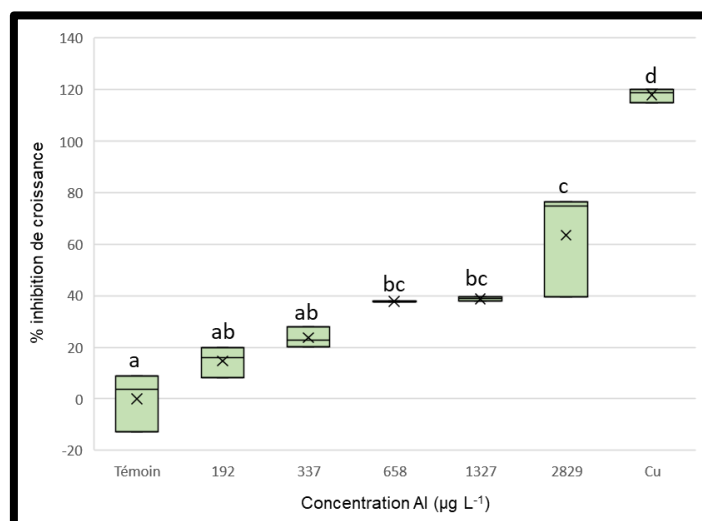


Figure 45 : Pourcentage d'inhibition de croissance par rapport au témoin chez la diatomée *Chaetoceros calcitrans* après 144 heures d'exposition à différentes conditions d'exposition. La condition Cu équivaut à un contrôle positif avec  $800 \mu\text{g L}^{-1}$  de cuivre. Une lettre commune à deux conditions indique qu'il n'y a pas de différence significative entre elles.

L'analyse des échantillons avec le multicolor PAM a permis l'acquisition des paramètres photosynthétiques ( $\alpha$ ,  $E_k$ ,  $rETR_{max}$  et  $F_v/F_m$ ) de *C. calcitrans* au début et à la fin de l'exposition (Figure 46). Seul deux de ces paramètres ont varié significativement entre les conditions. Pour  $\alpha$ , une tendance à la baisse est mesurée dès la première concentration testée, cette diminution devenant significative par rapport au témoin (ANOVA,  $p < 0.05$ ) pour la plus forte concentration ( $[Al] = 2\,829\ \mu\text{g L}^{-1}$ ), ce qui signifie une baisse de l'efficacité photosynthétique des algues à cette concentration. De même, la valeur de  $F_v/F_m$  s'est avérée être plus faible par rapport au témoin à partir de  $1\,327\ \mu\text{g L}^{-1}$  ( $[Al]$ ) indiquant une inhibition du rendement quantique maximal du PSII (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

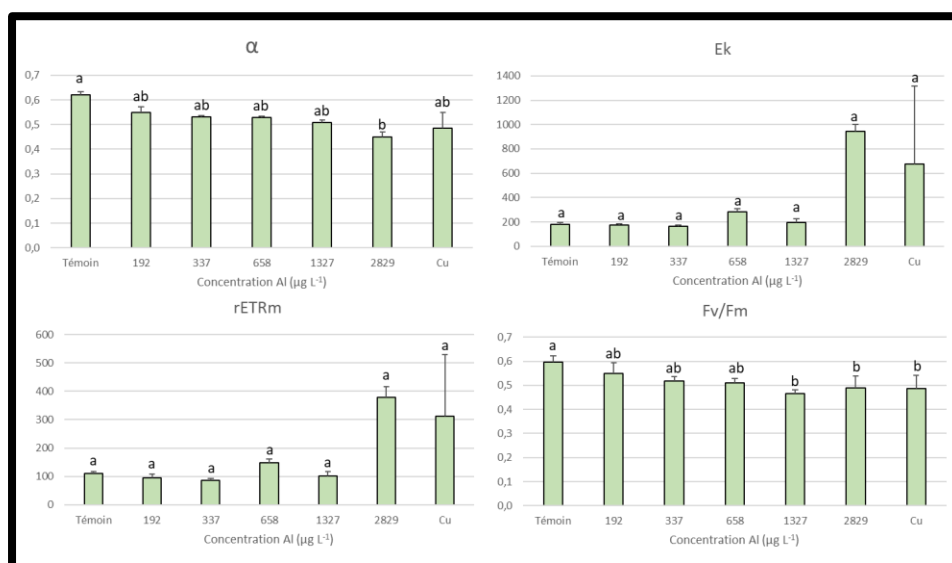


Figure 46 : Paramètres photosynthétiques de la diatomée *Chaetoceros calcitrans* après 144 heures d'exposition aux différentes conditions d'exposition.  $\alpha$  = Efficacité photosynthétique.  $E_k$  = Intensité de saturation lumineuse.  $rETR_m$  = Taux (relatif) (maximum) de transport des électrons au niveau du PSII.  $F_v/F_m$  = Rendement quantique maximal du PSII. La condition Cu équivaut à un contrôle positif avec  $800\ \mu\text{g L}^{-1}$  de cuivre. Une lettre commune à deux conditions indique qu'il n'y a pas de différence significative entre elles.

Le dosage dans les milieux de l'aluminium et du zinc à la fin de l'exposition a permis d'évaluer la répartition des métaux associés aux fractions extracellulaire (adsorbés à la surface des cellules) et intracellulaire (absorbés par les cellules). On constate sur la Figure 47 que l'adsorption et l'absorption de l'aluminium par les cellules de *C. calcitrans* augmentent en même temps que la concentration en métaux dans le milieu. Pour les plus faibles concentrations d'exposition, les teneurs dans les cellules ont augmenté linéairement, puis à partir d'un certain seuil ( $[Al] = 1\,327\ \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $[Zn] = 85\ \mu\text{g L}^{-1}$ ), on constate une très forte augmentation de la concentration cellulaire en aluminium, ce qui explique la présentation des résultats avec une échelle logarithmique sur la figure 47A. En effet, pour une concentration d'exposition initiale de  $658\ \mu\text{g L}^{-1}$  ( $[Al]$ ), les concentrations d'aluminium extracellulaire et intracellulaires étaient respectivement de  $157\ \mu\text{g L}^{-1}$  et  $91\ \mu\text{g g}^{-1}$ . Pour la concentration d'exposition initiale de  $1\,327\ \mu\text{g L}^{-1}$  ( $[Al]$ ), on mesure des concentrations d'aluminium extracellulaire et

intracellulaires bien plus élevées, respectivement de  $916 \mu\text{g L}^{-1}$  et  $24\,653 \mu\text{g g}^{-1}$  (Facteur de 271). On constate ainsi une corrélation entre l'inhibition maximale de la croissance (Figure 45) et l'accumulation d'aluminium intracellulaire. Dans une moindre mesure, une augmentation dose dépendante des concentrations de zinc, notamment pour la fraction extracellulaire, est également constatée.

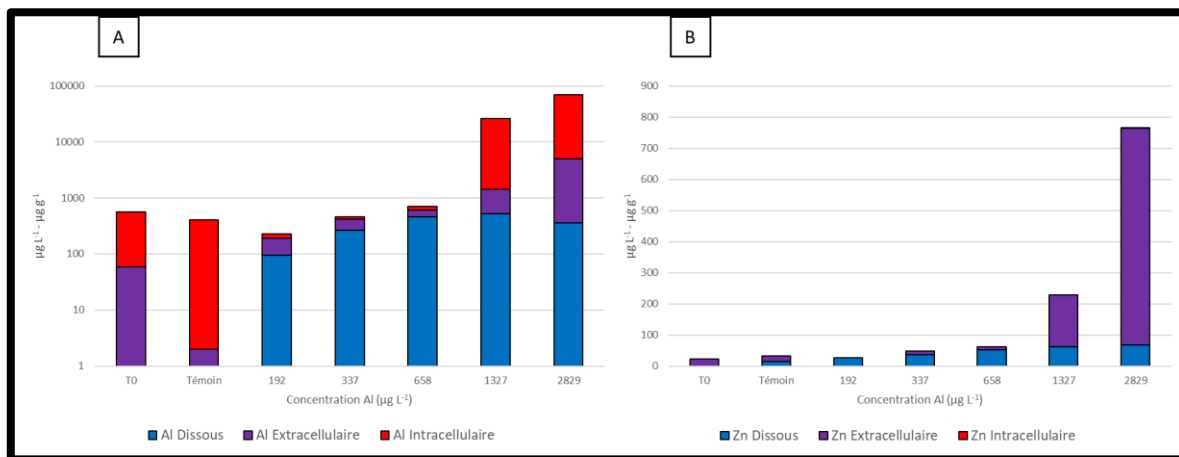


Figure 47 : Répartition de l'aluminium (A) et du zinc (B) entre (i) les concentrations dans le milieu ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), (ii) les métaux adsorbés à la surface des cellules algales (fraction extracellulaire) ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), (iii) les métaux absorbés par les cellules algales (fraction intracellulaire) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de *Chaetoceros calcitrans* après une exposition de 144 heures à différentes conditions d'exposition. Les valeurs en ordonnée de la figure A sont présentées avec une échelle logarithmique.

#### 2.2.1.2. Exposition à l'anode sur une période de 72 heures

Une seconde exposition sur 72 heures a été réalisée afin de suivre les recommandations des normes existantes appliquées aux microalgues marines (Organisation Internationale de Normalisation, 2006). Les concentrations en aluminium et en zinc testées sont présentées dans le Tableau XIX.

Tableau XIX : Concentrations totales en aluminium et en zinc pour les différentes conditions expérimentales du deuxième essai de 72 heures réalisé chez *Chaetoceros calcitrans*.

| Condition | [Al] dans l'eau ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | [Zn] dans l'eau ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) |
|-----------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| Témoin    | 7                                        | < LD                                     |
| C1        | 199                                      | 6                                        |
| C2        | 391                                      | 13                                       |
| C3        | 861                                      | 46                                       |
| C4        | 1388                                     | 87                                       |
| C5        | 1560                                     | 45                                       |
| C6        | 2776                                     | 336                                      |
| C7        | 3457                                     | 172                                      |
| C8        | 6801                                     | 356                                      |
| C9        | 14361                                    | 763                                      |

La Figure 48 présente le pourcentage d'inhibition de croissance de *C. calcitrans* en réponse à plusieurs concentrations d'aluminium et de zinc libérés par l'anode galvanique. On constate des différences significatives (ANOVA,  $p < 0.05$ ) par rapport au témoin uniquement pour les concentrations de 3 457  $\mu\text{g L}^{-1}$  ([Al]) et de 14 361  $\mu\text{g L}^{-1}$  ([Al]). Là où pour la première exposition de 144 heures nous avons observé une inhibition de croissance de 63,5 % pour une concentration de 2 829  $\mu\text{g L}^{-1}$  ([Al]), ici nous observons une inhibition de croissance de seulement 20,5 % pour une concentration équivalente de 2 776  $\mu\text{g L}^{-1}$  ([Al]). Ces résultats confirment ainsi que le temps d'exposition est un facteur important qui impacte la croissance des algues.

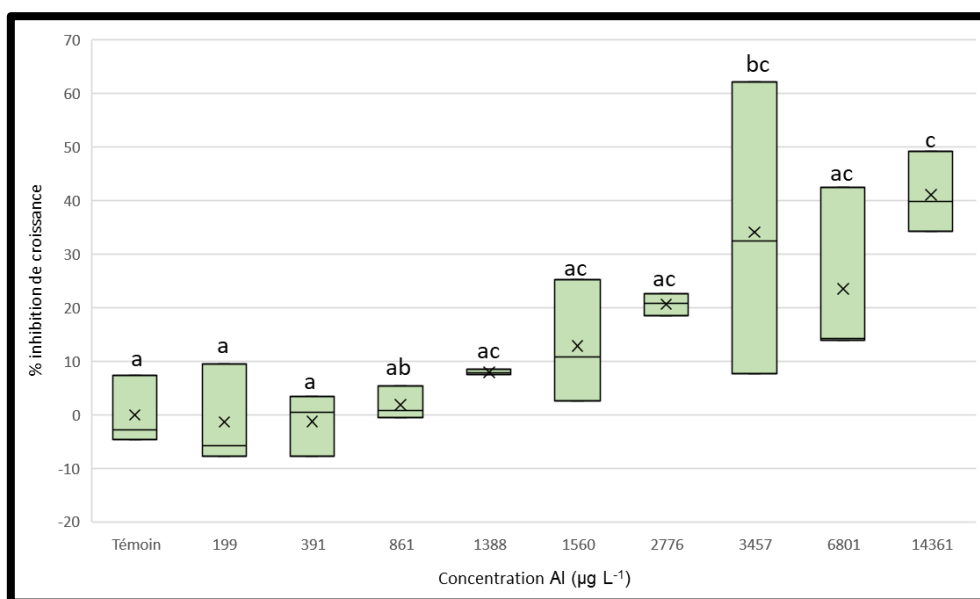


Figure 48 : Pourcentage d'inhibition de croissance par rapport au témoin chez la diatomée *Chaetoceros calcitrans* après 72 heures d'exposition à différentes conditions d'exposition. Une lettre commune à deux conditions indique qu'il n'y a pas de différence significative entre elles.

Les  $\text{CI}_{50}$  calculées pour *C. calcitrans* sont présentées dans le Tableau XX. Pour l'exposition pendant 144 heures, la  $\text{CI}_{50}$  a été estimée à 999  $\mu\text{g L}^{-1}$  (basée sur la concentration d'aluminium dans le milieu) contre 20 702  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour l'exposition de 72 heures.

Tableau XX :  $\text{CI}_{50}$  ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) calculées pour les différentes espèces de microalgues à l'aide de régressions non linéaires (en utilisant l'équation de Hill) au moyen de la macro Excel® REGTOX (Vindimian, 2012). Les  $\text{CI}_{50}$  de l'anode galvanique n'ont pas pu être calculées pour *Tetraselmis suecica*, *Emiliana huxleyi* et *Isochrysis galbana* car les plus fortes concentrations testées n'ont pas inhibé la croissance des algues à plus de 50%.

|                    | <i>Chaetoceros calcitrans</i> |         | <i>Tetraselmis suecica</i> |         | <i>Emiliana huxleyi</i> |         | <i>Isochrysis galbana</i> |         |
|--------------------|-------------------------------|---------|----------------------------|---------|-------------------------|---------|---------------------------|---------|
| Temps d'exposition | 6 jours                       | 3 jours | 3 jours                    | 3 jours | 3 jours                 | 3 jours | 3 jours                   | 3 jours |
| Contaminant        | Anode                         | Anode   | $\text{AlCl}_3$            | Anode   | $\text{AlCl}_3$         | Anode   | $\text{AlCl}_3$           | Anode   |
| $\text{CI}_{50}$   | 999                           | 20 702  | 468                        | NA      | 921                     | NA      | 2620                      | NA      |

Les paramètres photosynthétiques obtenus à l'aide du multicolor PAM sont présentés dans le Tableau XXI. Quel que soit les indicateurs mesurés, aucune différence significative n'est relevée par rapport au témoin (ANOVA,  $p > 0.05$ ). Même pour la concentration d'exposition la plus élevée qui était pourtant 10,8 fois plus forte que la première concentration à laquelle nous avons observé un effet sur le Fv/Fm lors de l'exposition de 144 heures (6 jours).

Tableau XXI : Paramètres photosynthétiques ( $\pm$  SEM) de la diatomée *Chaetoceros calcitrans* après 72 heures d'exposition à différentes conditions d'exposition.  $\alpha$  = Efficacité photosynthétique.  $E_k$  = Intensité de saturation lumineuse. rETRm = Taux (relatif) (maximum) de transport des électrons au niveau du PSII. Fv/Fm = Rendement quantique maximal du PSII. Une lettre commune à deux conditions indique qu'il n'y a pas de différence significative entre elles.

| [Al]-[Zn] ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | $\alpha$                        | $E_k$                          | rETRm                         | Fv/Fm                          |
|------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Témoin                             | $0,60 \pm 0,008$ <sup>ad</sup>  | $127,5 \pm 7,2$ <sup>ab</sup>  | $76,6 \pm 3,9$ <sup>ab</sup>  | $0,59 \pm 0,009$ <sup>ac</sup> |
| 199-6                              | $0,61 \pm 0,003$ <sup>abc</sup> | $130,4 \pm 5,9$ <sup>a</sup>   | $79,4 \pm 3,9$ <sup>a</sup>   | $0,59 \pm 0,002$ <sup>ab</sup> |
| 391-13                             | $0,61 \pm 0,005$ <sup>ab</sup>  | $131,9 \pm 3,2$ <sup>ac</sup>  | $80,6 \pm 2,5$ <sup>ab</sup>  | $0,60 \pm 0,003$ <sup>ab</sup> |
| 861-46                             | $0,62 \pm 0,002$ <sup>a</sup>   | $157,9 \pm 5,3$ <sup>ac</sup>  | $97,9 \pm 3,1$ <sup>ab</sup>  | $0,60 \pm 0,008$ <sup>a</sup>  |
| 1388-87                            | $0,64 \pm 0,003$ <sup>cd</sup>  | $161,4 \pm 4,1$ <sup>bc</sup>  | $104,1 \pm 3,1$ <sup>bc</sup> | $0,62 \pm 0,010$ <sup>bc</sup> |
| 1560-45                            | $0,59 \pm 0,011$ <sup>ad</sup>  | $127,7 \pm 10,4$ <sup>ab</sup> | $75,7 \pm 6,9$ <sup>ab</sup>  | $0,57 \pm 0,013$ <sup>ac</sup> |
| 2776-366                           | $0,63 \pm 0,003$ <sup>d</sup>   | $150,5 \pm 2,0$ <sup>c</sup>   | $95,7 \pm 1,6$ <sup>c</sup>   | $0,61 \pm 0,003$ <sup>c</sup>  |
| 3457-172                           | $0,56 \pm 0,024$ <sup>bd</sup>  | $136,4 \pm 10,4$ <sup>bc</sup> | $76,5 \pm 9,2$ <sup>bc</sup>  | $0,53 \pm 0,023$ <sup>bc</sup> |
| 6801-356                           | $0,58 \pm 0,020$ <sup>ad</sup>  | $132,8 \pm 8,6$ <sup>ac</sup>  | $77,2 \pm 7,5$ <sup>ac</sup>  | $0,56 \pm 0,021$ <sup>bc</sup> |
| 14361-763                          | $0,59 \pm 0,003$ <sup>ad</sup>  | $107,0 \pm 2,3$ <sup>ac</sup>  | $62,9 \pm 1,4$ <sup>ac</sup>  | $0,57 \pm 0,003$ <sup>bc</sup> |

Concernant le dosage des métaux (Figure 49), *C. calcitrans* a internalisé moins d'aluminium pour une concentration d'exposition équivalente comparativement à l'exposition de 144 heures :  $1\,590\,\mu\text{g g}^{-1}$  à  $3\,451\,\mu\text{g L}^{-1}$  ([Al]) pour T=72h contre  $64\,179\,\mu\text{g g}^{-1}$  pour  $2\,829\,\mu\text{g L}^{-1}$  ([Al]) pour T=144h. Ces résultats sont en adéquation avec l'inhibition de croissance plus faible observée lors de cette seconde exposition par rapport à la première exposition.

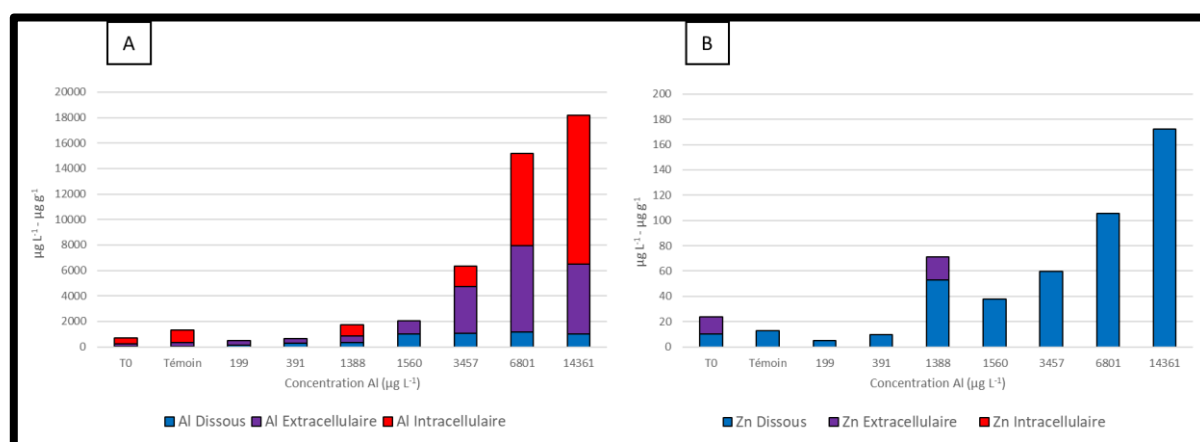


Figure 49 : Répartition de l'aluminium (A) et du zinc (B) entre (i) les concentrations dans le milieu ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), (ii) les métaux adsorbés à la surface des cellules algales (fraction extracellulaire) ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), (iii) les métaux absorbés par les cellules algales (fraction intracellulaire) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de *Chaetoceros calcitrans* après une exposition de 72 heures à différentes conditions d'exposition.

### 2.2.2. Approche 2 : Toxicité anode galvanique Vs chlorure d'aluminium

Pour rappel, à la suite des premières expositions sur la diatomée *C. calcitrans*, quelques ajustements ont été apportés au protocole. Il a été décidé d'enrichir le milieu en sels nutritifs afin de répondre au protocole de la norme AFNOR (NF EN ISO 10253, 2006). D'autres espèces de microalgues ont été étudiées (*E. huxleyi*, *I. galbana*, *T. suecica*) de façon à comparer la sensibilité des espèces entre-elle mais aussi de comparer les effets des métaux libérés par une anode galvanique à base d'aluminium, avec les effets associés à l'aluminium seul au travers d'une contamination de l'eau par du chlorure d'aluminium. Les concentrations en zinc relevées dans tous les échantillons lors de l'approche 2 sont beaucoup plus élevées en raison de la présence de zinc en forte quantité, sous forme de sulfate de zinc heptahydraté, dans le milieu nutritif (Tableau XVII). Les concentrations en aluminium et en zinc testées lors de l'approche 2 sont présentées dans le tableau XXII.

#### 2.2.2.1. *Tetraselmis suecica*

La croissance de *T. suecica* a été inhibée à hauteur de 62 % en réponse à la plus forte concentration de chlorure d'aluminium ( $1\,405\ \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Figure 50). La  $\text{CI}_{50}$  au chlorure d'aluminium a été estimée à  $468\ \mu\text{g L}^{-1}$  (Tableau XX). En revanche, pour la contamination par l'anode galvanique, on ne constate qu'une légère inhibition (28 %) non significative (ANOVA,  $p > 0.05$ ) pour la condition la plus extrême ( $6\,451\ \mu\text{g L}^{-1}$ ) ce qui n'a pas permis le calcul de la  $\text{CI}_{50}$ .

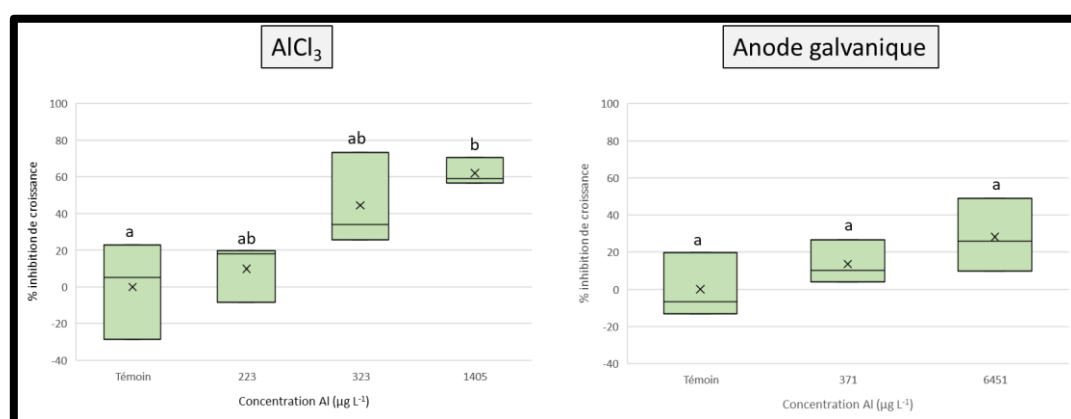


Figure 50 : Pourcentage d'inhibition de croissance par rapport au témoin chez *Tetraselmis suecica* après 72 heures d'exposition à différentes concentrations en chlorure d'aluminium et en métaux libérés par une anode galvanique à base d'aluminium. Une lettre commune à deux conditions indique qu'il n'y a pas de différence significative entre elles.

Les paramètres photosynthétiques mesurés chez *T. suecica* sont présentés dans le Tableau XXII. Malgré l'absence de différence significative, on constate un effet du chlorure d'aluminium à la plus forte concentration ( $1\,405\ \mu\text{g L}^{-1}$ ) sur certains paramètres photosynthétiques comme le  $\text{Fv/Fm}$  (0,55) qui est plus faible par rapport au témoin (0,73), ou encore  $\text{Ek}$  (188,3) qui est

plus fort par rapport au témoin (93,7). En revanche, les fortes concentrations d'aluminium de l'anode galvanique n'ont pas entraîné de variations des paramètres photosynthétiques.

Tableau XXII : Paramètres photosynthétiques ( $\pm$  SEM) de *Tetraselmis suecica*, *Emiliana huxleyi* et *Isochrysis galbana* après 72 heures d'exposition à différentes conditions d'exposition.  $\alpha$  = Efficacité photosynthétique.  $E_k$  = Intensité de saturation lumineuse. rETR<sub>m</sub> = Taux (relatif) (maximum) de transport des électrons au niveau du PSII. Fv/Fm = Rendement quantique maximal du PSII. Les analyses statistiques ont été réalisées indépendamment pour chaque espèce. Une lettre commune à deux conditions indique qu'il n'y a pas de différence significative entre elles.

|                            | Condition                 | $\alpha$                      | $E_k$                          | rETR <sub>m</sub>             | Fv/Fm                          |
|----------------------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| <i>Tetraselmis suecica</i> | Témoin                    | 0,77 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup> | 154,1 $\pm$ 17,5 <sup>ab</sup> | 133,6 $\pm$ 12,1 <sup>a</sup> | 0,73 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>   |
|                            | AlCl <sub>3</sub><br>[Al] | 223                           | 93,7 $\pm$ 21,6 <sup>ab</sup>  | 67,2 $\pm$ 15,7 <sup>a</sup>  | 0,73 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>   |
|                            |                           | 323                           | 60,2 $\pm$ 26,5 <sup>a</sup>   | 42,9 $\pm$ 19,0 <sup>a</sup>  | 0,72 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>   |
|                            |                           | 1405                          | 188,3 $\pm$ 33,3 <sup>b</sup>  | 113,5 $\pm$ 32,6 <sup>a</sup> | 0,55 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>   |
|                            | Anode<br>[Al]-[Zn]        | 371-344                       | 85,8 $\pm$ 15,6 <sup>a</sup>   | 59,1 $\pm$ 9,9 <sup>a</sup>   | 0,71 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>   |
|                            |                           | 6451-542                      | 71,7 $\pm$ 30,9 <sup>a</sup>   | 50,5 $\pm$ 21,8 <sup>a</sup>  | 0,71 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>   |
| <i>Emiliana huxleyi</i>    | Témoin                    | 0,65 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>  | 91,1 $\pm$ 16,3 <sup>a</sup>   | 59,4 $\pm$ 11,9 <sup>a</sup>  | 0,67 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>   |
|                            | AlCl <sub>3</sub><br>[Al] | 11                            | 125,2 $\pm$ 8,8 <sup>a</sup>   | 83,5 $\pm$ 5,1 <sup>a</sup>   | 0,67 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>   |
|                            |                           | 58                            | 134,5 $\pm$ 22,5 <sup>a</sup>  | 88,3 $\pm$ 16,0 <sup>a</sup>  | 0,66 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>   |
|                            |                           | 1405                          | 125,7 $\pm$ 6,0 <sup>a</sup>   | 80,2 $\pm$ 5,6 <sup>a</sup>   | 0,64 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>   |
|                            | Anode<br>[Al]-[Zn]        | 187-136                       | 100,9 $\pm$ 9,6 <sup>a</sup>   | 66,2 $\pm$ 7,9 <sup>a</sup>   | 0,68 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>   |
|                            |                           | 371-344                       | 120,8 $\pm$ 10,7 <sup>a</sup>  | 81,3 $\pm$ 8,2 <sup>a</sup>   | 0,71 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>   |
|                            |                           | 6451-542                      | 99,7 $\pm$ 15,6 <sup>a</sup>   | 65,1 $\pm$ 11,4 <sup>a</sup>  | 0,69 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>  |
| <i>Isochrysis galbana</i>  | Témoin                    | 0,68 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>  | 136,1 $\pm$ 10,3 <sup>a</sup>  | 92,2 $\pm$ 7,0 <sup>a</sup>   | 0,69 $\pm$ 0,01 <sup>ac</sup>  |
|                            | AlCl <sub>3</sub><br>[Al] | 25                            | 132,3 $\pm$ 19,7 <sup>a</sup>  | 85,7 $\pm$ 15,6 <sup>a</sup>  | 0,67 $\pm$ 0,01 <sup>ac</sup>  |
|                            |                           | 188                           | 133,2 $\pm$ 21,9 <sup>a</sup>  | 86,3 $\pm$ 16,2 <sup>a</sup>  | 0,66 $\pm$ 0,01 <sup>ab</sup>  |
|                            |                           | 323                           | 158,9 $\pm$ 17,1 <sup>a</sup>  | 104,0 $\pm$ 13,6 <sup>a</sup> | 0,65 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>   |
|                            |                           | 1835                          | 104,6 $\pm$ 11,6 <sup>a</sup>  | 66,8 $\pm$ 7,7 <sup>a</sup>   | 0,66 $\pm$ 0,004 <sup>ab</sup> |
|                            | Anode<br>[Al]-[Zn]        | 371-344                       | 159,7 $\pm$ 15,6 <sup>a</sup>  | 111,1 $\pm$ 12,5 <sup>a</sup> | 0,70 $\pm$ 0,003 <sup>c</sup>  |
|                            |                           | 6451-542                      | 148,8 $\pm$ 4,2 <sup>a</sup>   | 101,4 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>  | 0,70 $\pm$ 0,01 <sup>bc</sup>  |

### 2.2.2.2. *Emiliana huxleyi*

Chez cette espèce, une forte variabilité de la croissance entre les réplicats est mesurée ce qui explique l'absence de différence significative entre les conditions (Figure 51). Cependant, une légère stimulation de la croissance pour les très faibles concentrations de chlorure d'aluminium (9 et 11  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) a été mesurée. La  $\text{Cl}_{50}$  a été estimée à 921  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Tableau XX). Concernant l'anode galvanique, la condition la plus extrême a stimulé la croissance des algues de 17 % par rapport au témoin et par conséquent, aucune  $\text{Cl}_{50}$  n'a pu être calculée.



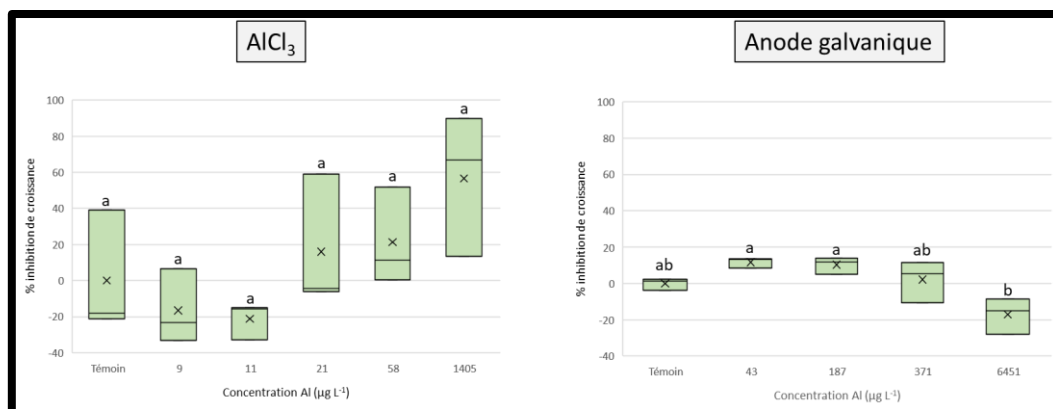


Figure 51 : Pourcentage d'inhibition de croissance par rapport au témoin chez *Emiliana huxleyi* après 72 heures d'exposition à différentes concentrations en chlorure d'aluminium et en métaux libérés par une anode galvanique à base d'aluminium. Une lettre commune à deux conditions indique qu'il n'y a pas de différence significative entre elles.

Concernant les paramètres photosynthétiques (Tableau XXII), aucune différence significative entre les différentes conditions d'exposition n'a été mise en évidence.

### 2.2.2.3. *Isochrysis galbana*

Chez *I. galbana*, l'exposition au chlorure d'aluminium a provoqué une inhibition de la croissance dès les faibles concentrations (Figure 52). Celle-ci est significative pour une concentration de 188 μg L<sup>-1</sup>. La Cl<sub>50</sub> a alors été estimée à 2 620 μg L<sup>-1</sup> (Tableau XX). Aucune inhibition de croissance n'a été enregistrée chez cette haptophyte après l'exposition à l'anode galvanique, même à la concentration la plus extrême de 6 451 μg L<sup>-1</sup> ([Al]).

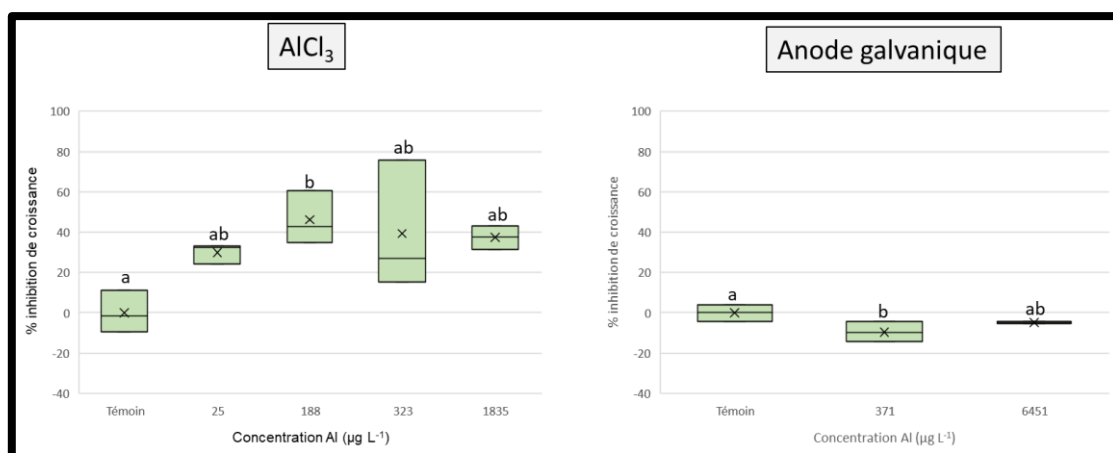


Figure 52 : Pourcentage d'inhibition de croissance par rapport au témoin chez *Isochrysis galbana* après 72 heures d'exposition à différentes concentrations en chlorure d'aluminium et en métaux libérés par une anode galvanique à base d'aluminium. Une lettre commune à deux conditions indique qu'il n'y a pas de différence significative entre elles.

L'analyse des cellules au multicolor PAM (Tableau XXII) n'a pas mis en évidence de différence significative au regard des paramètres photosynthétiques.

### 2.3.Discussion

De manière générale, les microalgues sont sensibles à l'exposition aux contaminants car elles sont en contact direct avec le milieu et n'en sont séparées que par la membrane cytoplasmique et la paroi cellulaire (Anu et al., 2018, 2016; Dinesh et al., 2014; C. M. Monteiro et al., 2011). Des protocoles de lignes directrices pour les tests d'inhibition des algues ont été publiés par l'OCDE dès 1984. Il a depuis été démontré que les microalgues marines sont sensibles à la contamination par les métaux au travers de nombreuses études qui ont notamment été menées sur le cuivre, le cadmium et le zinc (Anu et al., 2018, 2016; Dinesh et al., 2014; C. M. Monteiro et al., 2011). Les différences de sensibilité aux métaux observées dans la littérature chez les nombreuses espèces de microalgues s'expliquent par la grande diversité des groupes taxonomiques et il apparaît difficile d'extrapoler la toxicité chez une espèce d'un groupe à une espèce d'un autre groupe, et parfois même au sein d'un même groupe (Anu et al., 2016; Dinesh et al., 2014; Gillmore et al., 2016; Golding et al., 2015; Harford et al., 2011; Trenfield et al., 2015). Au cours de ces travaux de thèse, nous avons réalisé des tests de toxicité chez 4 espèces de microalgues afin d'évaluer la toxicité des métaux libérés par une anode galvanique à base d'aluminium et de comparer les effets avec un sel d'aluminium.

Les diatomées sont incontestablement le groupe le plus étudié dans la littérature. La toxicité de l'aluminium chez ce groupe taxonomique pourrait être liée à la composition siliceuse de la paroi cellulaire (Gillmore et al., 2016). Dans les présents travaux, nous avons calculé des  $CI_{50}$  au chlorure d'aluminium de 468, 921 et 2 620  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour *T. suecica*, *E. huxleyi* et *I. galbana*, respectivement. Dans l'étude de Trenfield et al. (2015), la  $CI_{50}$  ( $\text{AlCl}_3$ ) d'*Isochrysis galbana* a été évaluée à 2 570  $\mu\text{g L}^{-1}$  ce qui est très proche de ce que nous avons estimé dans notre étude. Tandis que la  $CI_{10}$  du genre *Tetraselmis* a été évaluée à 3 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  dans l'étude de Golding et al. (2015), ce qui est bien plus élevé que dans nos travaux. Comme suggéré dans la littérature, nous avons constaté des variations de sensibilité à l'aluminium entre les 4 espèces de microalgues testées. En commençant par l'espèce la plus sensible, on peut établir l'ordre de sensibilité au chlorure d'aluminium suivant :

$$T. suecica (CI_{50} = 468 \mu\text{g L}^{-1}) > E. huxleyi (CI_{50} = 921 \mu\text{g L}^{-1}) > I. galbana (CI_{50} = 2620 \mu\text{g L}^{-1})$$

Les deux espèces de coccolithophores semblent être les plus résistantes. Dans la littérature, le cas de la résistance de la rhodophyte des sources chaudes et acides, *Cyanidium caldarium*, est très intéressant. Après une exposition à 26,66 g  $\text{L}^{-1}$  (200 mM) d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ), (environ 14 811 fois notre concentration la plus élevée), le taux de croissance des algues était encore de 58 % par rapport à celui de la culture témoin (Yoshimura et al., 2000, 1999). *C. caldarium* présente la plus haute tolérance à l'aluminium connue dans le monde des microalgues. En revanche, il est intéressant de noter que cette algue est plutôt sensible aux autres métaux (zinc, nickel, chrome et manganèse). Cette forte tolérance

à l'aluminium vient de sa faible capacité à bioaccumuler ce métal puisque sa concentration cellulaire est maintenue à un niveau inférieur d'environ trois ordres de grandeur de la concentration d'aluminium dans le milieu. Les auteurs ont montré que la concentration intracellulaire d'aluminium était négativement corrélée à celle du fer ce qui suggère que les ions aluminium sont internalisés par les transporteurs du fer comme cela a déjà été observé chez la bactérie *E. coli*. Chez cette bactérie, la toxicité de l'aluminium augmente lorsque le fer est absent du milieu (Guida et al., 1991). Dans une autre expérience, les auteurs ont observé une tolérance à l'aluminium accrue de *C. caldarium* pour des basses températures (Yoshimura et al., 2000). Quand la température augmente, la capacité du transporteur du fer à faire la distinction entre l'aluminium et le fer est réduite et donc davantage d'ions aluminium peuvent pénétrer dans la cellule. La toxicité de l'aluminium chez les microalgues pourrait donc être liée à l'affinité de chaque espèce pour le fer. Il serait ainsi intéressant de vérifier cette hypothèse en réalisant des co-expositions avec du fer et les métaux libérés par l'anode galvanique ainsi que du fer avec du chlorure d'aluminium. La diatomée *Chaetoceros calcitrans* s'est avérée moins sensible que les 3 autres espèces mais la forme chimique d'aluminium testée n'était pas la même. Il est donc nécessaire d'acquérir des données sur cette diatomée pour pouvoir comparer pleinement les résultats.

Pour les trois espèces de l'approche 2, nous n'avons pas pu calculer les  $CI_{50}$  en réponse aux métaux relargués par l'anode galvanique. En effet, même les plus fortes concentrations testées n'ont pas induit d'inhibition de croissance d'au moins 50%, alors que la concentration en aluminium était bien plus élevée que lors des expositions au chlorure d'aluminium les plus extrêmes. Cette différence de toxicité entre l'aluminium provenant d'une anode galvanique et l'aluminium sous une forme plus conventionnel a déjà été observée par Caplat et al. (2010) chez l'oursin *Paracentrotus lividus*. On peut émettre deux hypothèses quant à une telle différence de toxicité. La première est que l'aluminium, tel que relargué par l'anode galvanique, est bien moins biodisponible pour les cellules algales, les espèces ioniques libres étant moins dominantes que dans le cas d'une contamination au chlorure d'aluminium. L'autre hypothèse serait que l'inhibition de la croissance provoquée par l'aluminium est compensée par les niveaux élevés de zinc qui stimuleraient la croissance dans la gamme de concentrations testées, à savoir entre 100 et 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ . En effet, comme nous l'avons observé, de faibles concentrations du cocktail Al/Zn ont stimulé la croissance des algues. D'après la norme AFNOR, dans le cadre d'essai d'inhibition de la croissance algale, il est courant d'observer une stimulation de la croissance chez les algues exposées à certains contaminants par rapport au témoin. Nous sommes actuellement en attente des résultats de la bioaccumulation des microalgues de l'approche 2, ce qui nous révélera peut-être une différence d'internalisation de l'aluminium dans les cellules.

Certains auteurs soutiennent que l'enrichissement en aluminium pourrait être bénéfique à la croissance du phytoplancton marin. Il y a plus de cinq décennies, Menzel et al. (1963) ont rapporté que l'enrichissement en aluminium dans le milieu pouvait augmenter la productivité primaire des eaux de la mer des Sargasses (Menzel et al., 1963). Plusieurs cas de stimulation de croissance chez *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis* sp et *Ceratoneis closterium* ont également été rapportés lors d'essais de toxicité en laboratoire (Gillmore et al., 2016; Golding et al., 2015; Saçan et al., 2007). Dans le sud de la mer Jaune, Ren et collaborateurs (2011) ont observé une prolifération de diatomées en lien avec une tempête de poussière, ayant augmenté la concentration d'aluminium dans les eaux de surface à  $1,7 \mu\text{g L}^{-1}$  (Ren et al., 2011). Après la tempête, une efflorescence de diatomées s'est développée et la concentration d'aluminium a rapidement diminué pour atteindre une valeur finale d'environ  $0,62 \mu\text{g L}^{-1}$ . Il a déjà été signalé que des efflorescences printanières de diatomées marines pouvaient constituer un processus important de captation de l'aluminium dans les eaux côtières (Moran and Moore, 1988). L'aluminium joue ainsi probablement un rôle non reconnu mais important dans les cycles du carbone marin à l'échelle mondiale, non seulement en améliorant la fixation du  $\text{CO}_2$  dans la partie supérieure de l'océan, mais aussi en favorisant l'exportation et la fixation du carbone fixé dans les profondeurs de l'océan (Zhou et al., 2018b). Néanmoins, dans le cadre de nos expérimentations, les concentrations testées étaient bien plus élevées que les maximums environnementaux rapportés dans la littérature (Annexe 1).

Les analyses PAM des algues de l'approche 2 ont révélé que les valeurs de  $F_v/F_m$  ont varié entre 0,65 et 0,72 quel que soit la forme du contaminant ce qui traduit un très bon état physiologique des algues. Seule exception pour la plus forte concentration d'exposition au chlorure d'aluminium ( $1\,405 \mu\text{g L}^{-1}$ ) où *Tetraselmis* a semblé être d'avantage affecté ( $F_v/F_m = 0,55$ ), ce qui s'est confirmé avec une inhibition de croissance de près de 62 %. Chez la diatomée *Nitzschia closterium*, bien que la  $\text{Cl}_{50}$  au zinc ait été évaluée à  $65 \mu\text{g L}^{-1}$ , des concentrations allant jusqu'à  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  n'ont pas affecté les processus de respiration et de photosynthèse (Stauber and Florence, 1990). La croissance et les processus de photosynthèse ne sont donc pas systématiquement liés. Dans certains cas, l'allocation de l'énergie à la photosynthèse serait privilégiée à la dépense d'énergie pour la division cellulaire.

C'est lors de l'exposition de 144 heures (6 jours) de *C. calcitrans* aux métaux issus de la dissolution de l'anode galvanique que nous avons observé les effets les plus marqués sur la photosynthèse. La baisse des indicateurs  $\alpha$  et  $F_v/F_m$  pour la concentration de  $2\,829 \mu\text{g L}^{-1}$  ([Al]) traduit d'un effet important sur l'efficacité maximale d'utilisation de la lumière et sur le rendement quantique maximal du PSII. Le  $F_v/F_m$  était de 0,450 ce qui est significatif d'un état physiologique moyen. On remarque d'ailleurs que cette tendance s'est dessinée au fur et à mesure de l'augmentation des concentrations. Ce profil n'a pas été de nouveau observé lors de la deuxième exposition de 72 heures (3 jours) malgré

l'augmentation des concentrations. Comme en témoigne les résultats de bioaccumulation, ce phénomène peut s'expliquer par le fait que les cellules algales n'ont pas absorbé suffisamment d'aluminium au point d'endommager leurs fonctions physiologiques, indiquant que le temps d'exposition semble être un facteur prédominant par rapport à la concentration d'exposition. Pour résumé, l'exposition de 3 jours a entraîné une inhibition de la croissance mais pas de la photosynthèse tandis que l'exposition de 6 jours a entraîné une inhibition de la croissance associée à la modulation de certains paramètres photosynthétiques. Néanmoins, rappelons que lors de ces premières expérimentations il n'y a pas eu d'enrichissement en sels nutritifs, ce qui peut potentiellement avoir créé une limitation en phosphore, en azote ou en silice dans le milieu à la fin de l'exposition, favorisant ainsi la toxicité de l'aluminium.

Les effets observés chez *C. calcitrans* pourraient également être attribués au zinc relargué par l'anode galvanique. Le transfert du zinc à l'intérieur de la cellule peut se faire de plusieurs manières : (i) par un transport passif contrôlé par diffusion dans le cytoplasme à une vitesse proportionnelle au gradient de concentration entre le zinc extracellulaire et le zinc à l'intérieur de la membrane (Davies, 1973; Stauber and Florence, 1990), (ii) par des processus énergie-dépendants comme le transport par des protéines membranaires ayant une forte spécificité (Simkiss and Taylor, 1989), (iii) par le transport sélectif *via* des protéines intrinsèques de la membrane plasmique (Viarengo, 1989), (iv) ou encore par endocytose (Depledge and Rainbow, 1990). D'après les données de la littérature, une fois à l'intérieur de la cellule, le zinc peut ensuite exercer sa toxicité de différentes façons. Chez la diatomée *Asterionella japonica*, 60  $\mu\text{g L}^{-1}$  de zinc ont inhibé la biosynthèse de la fucoxanthine (Gillan et al., 1983). La teneur en chlorophylle a de *Chlamydomonas variabilis* a diminué avec l'augmentation de la concentration en zinc dans le milieu (Bates et al., 1985). La  $\text{Cl}_{50}$  au sulfate de zinc de la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* a été évaluée à 32,89  $\text{mg L}^{-1}$  après 96 h d'exposition (Horvatic and Persic, 2007). Le zinc peut également réduire le pool de glutathion (GSH) dans la cellule en se liant aux fonctions thiol, ce qui peut être considéré comme un mécanisme de détoxification (Stauber and Florence, 1990). Le GSH est nécessaire au bon fonctionnement de l'algue pour maintenir un potentiel d'oxydoréduction du cytoplasme de la cellule, permettant d'éliminer les ROS mais également pour les processus de division cellulaire. Cette diminution a pour conséquence de stimuler indirectement la glutathion réductase qui est nécessaire à la production de GSH. Ce processus utilise ainsi d'avantage d'ATP qui n'est plus disponible pour les mécanismes de division cellulaire. L'exposition au zinc (200  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de la diatomée *N. closterium* a induit une augmentation de l'activité de la chaîne de transport des électrons au niveau des mitochondries (Stauber and Florence, 1990). Une telle augmentation de la production d'ATP est probablement nécessaire à la synthèse de GSH au détriment d'autres processus nécessitant de l'énergie, notamment la division cellulaire. Cependant, d'après nos résultats, les niveaux

intracellulaires en zinc de *C. calcitrans* étaient inférieurs à la limite de détection et nous avons seulement quantifié du zinc adsorbé à la surface de la cellule, ce qui laisserait à penser que c'est plutôt l'aluminium qui est responsable des effets observés sur la croissance et la photosynthèse chez cette espèce.

Il est important de rappeler que la comparaison de nos résultats avec la bibliographie reste difficile. La toxicité des métaux chez le phytoplancton est très dépendante de la densité cellulaire initiale des algues (Franklin et al., 2002; Moreno-Garrido et al., 2000). Une biomasse algale plus importante signifie une adsorption métallique globale plus élevée et par conséquent une diminution de la concentration du contaminant dans le milieu. Or, malgré le fait que nous avons fait au mieux pour homogénéiser les densités initiales des algues à chaque exposition, il y avait tout de même parfois de légères différences entre les réplicats. De plus, chaque espèce de microalgue possède sa propre courbe de croissance, avec une phase de latence, une phase de croissance exponentielle et une phase plateau. Nous avons essayé au mieux pour chaque espèce de synchroniser les expositions sur la phase de croissance exponentielle mais cela s'est avéré parfois difficile à réaliser.

À notre connaissance, ces travaux en milieu contrôlé sont les premiers à s'intéresser à l'impact des anodes galvaniques à base d'aluminium sur une sélection de plusieurs espèces représentatives de la diversité phytoplanctonique. Les microalgues benthiques et planctoniques sont les principaux producteurs primaires dans les eaux côtières et estuariennes et sont un des maillons essentiels des réseaux trophiques. Les effets néfastes à ce niveau trophique peuvent affecter indirectement d'autres espèces de l'écosystème (Fleege et al., 2003). De plus, les microalgues ont également un rôle de puits de carbone et absorbent une quantité importante de CO<sub>2</sub> atmosphérique (Iglesias-Rodríguez et al., 2002). Une altération de l'état de santé des communautés phytoplanctoniques pourrait impacter l'effet de serre renforçant la tendance actuelle du changement climatique. Les résultats acquis au cours de ces premières expérimentations préliminaires nécessitent d'être approfondis, ce qui est notamment l'une des missions du projet ECOCAP dans lequel sont impliqués des chercheurs du laboratoire BOREA. Ce projet de 3 ans (2019-2024) a pour objectif d'effectuer l'analyse écotoxicologique des protections cathodiques afin d'évaluer le risque chimique des éléments libérés par les anodes galvaniques sur l'environnement marin et ses réseaux trophiques, impliquant d'autres tests de toxicité sur les microalgues.

### 3. Les Macroalgues

Tout comme le phytoplancton, les macroalgues rassemblent des espèces appartenant à des groupes taxonomiques variés. Par définition, ce sont des organismes aquatiques pluricellulaires macroscopiques photosynthétiques. Les macroalgues remplissent également un rôle de producteur primaire des écosystèmes marins d'où l'importance d'étudier l'effet des métaux libérés par une anode galvanique à base d'aluminium sur ce corpus d'espèces. Au cours de ces trois ans de thèse, des premières investigations ont été réalisées à l'occasion de plusieurs expérimentations sur différentes espèces de macroalgues que sont : *Palmaria palmata*, *Laminaria digitata*, et *Ceramium tenuicorne*. En tant que grande algue brune à la croissance lente, *L. digitata* est une espèce ingénieuse des grandes forêts de laminaires des étages infralittoral et circalittoral, qui constituent des habitats pour de nombreux organismes. *P. palmata* est une espèce des estrans rocheux, souvent utilisée pour nourrir différents invertébrés en élevage comme les ormeaux et les oursins. Enfin, *C. tenuicorne* est une petite algue rouge à la croissance rapide, qui est un bon modèle pour les essais de toxicité chez les macroalgues (Eklund, 2005; Ytreberg et al., 2010).

On peut diviser les expérimentations en deux volets :

- Volet 1 : Des expositions réalisées dans des grands volumes d'eau avec deux espèces (*Laminaria digitata* et *Palmaria palmata*). Les indicateurs étudiés étaient la bioaccumulation des métaux constitutifs de l'anode dans le thalle des algues, ainsi que la croissance et l'analyse des paramètres photosynthétiques pour *L. digitata*.
- Volet 2 : Des essais AFNOR normalisés (ISO 10710 :2010) dans des petits volumes d'eau (boîte de pétri) pour l'espèce *Ceramium tenuicorne* avec la croissance en guise de biomarqueur.

#### 3.1. *Laminaria digitata*

##### 3.1.1. Matériel et Méthode

Des macroalgues de l'espèce *L. digitata* ont été récoltées sur l'estran au Cap Levi à Fermanville dans la Manche (en Normandie) puis ont été exposées pendant 35 jours à 4 conditions expérimentales : un témoin et trois concentrations croissantes basées sur la concentration d'aluminium (Tableau XXIII) allant jusqu'à  $581,5 \pm 106,1 \mu\text{g L}^{-1}$  pour la condition C3. La salinité (35 PSU) et le pH (8,05 à 8,3) sont restés stable au cours du temps. La température de l'eau a été maintenue à 18°C. Trois fois par semaine, l'eau a été entièrement renouvelée et supplémentée avec du milieu Conway ( $0,5 \text{ mL L}^{-1}$  d'eau de mer).

Tous les 7 jours, la longueur du stipe et de la fronde des laminaires ont été mesurées et les algues ont été pesées après essorage pendant 10 secondes. À la fin de l'exposition, les laminaires ont

également été analysées à l'aide d'un fluorimètre DIVING-PAM-II (Heinz Walz GmbH®, Germany) afin d'examiner leur activité photosynthétique en utilisant le rendement quantique maximal du PSII ( $F_v/F_m$ ) comme indicateur de l'état physiologique global. Le modèle DIVING-PAM-II est un appareil qui peut s'emporter sur le terrain et permet d'examiner la photosynthèse jusqu'à une profondeur de 50 mètres. Dans le cadre de ces travaux, les mesures ont seulement été effectuées au laboratoire. Après 5 minutes d'acclimatation à l'obscurité afin de permettre l'oxydation du pool de  $Q_A$ , le thalle de l'algue a été placé dans une chambre opaque à l'obscurité pendant 3 minutes permettant les mesures de fluorescence avec une fibre optique. Les flashes de lumière saturante étaient de  $4\,000\ \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  pendant 0,6 s. Les macroalgues ont ensuite été exposées à onze irradiances ( $E$ ) de lumière actinique allant de 0 à  $1\,490\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  séparées entre-elles par une durée de 20 s pour chaque intensité. La fluorescence minimale ( $F_0$ ) était mesurée après l'excitation de l'algue par une faible lumière bleue (470 nm). La fluorescence maximale ( $F_m$ ) était obtenue après application d'un pulse de lumière saturante (470 nm à  $4\,000\ \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  pendant 0,6 s) permettant de réduire en totalité le pool de  $Q_A$ .

Au début et à la fin de l'exposition, un échantillon d'algue de chacune des conditions a été prélevé, séché dans une étuve à 60° pendant 72 heures puis broyé à l'aide d'un mortier en céramique. Après minéralisation, les échantillons ont été analysés par SAA afin de doser l'aluminium et le zinc libérés bioaccumulés par les laminaires.

### 3.1.2. Résultats

Après 42 jours d'exposition, nous n'avons pas constaté de différence significative de croissance au niveau de la longueur du stipe et de la fronde de *L. digitata* (Kruskal-Wallis,  $p > 0.05$ ). La Figure 53 renseigne sur les concentrations en aluminium mesurées dans les laminaires à T0 et à la fin des 42 jours d'exposition. La teneur basale en aluminium dans les algues avant le début de l'exposition était de  $0,57 \pm 0,17\ \text{mg kg}^{-1}$ . Cette concentration a augmenté en même temps que la concentration en aluminium dans l'eau. Par rapport au T0, des augmentations de la teneur en aluminium d'un facteur 4,5 ; 90 ; 168 et 467 ont respectivement été calculées pour les algues des conditions témoin, C1, C2 et C3. Les algues de la condition C2 ont incorporé significativement plus d'aluminium par rapport au témoin et au T0 (Kruskal-Wallis,  $p < 0.001^{**}$ ).



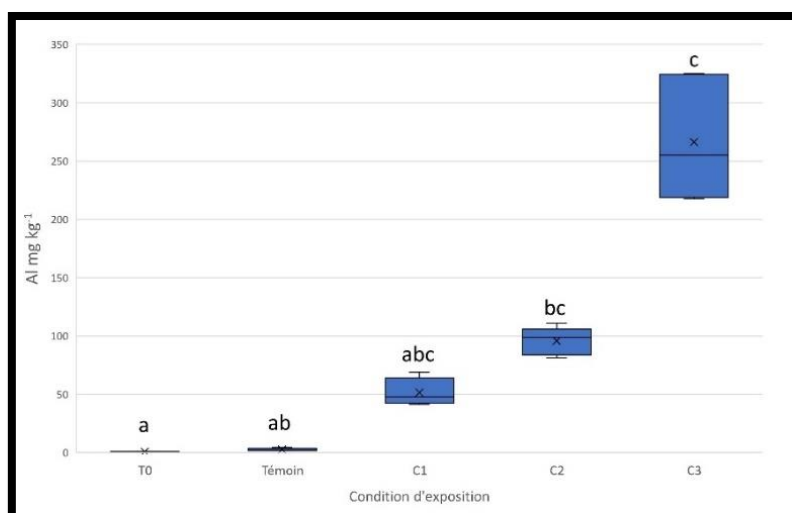


Figure 53 : Concentrations en aluminium ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) dans les macroalgues *Laminaria digitata* ( $\pm$  SEM) à la fin des 42 jours d'exposition pour les 4 conditions expérimentales. Une lettre commune à deux conditions indique une absence de différence significative entre elles.

Les facteurs de bioconcentration (BCF) sont restés relativement stables en fonction des différentes concentrations avec une valeur de 400 pour le témoin et de 460 pour la concentration C3 (Tableau XXIII).

Tableau XXIII : Concentrations en aluminium mesurées dans l'eau ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{SEM}$ ), concentrations en aluminium mesurées dans les lamineaires ( $\text{mg kg}^{-1} \pm \text{SEM}$ ), et facteurs de bioconcentration calculés à T0 et à la fin des 42 jours d'exposition pour les 4 conditions expérimentales.

| Condition d'exposition | Concentrations en aluminium dans l'eau ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | Concentration en aluminium dans les lamineaires ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) | BCF           |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------|
| T0                     | X                                                               | $0,57 \pm 0,09$                                                         | X             |
| Témoin                 | $6,17 \pm 0,32$                                                 | $2,6 \pm 0,55$                                                          | $400 \pm 200$ |
| C1                     | $87,48 \pm 13,76$                                               | $51,4 \pm 6,04$                                                         | $590 \pm 140$ |
| C2                     | $226,87 \pm 45,01$                                              | $95,7 \pm 5,33$                                                         | $420 \pm 50$  |
| C3                     | $581,55 \pm 106,12$                                             | $266,1 \pm 19,95$                                                       | $460 \pm 80$  |

Les résultats concernant l'état physiologique de ces algues (Figure 54) n'a pas révélé pas de différence significative entre les 4 conditions (Kruskal-Wallis,  $p > 0.05$ ). Le Fv/Fm des lamineaires de la condition témoin était de  $0,73 \pm 0,02$  contre  $0,69 \pm 0,04$  pour les lamineaires de la condition C3.

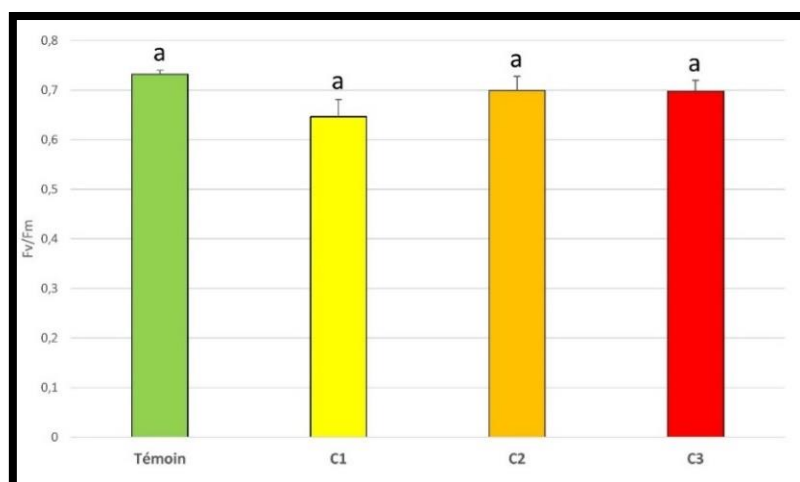


Figure 54 : État physiologique (Fv/Fm) de *Laminaria digitata* après 42 jours d'exposition pour les 4 conditions expérimentales ( $\pm$  SEM). Une lettre commune à deux conditions indique une absence de différence significative entre elles.

### 3.2. *Palmaria palmata*

#### 3.2.1. Matériel et Méthode

Des algues de l'espèce *Palmaria palmata* ont été régulièrement récoltées le long de la côte ouest du Cotentin (Normandie) pendant 4 mois afin de nourrir les ormeaux lors des expérimentations présentées dans le Chapitre III. Ces algues ont été exposées à différentes conditions pendant une semaine dans des bassins séparés des ormeaux. Tous les mois une quantité d'algues ( $28 \pm 8$  g,  $n = 54$ ) a été collectée afin de mesurer les concentrations métalliques dans les tissus.

#### 3.2.2. Résultats

Les concentrations d'aluminium et de zinc mesurées chez *P. palmata* après 1 semaine d'exposition sont présentées sur la Figure 55. Les concentrations d'aluminium ont significativement augmenté à partir de la condition C3 ( $2\,281,3 \pm 371,7$  mg kg<sup>-1</sup>) par rapport au témoin ( $310,6 \pm 54,8$  mg kg<sup>-1</sup>) (KW,  $p < 0,05$ ). La teneur en aluminium a atteint  $3\,105,0 \pm 293,7$  mg kg<sup>-1</sup> dans les algues de la condition C4. Dans le même temps, les concentrations de zinc dans les algues ont également significativement augmenté à partir de la condition C3 ( $156,8 \pm 25,6$  mg kg<sup>-1</sup>) par rapport au témoin ( $39,7 \pm 1,6$  mg kg<sup>-1</sup>) pour atteindre  $197,1 \pm 26,2$  mg kg<sup>-1</sup> dans les algues de la condition C4.

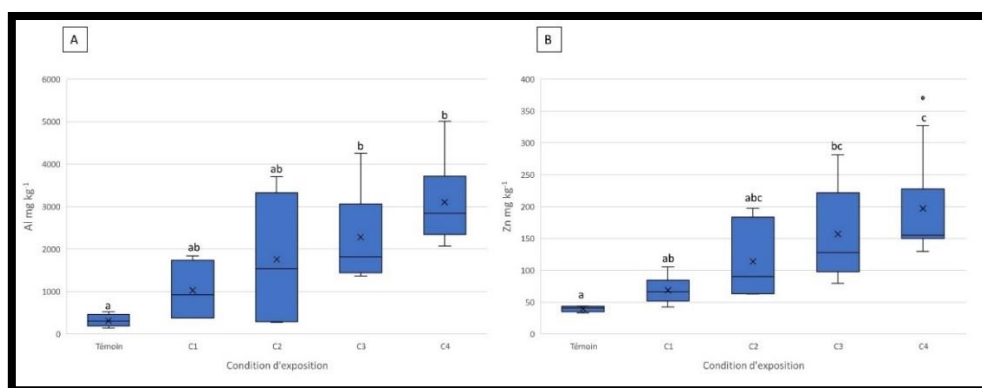


Figure 55 : Concentrations en aluminium (A) et en zinc (B) dans la macroalgue *Palmaria palmata* après une semaine d'exposition pour les 5 conditions expérimentales. Les niveaux de concentration en métaux sont exprimés en  $\text{mg kg}^{-1}$  (valeurs moyennes  $\pm$  SEM,  $n=10$ ). Une lettre commune à deux conditions indique une absence de différence significative entre elles.

Le Tableau XXIV synthétise l'ensemble des résultats obtenus chez *P. palmata* avec le calcul des BCF. On note une nette diminution des BCF concernant l'aluminium en fonction des concentrations d'exposition. En effet, le BCF des algues témoin a été évalué à 60 204 tandis qu'il n'est plus que de 13 433 pour la concentration C1 et de 1 118 pour la concentration C4. En revanche, pour le zinc les BCF sont restés du même ordre de grandeur entre toutes les conditions avec une valeur moyenne de 5175.

Tableau XXIV : Concentrations en aluminium et en zinc mesurées dans l'eau ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{SEM}$ ) et dans les algues *Palmaria palmata* ( $\text{mg kg}^{-1} \pm \text{SEM}$ ). Les facteurs de bioconcentration (BCF) après une semaine d'exposition pour les 5 conditions expérimentales sont indiqués.

| Condition d'exposition | Concentrations dans l'eau ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) |                | Concentrations dans <i>Palmaria palmata</i> ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) |                    | BCF               |                 |
|------------------------|----------------------------------------------------|----------------|---------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------|-----------------|
|                        | Aluminium                                          | Zinc           | Aluminium                                                           | Zinc               | Aluminium         | Zinc            |
| T0                     | X                                                  | X              | 736 $\pm$ 261                                                       | 46.1 $\pm$ 12.2    | 85525 $\pm$ 30360 | 5361 $\pm$ 1418 |
| Témoin                 | 5.85 $\pm$ 2.95                                    | 11.2 $\pm$ 0.6 | 310.61 $\pm$ 54.79                                                  | 39.69 $\pm$ 1.57   | 60204 $\pm$ 4412  | 3175 $\pm$ 125  |
| C1                     | 72.50 $\pm$ 6.80                                   | 14.2 $\pm$ 0.6 | 1023.97 $\pm$ 285.53                                                | 68.85 $\pm$ 8.91   | 13433 $\pm$ 3374  | 4989 $\pm$ 645  |
| C2                     | 197.40 $\pm$ 28.40                                 | 16.4 $\pm$ 0.8 | 1757.54 $\pm$ 654.79                                                | 113.79 $\pm$ 25.08 | 10158 $\pm$ 3980  | 7111 $\pm$ 1568 |
| C3                     | 953.83 $\pm$ 180.56                                | 26.5 $\pm$ 2.5 | 2281.30 $\pm$ 371.68                                                | 156.80 $\pm$ 25.60 | 2669 $\pm$ 460    | 6008 $\pm$ 981  |
| C4                     | 2963.67 $\pm$ 432.35                               | 46.9 $\pm$ 8.8 | 3105.01 $\pm$ 293.75                                                | 197.12 $\pm$ 26.17 | 1118 $\pm$ 134    | 4410 $\pm$ 604  |

### 3.3. Tests normalisés AFNOR chez *Ceramium tenuicorne*

La norme ISO 10710 :2010 spécifie une méthode de détermination de l'inhibition de la croissance de la macroalgue *Ceramium tenuicorne* par des substances et des mélanges contenus dans l'eau de mer ou par des eaux usées dont les salinités sont comprises entre 4 PSU et 32 PSU. Pour cet essai, 4 conditions expérimentales (1 témoin et 3 concentrations croissantes basées sur les concentrations d'aluminium) ont été testées.

#### 3.3.1. Matériel et Méthode

Des boutures de *C. tenuicorne* fournies par le SMEL dont la taille est comprise entre 0,6 et 1,2 mm, ont été coupées à partir d'une plus grande algue maintenue dans un milieu de culture à une salinité

de 20 PSU. Les boutures ont été disposées dans des boîtes de Petri contenant 30 mL d'eau de mer filtrée, autoclavée, enrichie en milieu d'essai spécifique (Tableau XXV) et dopée en eau contaminée produite à partir de la dissolution d'une anode galvanique à base d'aluminium.

Tableau XXV : Solutions mères de nutriments pour le test AFNOR de *Ceramium tenuicorne*.

| Réactif                                             | Concentration<br>massique du composé | Teneurs dans le milieu après ajouts<br>conformément au Tableau 3 |                                                                   |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
|                                                     |                                      | concentration<br>massique de l'élément<br>µg/l                   | concentration en<br>quantité de matière de<br>l'élément<br>µmol/l |
| 1 — Solution d'azote                                |                                      |                                                                  |                                                                   |
| KNO <sub>3</sub>                                    | 5 000 mg/100 ml                      | 3 462 (N)                                                        | 247 (N)                                                           |
| 2 — Solution de phosphore                           |                                      |                                                                  |                                                                   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 680 mg/100 ml                        | 775 (P)                                                          | 25 (P)                                                            |
| 3 — Solution de fer                                 |                                      |                                                                  |                                                                   |
| FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | 100 mg/100 ml                        | 103 (Fe)                                                         | 1,9 (Fe)                                                          |
| 4 — Solution de carbone                             |                                      |                                                                  |                                                                   |
| NaHCO <sub>3</sub>                                  | 5 760 mg/100 ml                      | 16 480 (C)                                                       | 1 370 (C)                                                         |
| 5 — Solution d'éléments à l'état de trace           |                                      |                                                                  |                                                                   |
| Na <sub>2</sub> EDTA                                | 6 000 mg/l                           |                                                                  |                                                                   |
| MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O                 | 620 mg/l                             | 10 (Mn)                                                          | 0,18 (Mn)                                                         |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 250 mg/l                             | 2,84 (Zn)                                                        | 0,043 (Zn)                                                        |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 130 mg/l                             | 2,58 (Mo)                                                        | 0,027 (Mo)                                                        |
| CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 4 mg/l                               | 0,042 (Co)                                                       | 0,000 7 (Co)                                                      |
| CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                | 4 mg/l                               | 0,05 (Cu)                                                        | 0,000 8 (Cu)                                                      |
| 6 — Solution de vitamines                           |                                      |                                                                  |                                                                   |
| Thiamine (B1)                                       | 10 mg/100 ml                         | 50                                                               |                                                                   |
| Cyanocobalamine (B12)                               | 0,1 mg/100 ml                        | 0,5                                                              |                                                                   |
| Biotine                                             | 0,1 mg/100 ml                        | 0,5                                                              |                                                                   |

Au total, 3 boutures ont été placées par boîtes de Petri (Figure 56). Pendant une semaine, les boîtes de pétri ont été maintenues à une température de 22 ± 2°C par le biais d'un bain marie thermorégulé. Un carré de lumière LED (60 x 60 cm) a assuré une luminosité homogène de 54,4 ± 5,44 µmol photon s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> avec une photopériode de 14 heures de lumière pour 10 heures d'obscurité. L'exposition a duré 1 semaine et certains critères devaient être atteints pour valider l'essai : le pH de la solution des algues de la condition témoin devait être compris entre 6,5 et 9,5 ; la variation des taux de croissance entre les réplicats des témoins ne devait pas dépasser 30% ; à la fin de l'essai, l'augmentation de la longueur des algues témoins devait être d'un facteur supérieur à 3 par rapport à la longueur initiale. Les boutures ont été mesurées à l'aide d'un papier millimétré sous loupe binoculaire en partant de la première bifurcation jusqu'au point le plus éloigné de celle-ci (Figure 56). Le taux de croissance est alors mesuré par la formule suivante :

$$\mu = \frac{l_7 - l_0}{t_7 - t_0}$$

Avec  $l_7$  (longueur après 7 jours d'exposition) et  $l_0$  (longueur initiale) en mm ainsi que  $t_7$  le nombre de jours d'exposition.

Un pourcentage d'inhibition de croissance a ensuite été calculé :

$$IC = \frac{\bar{\mu}_c - \bar{\mu}_l}{\bar{\mu}_c} \times 100$$

Avec  $\bar{\mu}_c$  (taux de croissance moyen du témoin) et  $\bar{\mu}_l$  (taux de croissance moyen de l'essai).

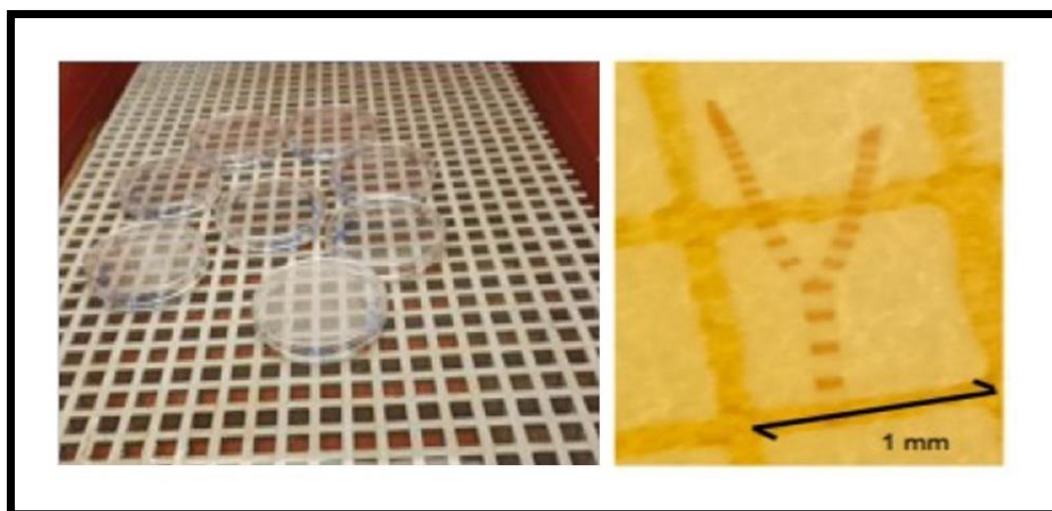


Figure 56 : Photo du système mis en place pour la croissance de *Ceramium tenuicorne* dans les boîtes de Pétri (à gauche) et photo d'une bouture de *C. tenuicorne* sous la loupe binoculaire (à droite).

Les concentrations en métaux dans le milieu pour les 4 conditions expérimentales étaient variables entre les deux essais et sont précisées dans le Tableau XXVI.

Tableau XXVI : Concentrations en aluminium ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) mesurées dans l'eau de mer au cours des différents essais réalisés chez *Ceramium tenuicorne*.

| Condition d'exposition | Concentration en Aluminium ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) |      |       |       |
|------------------------|-----------------------------------------------------|------|-------|-------|
|                        | Témoin                                              | C1   | C2    | C3    |
| Essai n°1              | 4.2                                                 | 17   | 30    | 535.8 |
| Essai n°2              | 5                                                   | 69.7 | 173.3 | 257.5 |

### 3.3.2. Résultats

Nous avons constaté un effet significatif du cocktail de métaux libéré par l'anode galvanique sur la croissance de *C. tenuicorne* pour la condition C3 ( $535,8 \mu\text{g L}^{-1}$ ) lors du premier essai avec une inhibition de croissance de près de 18 % (KW,  $p < 0,05$ ) (Figure 57). Pour le 2<sup>e</sup> essai, nous avons obtenu le même profil. Cependant, les variations entre les réplicats n'ont pas permis d'obtenir une différence statistiquement significative.

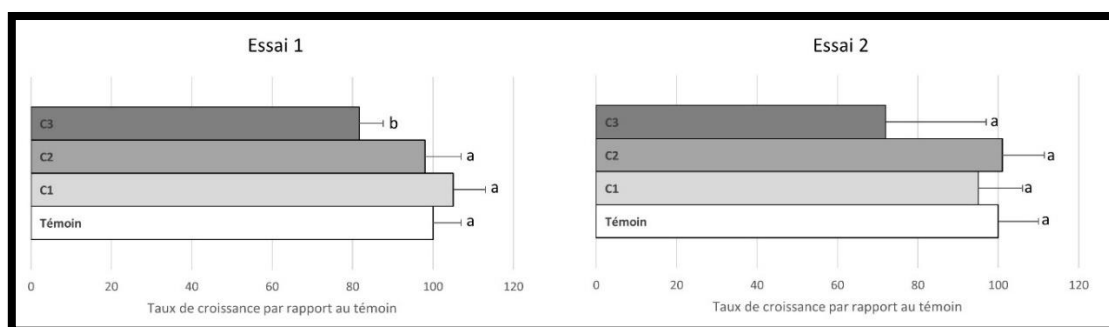


Figure 57 : Taux de croissance de *Ceramium tenuicorne* après 1 semaine d'exposition pour les différentes concentrations d'aluminium au cours des deux essais. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin. Une lettre commune à deux conditions indique une absence de différence significative entre elles.

### 3.4. Discussion

À notre connaissance, l'impact des anodes galvaniques n'avait encore jamais été étudié chez les macroalgues, et dans la littérature il existe peu d'études qui se sont intéressées aux effets de l'aluminium et du zinc sur ces producteurs primaires.

Nous avons d'abord constaté que la concentration basale en aluminium au sein des algues est très variable entre les différentes algues prélevées sur l'estran. Ainsi, la concentration pour *P. palmata* ( $736 \pm 261 \text{ mg kg}^{-1}$ ) était près de 1 300 fois plus élevée que celle *L. digitata* ( $0.57 \pm 0.09 \text{ mg kg}^{-1}$ ). De plus, quel que soit l'algue considérée, une bioaccumulation croissante en fonction de la concentration en aluminium dans le milieu a pu être constatée. Ce résultat se traduit par les valeurs de BCF. Cependant, à niveau de contamination égale dans le milieu (condition C2 pour les deux algues), *P. palmata* a présenté un facteur d'enrichissement de 5,6 par rapport au témoin tandis qu'il était de 168 pour *L. digitata*. Pourtant, en considérant les BCF, c'est *P. palmata* qui apparaît comme l'espèce qui bioaccumule le plus l'aluminium. Néanmoins, il est difficile de comparer les résultats en profondeur étant donné que le temps d'exposition n'était pas le même (42 jours contre 7 jours) et que les algues n'ont pas été récoltées sur l'estran à la même période.

À titre de comparaison, l'algue rouge *Gracilaria tenuistipitata* exposée pendant 7 jours à  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de chlorure de zinc a présenté des concentration en zinc de  $588 \text{ mg kg}^{-1}$  (Guo et al., 2013), ce qui est sensiblement plus élevé que ce que nous avons pu quantifier chez *P. palmata* ( $197,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) pour une concentration d'exposition en zinc ( $46,9 \mu\text{g L}^{-1}$ ) équivalente. Néanmoins, les teneurs à T0 dans les algues sont beaucoup plus faibles dans notre cas par rapport à l'étude de Guo et al. (2013) :  $46,1$  vs  $160 \text{ mg kg}^{-1}$ . Cela peut s'expliquer soit par une différence de concentration basale entre les espèces, soit par l'origine des organismes : ferme marine à Xiamen en Chine pour *G. tenuistipitata* vs ramassage sur l'estran en Normandie pour *P. palmata*.

Dans nos conditions expérimentales, les métaux provenant des anodes galvaniques n'ont pas impacté l'état physiologique globale de *L. digitata* comme l'ont démontré les résultats de  $F_v/F_m$ . Golding et collaborateurs (2015) ont effectué des tests de sensibilité à l'aluminium (chlorure d'aluminium) chez deux espèces australiennes appartenant également à la classe des Phaeophyceae (*Hormosira banksii* et *Ecklonia radiata*). Pour cela, les auteurs ont utilisé le taux de germination des zygotes en guise de biomarqueur (Golding et al., 2015). La plus haute concentration en aluminium testée ( $9\,800\ \mu\text{g L}^{-1}$ ) n'a pas impacté le taux de germination de *H. banksii* tandis que la  $CI_{10}$  a été enregistrée à  $6\,800\ \mu\text{g L}^{-1}$  pour *E. radiata*. Si des concentrations aussi élevées n'ont eu que très peu d'effets sur ces espèces, cela peut expliquer pourquoi nous n'avons pas constaté d'effet physiologique chez *L. digitata*. La résistance de cette macroalgue pourrait être due à un système de détoxification très efficace ou bien à la particularité des protéines impliquées dans la photosynthèse qui ne sont que peu impactées par de fortes concentrations intracellulaires en aluminium. Différents genres d'algues vertes d'eau douce (*Draparnaldia*, *Geminella*, *Hormidium*, *Mougeotia*, *Oedogonium* et *Stigeoclonium*) sont apparus comme beaucoup plus sensibles à l'aluminium puisque des concentrations de l'ordre de  $200\ \mu\text{g L}^{-1}$  ont diminué significativement la croissance de ces organismes (Kinross et al., 2000). Toutefois, la comparaison reste difficile car comme nous l'avons mentionné précédemment, la toxicité de l'aluminium et sa biodisponibilité sont dépendantes du pH, et dans l'eau douce, elles s'avèrent souvent bien supérieures qu'en milieu marin.

Les deux essais valides réalisés avec l'aide de la norme AFNOR ont démontré une inhibition de la croissance chez *C. tenuicorne* à partir d'une concentration d'aluminium de l'ordre de  $500\ \mu\text{g L}^{-1}$ . La trop faible inhibition n'a pas permis le calcul de la  $CE_{50}$ . La question de l'implication du zinc ne doit pas être omise. En guise de comparaison, pour le même test avec *C. tenuicorne* les  $CE_{20}$  et  $CE_{50}$  au sulfate de zinc heptahydraté ont été déterminées à respectivement 13 et  $47\ \mu\text{g L}^{-1}$  (norme ISO 10710 :2010) ce qui semble indiquer une sensibilité de l'algue relativement élevée au zinc, puisque ce sont des concentrations pertinentes d'un point de vue environnemental. Il est pertinent de se poser la question de quel métal du zinc ou de l'aluminium a le plus impacté la croissance de l'algue ? La concentration en zinc dans la solution d'exposition n'avait pas été mesurée au cours de cette expérimentation mais si on se réfère à tous les dosages effectués au cours de ces travaux de thèse (Figure 62), pour une concentration d'aluminium de  $535\ \mu\text{g L}^{-1}$  (C3), la concentration en zinc est estimée à  $36,1\ \mu\text{g L}^{-1}$ , ce qui se situe entre la  $CE_{20}$  et la  $CE_{50}$  de l'algue pour le sulfate de zinc. En tant que deuxième composant majoritaire de l'anode galvanique, le zinc est peut-être responsable de l'inhibition de croissance (18 %) observée dans notre essai. Considérant les résultats déjà observés, le zinc issu de l'anode galvanique serait moins biodisponible pour les algues expliquant pourquoi ici on relève une plus faible inhibition

de croissance que celle décrite dans la norme pour une concentration en zinc du même ordre (à partir d'une solution de  $\text{ZnCl}_2$ ).

En ce qui concerne les autres espèces d'algues, nos résultats ont montré que le zinc est bioaccumulé en corrélation avec l'augmentation de la concentration dans le milieu d'exposition. La toxicité du zinc chez les macroalgues marines a été très peu étudiée (Amado Filho et al., 1997; Malea et al., 2006). Après 21 jours d'exposition à  $5\,000\ \mu\text{g L}^{-1}$  ( $\text{ZnSO}_4$ ), le taux de mortalité des 6 espèces de différents groupes taxonomiques : Chlorophyceae (*Ulva lactuca* et *Enteromorpha flexuosa*), Phaeophyceae (*Padina gymnospora* et *Sargassum filipendula*), Florideophyceae (*Hypnea musciformis* et *Spyridia filamentosa*) était de 100% (Amado Filho et al., 1997). Trois espèces n'ont pas supporté la concentration de  $1\,000\ \mu\text{g L}^{-1}$  (*U. lactuca*, *E. flexuosa*, *H. musciformis*) et seul *H. musciformis* n'a pas supporté la concentration de  $100\ \mu\text{g L}^{-1}$ . La plus faible concentration en zinc ayant présenté une inhibition de la croissance chez les six espèces était de  $20\ \mu\text{g L}^{-1}$  ce qui rejoint les résultats présentés chez *C. tenuicorne* dans la description de la norme ISO (10710 :2010). Pour une concentration en zinc de  $100\ \mu\text{g L}^{-1}$ , l'algue brune *P. gymnospora* présentait le plus haut niveau d'accumulation ( $6\,488 \pm 659\ \mu\text{g g}^{-1}$  de zinc) et *H. musciformis* le plus bas niveau ( $148 \pm 252\ \mu\text{g g}^{-1}$  de zinc) pourtant c'est bien cette espèce qui apparaît comme le plus sensible. Dans une autre étude, Malea et collaborateurs (2006) ont constaté que l'exposition à  $100\ \mu\text{g L}^{-1}$  de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ) avait augmenté les pools de GSH chez *Enteromorpha prolifera* et *Enteromorpha linza* entraînant une diminution de son rapport d'oxydoréduction, ce qui peut indiquer une production de ROS induite par le zinc, telle qu'observée chez les microalgues (Malea et al., 2006; Tripathi and Gaur, 2004). Ces deux espèces de Chlorophyceae ont donc été affectées à des niveaux de zinc pertinents d'un point de vue environnemental puisque des concentrations en zinc supérieures à  $100\ \mu\text{g L}^{-1}$  ont déjà été enregistrés dans des eaux contaminées (Barcellos, 1995; Bird et al., 1996; Jahan and Strezov, 2017; Jeong et al., 2019; Wan et al., 2008). De la même manière que les essais d'embryotoxicité effectués sur les larves d'huître, le type d'effet du cocktail aluminium/zinc (synergique, additif ou antagoniste) nécessite d'être abordé dans les futures études.

Les expérimentations réalisées au cours de ces travaux de thèse sur les macroalgues ont permis l'obtention de résultats préliminaires, notamment sur la bioaccumulation des métaux et l'impact d'une anode galvanique sur la photosynthèse et la croissance des macroalgues. Il serait très intéressant de continuer les investigations en réalisant une série d'expérimentations standardisées avec une batterie d'indicateurs (bioaccumulation, croissance, paramètres photosynthétiques) sur d'avantage d'espèces représentatives des grands groupes taxonomiques de macroalgues. Des expositions ont été réalisées avec *Ulva* sp de la classe des Chlorophyceae et *Porphyra* sp de la classe Bangiophyceae, mais la mort inexpiquée des algues dans les conditions témoin n'a pas permis l'exploitation des résultats.



#### 4. Le Microphytobenthos

### Article 5: Aluminium-based galvanic anode impacts the photosynthesis of microphytobenthos and supports the bioaccumulation of metals released

Cet article a fait l'objet d'une soumission dans Aquatic Toxicology (AQTOX-S-23-00007)

#### Résumé de la publication

Au cours de l'expérimentation « effet intergénérationnel » précédemment citée dans ce manuscrit, nous nous sommes aperçus qu'il y avait de grandes différences visuelles quant à la colonisation des bacs par les algues. Les bacs témoins, où étaient placées les huîtres, étaient complètement recouverts d'un épais biofilm, tandis que les deux bacs avec les plus fortes concentrations en aluminium avaient gardé leurs parois relativement propres suggérant un pouvoir antifouling du cocktail produit par l'anode galvanique. Étudier ce compartiment de la production primaire n'était pas prévu à l'origine, mais considérant ces observations intéressantes, il a été décidé de mettre en place une expérimentation visant à caractériser l'impact d'une anode galvanique à base d'aluminium sur la colonisation du microphytobenthos. L'objectif principal de l'étude était d'évaluer les effets des métaux libérés par une anode galvanique à base d'aluminium sur la performance du microphytobenthos grâce à l'analyse des paramètres photosynthétiques, la détermination de la concentration en chlorophylle a ainsi que des substances polymères extracellulaires (EPS). Pour cela, en guise de supports, des plaques en PVC ont été fixées horizontalement à 5 cm sous la surface de l'eau en triplicat dans les bacs de 160 L où se trouvaient les huîtres à différentes concentrations d'exposition (31, 94 et 210  $\mu\text{g L}^{-1}$  d'Al).

Après 13 jours d'exposition (Figure 58), les plaques ont été récupérées et amenées à la station marine de Luc-sur-mer pour diverses analyses destinées à étudier l'impact sur la teneur en chlorophylle a, la photosynthèse et la production d'EPS des algues. Ces travaux ont été réalisés avec l'aide du Dr. Baptiste Vivier qui a développé des techniques semblables durant sa thèse intitulée « Marine infrastructures colonisation role on coastal ecosystem biodiversity and productivity in the English Channel » (Vivier, 2021). L'analyse des paramètres photosynthétiques a nécessité l'utilisation d'un fluorimètre LabSTAF (Chelsea Technologies®, UK) afin de mesurer la productivité primaire du biofilm en suspension sur des échelles spatio-temporelles beaucoup plus larges. Le fluorimètre LabSTAF permet de calculer des indicateurs de production absolue à la différence de ceux obtenus par le PAM qui sont relatifs. L'utilisation du LabSTAF permet d'améliorer les mesures relatives d'ETR normalement

obtenues avec le PAM. Cette technique est déjà appliquée aux communautés phytoplanctoniques mais elle est plus délicate à réaliser pour le microphytobenthos de substrat dur. Les résultats ont montré que plusieurs paramètres photosynthétiques ont été affectés négativement dès la plus faible concentration d'exposition ( $31 \mu\text{g L}^{-1}$  d'Al), notamment la productivité ( $ETR_{II_{max}}$ ), l'intensité de saturation de la lumière ( $E_k$ ), le rendement quantique maximal du PSII et le quenching non photochimique (NPQ).

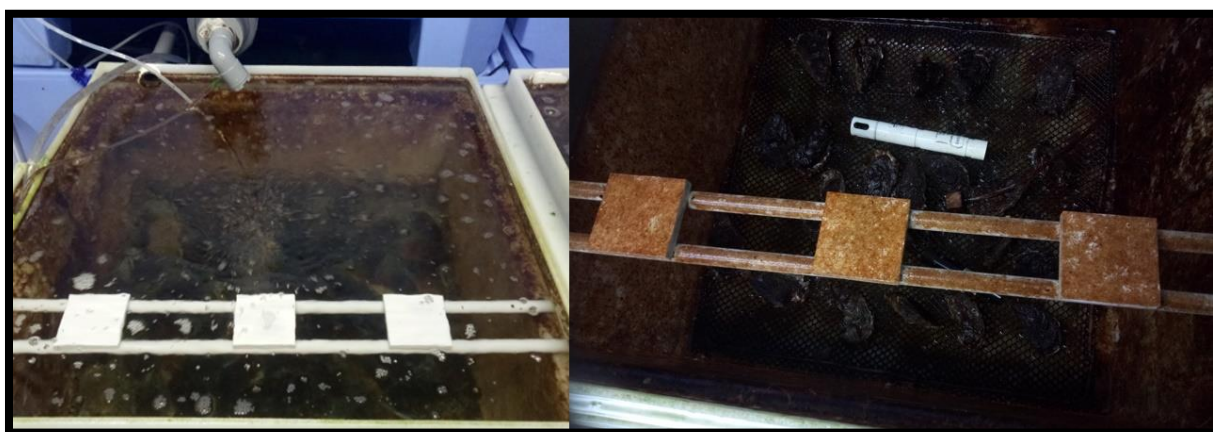
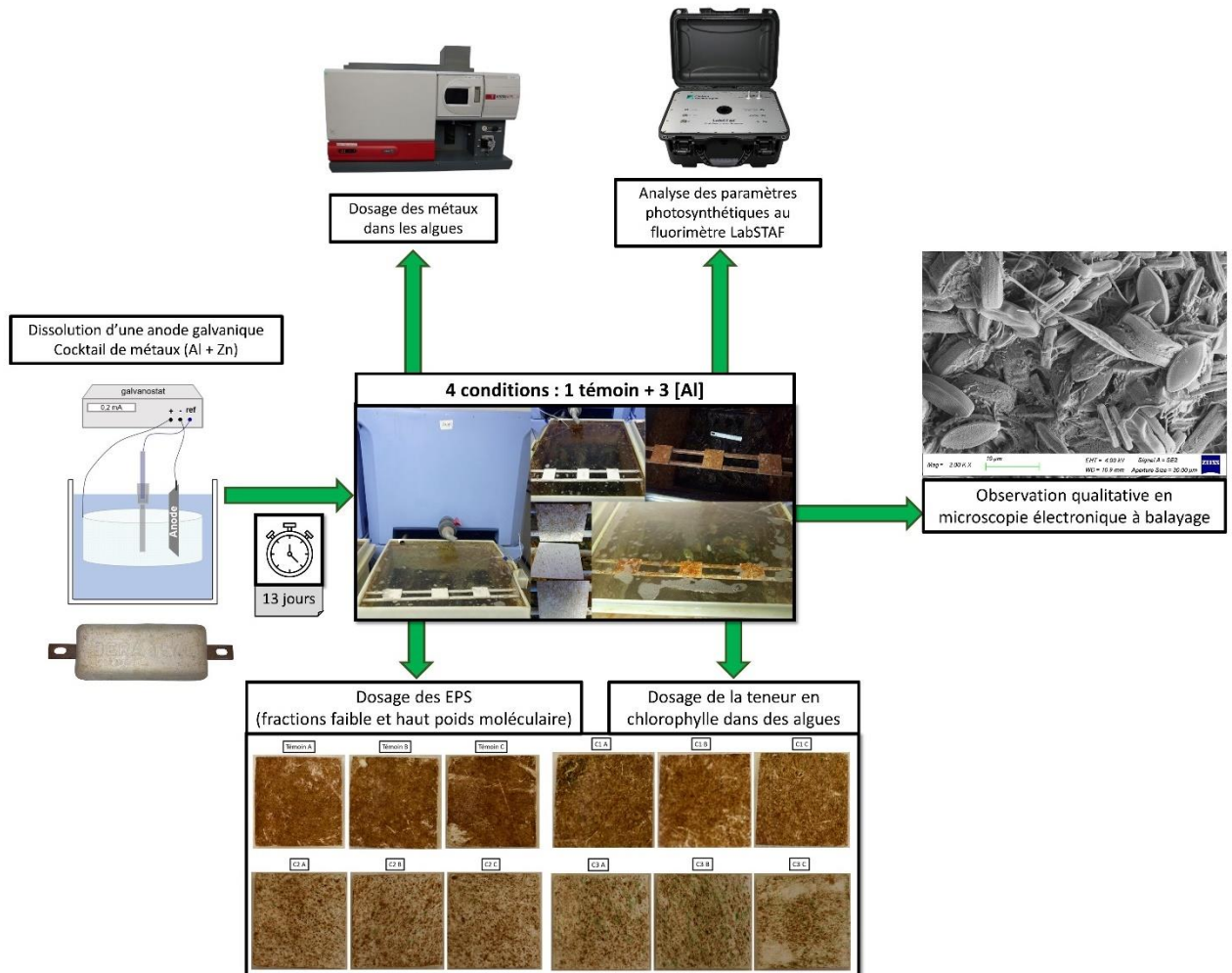


Figure 58 : Évolution de la colonisation des plaques de PVC par le microphytobenthos dans la condition témoin. Au début de l'exposition (à gauche). Après 13 jours d'exposition (à droite).

La plus forte concentration testée en métaux ( $[Al] = 210,1 \pm 60,2 \mu\text{g L}^{-1}$  ;  $[Zn] = 20,2 \pm 1,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) a diminué significativement la concentration en chlorophylle a des algues, montrant un effet marquant sur la biomasse. En ce qui concerne la production d'EPS, nous avons constaté une diminution de la production totale de la fraction glucidique et une augmentation de la fraction protéique pour les molécules de faible poids moléculaire. Les EPS jouant un rôle essentiel dans la séquestration des contaminants métalliques afin de maintenir l'intégrité des membranes biologiques et la fonctionnalité des organites cellulaires, on peut émettre l'hypothèse que cette modulation de la production d'EPS est une réponse à l'exposition à de fortes concentrations d'aluminium. Les analyses de bioaccumulation ont confirmé que le microphytobenthos a incorporé l'aluminium issu de la dissolution de l'anode galvanique ce qui est en accord avec les nombreux effets physiologiques observés. La microscopie électronique à balayage nous a permis d'identifier plusieurs groupes de diatomées benthiques avec de nombreuses espèces de Naviculaceae qui constituaient la majeure partie de la communauté. Nous avons également identifié les genres *Melosira*, *Amphora*, *Entomoneis* et l'espèce *Cylindrotheca closterium*. Certaines espèces du phytoplancton comme *Thalassiosira* sp ont également été identifiées en raison de leur sédimentation. En plus des diatomées, nous avons également observé plusieurs cyanobactéries dans les échantillons. Dans nos conditions expérimentales, en considérant les concentrations environnementales d'aluminium déjà mesurées en

milieu portuaire, nos résultats tendent à montrer que les anodes galvaniques peuvent être problématiques pour le développement du microphytobenthos dans les zones à faible hydrodynamisme et propices à un fort enrichissement en métaux.

### Récapitulatif du protocole expérimental



## Aluminium-based galvanic anode impacts the photosynthesis of microphytobenthos and supports the bioaccumulation of metals released

Levallois Alexandre<sup>1\*</sup>, Vivier Baptiste<sup>1\*</sup>, Caplat Christelle<sup>1</sup>, Goux Didier<sup>2</sup>, Orvain Francis<sup>1</sup>, Lebel Jean-Marc<sup>1</sup>, Claquin Pascal<sup>1</sup>, Chasselin Léo<sup>1</sup>, Basuyaux Olivier<sup>3</sup>, Serpentine Antoine<sup>1</sup>

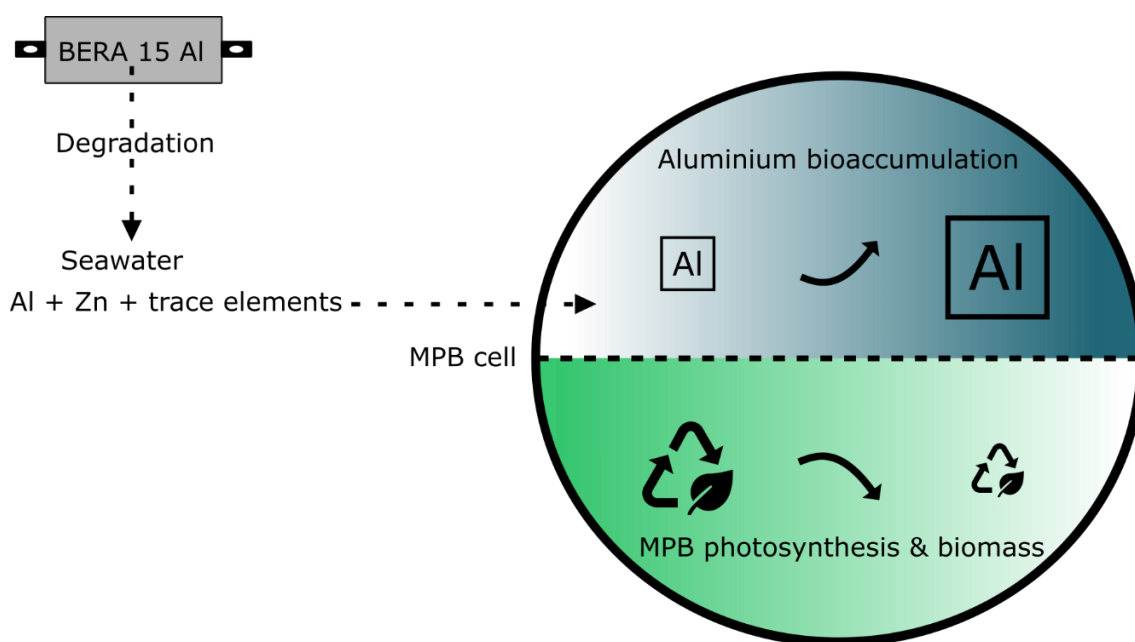
<sup>1</sup> Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA) Université de Caen Normandie UNICAEN, Sorbonne Université, MNHN, UPMC Univ Paris 06, UA, CNRS 8067, IRD, Esplanade de la paix, F-14032 Caen.

<sup>2</sup> Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie (CMABio3), Normandie Univ, US EMerode, Esplanade de la Paix, Université de Caen Normandie, 14032 Caen Cedex, France ; and CRISMAT, Normandie Univ, ENSICAEN, UNICAEN, CNRS, CRISMAT, 14000 Caen, France

<sup>3</sup> Synergie Mer et littoral (SMEL), Zac de Blainville, F-50560 Blainville-sur-Mer.

\* These authors contributed equally to the work

### GRAPHICAL ABSTRACT



### Abstract

Very few studies have looked at the potential biological effects of degradation products of galvanic anodes particularly on primary producers which are central to food webs in marine ecosystems. The galvanic anode cathodic protection system (GACP) is widely used to protect submerged metallic structures from corrosion. Aluminium (Al) and zinc (Zn) are the main constituents of galvanic anodes and are therefore released in the marine environment by oxidation process to form ions or oxy-hydroxides. The main objective of our study was to evaluate the effects of the metals released from an aluminium-based galvanic anode on microphytobenthos performance in term of

biofilm growing through the analysis of photosynthetic parameters, the determination of chlorophyll and extracellular polymeric substances (EPS). The bioaccumulation of Al and Zn were measured in the microphytobenthic compartment collected at the surface of polyvinyl chloride (PVC) plates exposed during 13 days to seawaters enriched in different concentrations of metals released from dissolution of one anode. Determination of bioconcentration factors confirmed that the microphytobenthos has incorporated Al. A significative effect was observed on the Chl *a* concentration for the higher tested concentration ( $[Al] = 210.1 \pm 60.2 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $[Zn] = 20.2 \pm 1.4 \mu\text{g L}^{-1}$ ). The seawater exposed to the anode affected the MPB productivity ( $ETR_{II_{max}}$ ) with consequences on acclimation light ( $E_k$ ), absorption cross section of PSII ( $\sigma_{PII}$ ),  $F_v/F_m$  and NPQ. Regarding the EPS production, the anode degradation presented an impact on high and low molecular weight of both carbohydrates and protein fractions of microphytobenthos suggesting that EPS play an essential role in sequestering metal contaminants to maintain the integrity of the biological membranes and the functionality of the cellular organelles. The accumulation of Al released by GACP in microphytobenthos cells could lead to physiologic problems in photosynthetic organisms.

**Keywords:** primary production, diatoms, heavy metals, hard substrate, exopolysaccharides, chlorophyll.

## 1. Introduction

Aluminium (Al) is the third most abundant element in the earth's crust and human activities contribute to its release into the environment, mainly as a consequence of the use of this element in substances to protect marine structures from corrosion. Since the 1960s it has been common practice to use galvanic anode cathodic protection (GACP) to protect steel structures such as ships, port installations, pipelines and offshore platforms (Roy, 1968). The principal metal composing the galvanic anodes are Al, zinc (Zn) or magnesium (Mg) because of their negative corrosion potential, low mass consumption, high efficiency and, of course, their low cost (Bardal, 2007). The electrochemical potential of the galvanic anode is lower than that of the metal to be protected, leading to its oxidation and thus releasing toxicologically important elements in the form of ions or oxyhydroxides into the marine environment (Reese et al., 2020). Al is considered as a non-conservative element and its colloidal aspect in water induces a variation from insoluble to soluble forms, depending on physical chemical parameters. The continuous dissolution of the anodes conducts to a potential chronical release of metals into the surrounding seawater column and/or sediments. Previous studies, focused in harbor environment, have shown Al and Zn enrichments of sediments located at proximity of galvanic anodes (Leleyter et al., 2018). The metallic enrichments of sediments were promoted in low hydrodynamics and shallow depths conditions, where aggregation and precipitation processes have been observed in the surface sediments (Caplat et al., 2020).

At the same time, the sedimentary compartment is a relevant habitat in coastal ecosystems, providing a primary source of primary production, notably through the microphytobenthos (MPB). The MPB is a group of microscopic, eukaryotic photosynthetic microalgae and cyanobacteria that live in the surface layer of sediments in estuaries and photic coastal zones, and generally occurs as a thin brownish or greenish layer (MacIntyre et al., 1996). Benthic diatoms and cyanobacteria are the major component of microphytobenthos in marine systems (Paterson, 1989b). Nevertheless, most of the internationally standardized assay methods are focused on planktonic freshwater algae while in many shallow ecosystems, the biomass of benthic microalgae frequently exceeds phytoplankton in the overlying waters (Araújo et al., 2010). The MPB is an important food source and could contribute up to 50% of total autotrophic production in some ecosystems. The MPB constitutes a pioneer assemblage for the succession of benthic communities and promotes the development of macroalgae and invertebrates in the ecosystem (Hung et al., 2007).

Biofilms are spatially and temporally variable and are influenced by environmental and biological parameters, including grazing animals and nutrient availability. Thus, the colonization of hard substrates by MPB is a critical component in the succession of new hard substrates in the marine environment (Hladysz et al., 2011). Extracellular polymeric substances (EPS) are a major component of the biofilm matrix and known to protect cells against environmental stress such as toxic substances, microbial agents, light excess and desiccation (Orvain et al., 2014; Staats et al., 2000). EPS are also important for the colonization processes (cell aggregation, substrate adhesion) and are especially essential for the formation of biofilm. EPS are mainly composed of polysaccharides (carbohydrates) and proteins, but also of macromolecules such as DNA, lipids, etc (Flemming and Wingender, 2010). EPS are generally divided into two main types: low molecular weight molecules (LMW) (soluble in alcohol) and high molecular weight polymer molecules (HMW). Respective production of these fractions depends on several factors like cells migration (Shnyukova and Zolotarova, 2015), photosynthetic process (Morelle et al., 2017) or nutrient availability (Staats et al., 2000).

Reflecting the ecological importance of the benthic primary producers like microphytobenthic biofilms in marine environments, their colonization mechanisms and drivers have been widely studied on soft (Orvain et al., 2012) and hard substrates (Vivier et al., 2021). Biological effects of Al have already been demonstrated on the growth of aquatic organisms, and more specifically on microalgae (Gensemer and Playle, 1999; Gillmore et al., 2016; Leleyter et al., 2018; Meiri et al., 1993; Zhou et al., 2018b). However, these works performed Al concentrations from a salt (sulfate or chloride) and not used the galvanic anode dissolution as source of Al in order to reproduce the mixture of metals released from the anode. In their study, Caplat et al. (2010) demonstrated that the release of Al and Zn from the galvanic anode dissolution was less toxic in the sea urchin *Paracentrotus lividus* than the

respective sulphate salts of the two metals. These results suggested different effects when Al is present in the metal mixture (produced by the anode dissolution) compared to its solubilization from a specific salt. They also confirmed that in an ecotoxicological approach conducted to assess biological effects of galvanic anodes, the experiments must include the mixture of metals to expose organisms (Caplat et al., 2010). As more and more immersed metallic structures are and will be protected by galvanic anodes, such as the increasing installation of offshore wind farms, it seems important to characterize the potential effects of metals released by galvanic anodes on primary producers since there are few scientific literatures on this topic.

The main objective of the present study was to evaluate the impact on MPB performances of metal mixture released from one aluminium-based galvanic anode. For that, polyvinyl chloride (PVC) plates were immersed in surface of seawater column exposed to the anode degradation for 13 days and under 4 experimental conditions: 1 control and 3 increasing total concentrations based on Al released from the anode. The evaluation of the effects was characterised by several indicators including the analysis of photosynthetic parameters, the determination of chlorophyll and extracellular polymeric substances (EPS), scanning electron microscopy (SEM), as well as the bioaccumulation of the different metals constituting the anode in the MPB. These parameters were associated to the application of the single-turnover method (ST) (Oxborough et al., 2012), which progressively reduces the first stable acceptor,  $Q_A$ . This method allows to calculate the functional absorption of the PSII ( $\sigma_{PSII}$ ) and to determine the carbon incorporation or electron transport rate (ETR) (Boatman et al., 2019; Oxborough et al., 2012).

## 2. Materials and Methods

The experiment was performed at the *Synergie mer et littoral* (SMEL) experimental center localized at Blainville-sur-Mer (West coast of Normandy, France) during 13 days from 22<sup>nd</sup> April to 5<sup>th</sup> May 2021 in an air-conditioned room dedicated to these experiments.

### 2.1. Experimental device

A specific experimental device was settled in controlled conditions based on previous studies performed by the authors (Caplat et al., 2010; Mao et al., 2011). This device simulates the *in situ* electrochemical dissolution of an aluminium-based galvanic anode (GACP), in order to reproduce the natural chemical speciation of metals released from the anode. A reference electrode (saturated calomel electrode - SCE), a counter electrode (CE) made of a platinize-titanium alloy and an aluminium-based anode (Al Bera15, Bac Corrosion® Control) were electrically connected together to a galvanostat (0.2 mA). The anode was composed of seven elements with the mass percentages of each metal were given by the supplier as following: 93.2% to 97.1% of Al, 2.5% to 6.5% of Zn, 0.13% max of Fe, 0.1%

max of Si, 0.01% to 0.03% of In, 0.01% max of Mn and 0.006% max of Cu. Twenty two hours after electrochemical operation and 24 hours after decantation (to eliminate most of the particulate fraction), this experimental device provided 130 L of contaminated stock solution enriched in released metals (respectively [Al] and [Zn] total concentrations of  $14,038 \pm 845 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $457 \pm 83 \mu\text{g L}^{-1}$ ). A range of concentrations, based on the measure of the Al concentration, was then achieved after dilutions of the stock solution to prepare the exposure tanks.

The exposure of MPB was performed during 13 days under 4 experimental conditions: 1 control and 3 increasing concentrations of total Al relevant from an environmental point of view. Each condition was composed of 3 tanks (2 of 500 L and 1 of 160 L) as described in a parallel study (Levallois et al., 2022).

A first 500 L tank was used for daily mixing the stock solution of seawater with natural seawater in order to achieve the dilutions. Then, the mixture of this first tank fell into the second container tank of 500 L located below the first one, which served as a reservoir and for the decantation of particles. A pump installed in this second container tank sent the contaminated water into the exposure tanks (160 L), in which white PVC panels (70 mm (L) x 70 mm (W) x 10 mm (D)) were installed as support of MPB colonization. The plates were fixed horizontally in triplicate on pipes, 5 cm below the water surface. Bubblers were installed in all the tanks. Salinity ( $32.14 \pm 0.34$  PSU), temperature ( $17.87 \pm 0.39$  °C) and pH ( $8.07 \pm 0.03$ ) were continuously recorded with a multiparameter probe (NKE®, model STYPS+30-SI) in the exposure tanks and revealed stable values under the 4 conditions. The light intensity was  $18.13 \pm 2.21 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  and was homogeneous between the different experimental conditions.

## 2.2.Measures of metallic concentrations and bioaccumulation

Seawater samples were collected every week to determine total concentrations of Al and Zn by Zeeman Atomic Absorption Spectrometer Z-AAS (AA240Z – Varian) in the 4 exposure tanks as described in a present study (Levallois et al., 2022).

A portion of the samples recovered at the end of the 13-day exposure period was analyzed for metal bioaccumulation according to the protocol of Anu et al. (Anu et al., 2016). Therefore, 50 mL of MPB resuspended in filtered seawater was centrifuged at 4,000 g for 20 min at 16 °C and the pellet was immediately suspended in 20 mL of EDTA solution (0.01M) for 20 min in order to remove all Al adsorbed on the cell walls. The sample was centrifuged again at 4,000 g for 20 min at 16 °C, then the supernatant was recovered to determine the adsorbed metals (extracellular fraction). Two drops of 69% nitric acid are added to the supernatants, which were stored at 4 °C before analyses. The remaining pellet was stored at -80 °C before being freeze-dried and digested with 5 mL of nitric acid



(>69.5% for trace analysis) under temperature (200°C). Digested residues were then adjusted to a constant volume of 25 mL with ultrapure water (18.2 MΩ.cm) and stored at + 4° C before analysis. Total concentrations of Al were measured by Z-AAS and by F-AAS for Zn.

Bioconcentration factors (BCFs) were used to assess the capacity of MPB to accumulate Al and Zn from contaminated water taking into consideration all pathways, including food (Adams et al., 2000). BCF was defined as the following ratio:

$$BCF = \frac{[Metal\ in\ biofilms]}{[Metal\ in\ seawater]} \times 0.10 \text{ (average water content in algae, CNEEIC 2011)}$$

### 2.3. Scanning electron microscopy

SEM observations were performed on the samples after the 13 days of exposure. The biofilm was removed from the PVC plates with a smooth toothbrush and then filtered with a fiberglass filter (Whatman®, GF/F, 47 mm, 0.7 µm). Overnight, samples were fixed on Thermanox™ strips with 2.5% glutaraldehyde in a buffer of sodium cacodylate (0.2 M) with 7% sucrose. The samples were then rinsed in the same buffer, dehydrated in progressive ethanol baths, then dried using the critical point bypass method with CPD 030 LEICA®. Samples were metalized with platinum with JFC 1200 JEOL®. Observations were performed with the ZEISS® Supra 55 SEM on the CRISMAT platform (Integrated research unit including CNRS, ENSICAEN and UNICAEN).

### 2.4. Chl a biomass

At the end of the 13-day experiment, the PVC plates were removed. The biofilm was carefully collected from the PVC plate samples using a soft toothbrush and then filtered in 500 mL of filtered seawater (Stericup GV Millipore, Ø 0.22 µm). We used this diluted samples for microscopic observations, the EPS extraction and the Chl *a* extraction. Then, a 150 mL sub-sample was immediately filtered through a fibreglass filter (Whatman®, GF/F, 47 mm, 0.7 µm) and frozen (-20 °C) until analysis. We added 10 mL of 90 % acetone in the samples. After 12 h in the dark at 4 °C, samples were centrifuged for 5 min at 3,000 rpm twice. The Chl *a* concentrations of the extracts were measured using a Trilogy fluorimeter (Turner Designs®, Sunnyvale, USA) according to the method of Strickland and Parsons (1968).

### 2.5. Photosynthetic parameters

MPB photosynthetic parameters of resuspended biofilms were also determined using a LabSTAF (Chelsea Technologies, UK) fluorimeter. The LabSTAF allows measurements at different wavelengths. The samples were analyzed after a 5 min period of dark incubation for the oxidation of the Quinone A (Q<sub>A</sub>). A single turnover (ST) saturation phase is delivered with a solid flash of 100 µs to

measure minimal and maximum fluorescence as described in Boatman et al. (2019). Samples were exposed to 12 intensities of increasing PAR (0 – 1,500  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) with 30-seconds intervals to obtain fluorescent-light curve (FLC). The maximum quantum efficiency of PSII ( $F_v/F_m$ ) was calculated using the following equation from Genty et al. (1989):

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{(F_m - F_0)}{F_m} \quad (1)$$

Samples were then exposed to 10 light steps of increasing PAR (from 0 to 1,500  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) for 30-seconds each step. The effective quantum efficiency of PSII ( $F_{q'}/F_{m'}$ ) was measured at each light step as (Genty et al., 1989):

$$\frac{F_{q'}}{F_{m'}} = \frac{(F_{m'} - F')}{F_{m'}} \quad (2)$$

Where  $F_{m'}$  is the maximum fluorescence under light and  $F'$  the steady state fluorescence under light. Non-photochemical quenching (NPQ) based on the relative difference between the maximum fluorescence measured in the dark-adapted state,  $F_m$ , and upon exposure to light,  $F_{m'}$  was calculated at light acclimation (20  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ):

$$NPQ = \frac{F_m - F_{m'}}{F_{m'}} \quad (3)$$

The relative electron transport rate (rETR, relative unit) was calculated for each irradiance (E in arbitrary unit) as:

$$rETR(E) = \frac{F_{q'}}{F_{m'}} \times E \quad (4)$$

The maximum relative electron transport rate ( $rETR_{\text{MAX}}$ ) was estimated by fitting the FLC data to the model of Webb et al. (1974) modified by Boatman et al. (2019) using ACT2RUN (Chelsea Technologies, UK) software to estimate  $\alpha$  and  $E_k$  with  $\alpha$ , the initial slope of the FLC (in  $\mu\text{mol electrons}$ ), and  $E_k$  the light saturation index (in  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ):

$$rETR(E) = \alpha \times E_k \times \left(1 - e^{-\frac{E}{E_k}}\right) - \beta \times E_k \beta \times \left(1 - e^{-\frac{E - E_k}{E_k \beta}}\right) \quad (5)$$

Within these equations,  $\beta$  improve some fits by incorporating a phase that accounts for possible photoinactivation of PSII complexes and/or supra-optimal levels of PSII downregulation (photoinhibition) (Boatman et al., 2019).

With  $a_{LHII}$  the absorption coefficient of PSII in  $\text{m}^{-1}$ :

$$a_{LHII} = K_a \times \frac{F_m \times F_0}{F_m - F_0} \quad (6)$$

The maximal electron transport rate ( $ETR_{II\max}$ ) is calculated as:

$$ETR_{II\max} = \frac{JV_{PII\max}}{[Chl\ a]} \quad (7)$$

Where  $ETR_{II\max}$  is expressed in  $\text{mmol e}^- \text{mg Chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$  and  $JV_{PII\max}$ ,  $\text{mmol electrons m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ , the electron flux from the PSII per volume unit.

The LabSTAF also allows to measure the absorption cross section for PSII photochemistry in the dark-regulated state,  $\sigma_{PSII}$  ( $\text{nm}^2 \text{ PSII}^{-1}$ ) at different wavelengths.  $\sigma_{PSII}$  at 452 nm in the dark-adapted state was provided by the LabSTAF. The  $\sigma_{PSII}$  is and indicative of PSII antenna size, a higher  $\sigma_{PSII}$  will indicate larger antenna, capable of higher light absorption efficiency typical of low-light acclimated organisms (Schreiber et al., 2012). The impact of metallic pollutants on these physiological parameters has not yet been assessed.

## 2.6. Extracellular polymeric substances

Water samples (10 mL) were sub-sampled in the diluted biofilm (500 mL). The sub-sample was centrifuged at 4,000 g for 20 min at 20 °C and the pellet was immediately frozen at -20 °C. Then, 5 mL of distilled water was added to each pellet and all samples were vortexed for 10 seconds. They were placed on a rotary shaker for 1 hour at 35°C before centrifugation at 4,000 g for 10 minutes at 20 °C. Two mL of supernatant was transferred into a new tube and 8 mL of absolute ethanol was added. After vortexing for 10 seconds, the samples were placed overnight in a freezer at -20°C. The next morning, the samples were centrifuged again at 4,000 g for 30 minutes to concentrate the precipitated polymeric fraction. The supernatants were recovered for low molecular weight (LMW) EPS analysis (soluble EPS) and the pellet for high molecular weight (HMW) EPS analysis (bound EPS). All samples were then placed on a dry bath set at 60°C under air flow until a dry pellet was reached. The LMW and HMW pellets are resuspended in 2 mL of distilled water, 1 mL aliquots were removed to measure carbohydrate contents and 1 mL aliquots were used to estimate protein contents with the Bradford assay (Bradford, 1976) using bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) as standard. Proteins were measured with a microplate reader at 595 nm (Flexstation 3, Molecular Device®, Sunnyvale, CA, USA, Proteogen platform US EMERODE). Results were expressed in  $\text{mg protein Chl } a^{-1}$ . For carbohydrate analysis, 1 mL of each prepared sample was added to 1 mL 5% phenol, followed by 5 mL of 96% sulphuric acid (Dubois et al., 1956). Samples were incubated for 45 minutes at ambient temperature and measurements were made using a spectrometer (Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech) at 485 nm using anhydrous glucose (Sigma-Aldrich G5767-500G) as standard for the calibration curve. EPS are expressed in  $\mu\text{g glucose cm}^{-2}$ . After being divided by the Chl  $a$  concentration to obtain the EPS production per Chl  $a$  unit, the EPS/Chl  $a$  ratio was calculated and was expressed in  $\text{mg glucose } \mu\text{g Chl}$

$\alpha^{-1}$ . In total, 4 fractions were assessed: proteins from the EPS-HMW fraction, proteins from the EPS-LMW fraction, carbohydrates from the EPS-HMW fraction and carbohydrates from the EPS-LMW fraction.

## 2.7. Statistical analyses

All the statistical analyses in the present study were performed with R studio software version 3.5.1. The normality of the data was tested with a Shapiro-Wilk normality test and, when necessary, data were transformed with the box cox function of the MASS package in R. Significant differences were tested with an ANOVA test (considering a significant p-value of 5%). Tukey post-hoc tests were carried out to determine homogeneous groups. When the box cox function was not sufficient to normalize the data, Wilcoxon or Kruskal-Wallis non-parametric tests followed by Dunn's tests were performed in order to identify potential significant differences between our experimental conditions.

## 3. Results

### 3.1. Measures of metallic concentrations in water

For C1, C2 and C3 conditions, effective concentrations of metals measured in seawaters during the experiment were respectively  $31 \pm 13.6$ ,  $94 \pm 28.4$  and  $210 \pm 60.2 \mu\text{g L}^{-1}$  for Al and  $9.2 \pm 0.8$ ,  $13.6 \pm 0.8$  and  $20.2 \pm 1.4 \mu\text{g L}^{-1}$  for Zn (Table XXVII). For the control, the Zn concentration was  $5.5 \pm 0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  but the Al concentration was below the DL of  $8.0 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Table XXVII : Measured concentrations of total aluminium and zinc ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{SEM}$ ) in the water during the exposure period for the 4 different conditions.

| Conditions | Control       | C1            | C2             | C3               |
|------------|---------------|---------------|----------------|------------------|
| Aluminium  | < LD          | $31 \pm 13.6$ | $94 \pm 28.4$  | $210.1 \pm 60.2$ |
| Zinc       | $5.5 \pm 0.5$ | $9.2 \pm 0.8$ | $13.6 \pm 0.8$ | $20.2 \pm 1.4$   |

LD = Limit of detection.

### 3.2. Bioaccumulation

Bioaccumulation results are presented in Table XXVIII. The average Al concentration for the control was  $39 \pm 8 \text{ mg kg}^{-1}$  while Zn was not detected in MPB. Al levels were significantly higher from concentration C1 onwards:  $165 \pm 20 \text{ mg kg}^{-1}$  (ANOVA,  $p < 0.001^{***}$ ). Regarding the highest exposure concentration (C3), the Al content in the biofilms was  $505 \pm 30 \text{ mg kg}^{-1}$  and significantly higher than all other conditions (ANOVA,  $p < 0.001^{***}$ ). Zn levels in the biofilm were below the detection limit for all conditions.

Table XXVIII : Bioaccumulation and bioconcentration factors (BCF) of aluminium in microphytobenthos after 13 days of exposure for the 4 experimental conditions. Bioaccumulation metals levels are expressed as mg kg<sup>-1</sup> of flesh (mean values ± SEM, n=10). These results were obtained by atomic absorption spectrometry with a Zeeman correction. A letter common to two conditions indicates that there is no significant difference between them.

|                                 | Control             | C1                    | C2                    | C3                    |
|---------------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Aluminum (mg kg <sup>-1</sup> ) | 39 ± 8 <sup>a</sup> | 165 ± 20 <sup>b</sup> | 150 ± 15 <sup>b</sup> | 505 ± 30 <sup>c</sup> |
| BCF                             | ND                  | 532                   | 160                   | 240                   |

ND = Not Detected

### 3.3. Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy allowed us to identify mainly several groups of benthic diatoms (Figure 59).

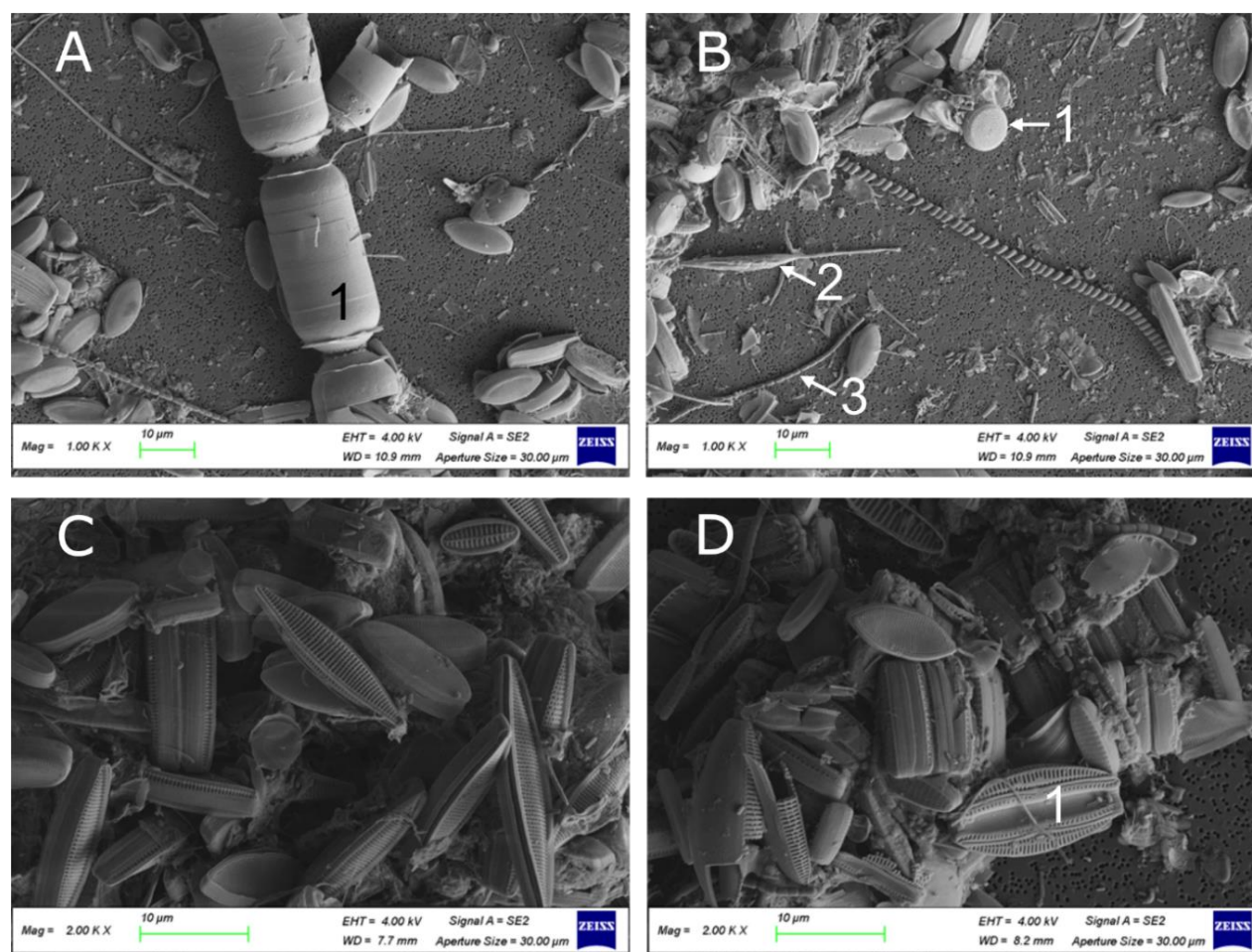


Figure 59 : Scanning electron microscopy observations of microphytobenthos performed after the 13 days of exposure. A: *Melosira* (1). B: *Thalassiosira* (1), *Cylindrotheca closterium* (2), cyanobacteria (3). C: a diversity of Naviculaceae. D: *Amphora* (1) with many Naviculaceae.

There were many different species of Naviculaceae that constituted the major part of the community. We also identified the following genus *Melosira*, *Amphora*, *Entomoneis* and the species *Cylindrotheca closterium*. Some plankton species like *Thalassiosira* sp. were also identified due to their sedimentation. In addition to diatoms, we also observed several cyanobacteria in the samples.

### 3.4. Microphytobenthic biomass and photosynthetic parameters

The MPB biomass (Figure 60A) showed a global decrease from control condition to C3 between  $0.34 \pm 0.06 \mu\text{g Chl } a \text{ cm}^{-2}$  to  $0.24 \pm 0.02 \mu\text{g Chl } a \text{ cm}^{-2}$ . Significant differences were found between conditions (Control  $\neq$  C1 & C2  $\neq$  C3; ANOVA,  $p < 0.05^*$ ). The photosynthetic yield  $F_v/F_m$  (Figure 60B) was significantly higher in the control condition ( $0.62 \pm 0.02$ ) than in the three other conditions (ANOVA,  $P < 0.001^{***}$ ).  $E_k$  (Figure 60C) was significantly higher in the control condition ( $203.17 \pm 15.90 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) than in the other ones with an intermediary mean value in C1 of  $134.73 \pm 13.98 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  and a lower value in C3 at  $92.9 \pm 5.07 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Control  $\neq$  C1  $\neq$  C2 & C3; ANOVA,  $p < 0.001^{***}$ ). The photosynthetic rate  $\alpha$  (Figure 60D) showed the same trend than the results of  $F_v/F_m$  with a lower mean value in the control condition at  $0.38 \pm 0.01 \mu\text{mol electrons } (\mu\text{mol photons})^{-1}$  and a higher one in C3 at  $0.49 \pm 0.02 \mu\text{mol electrons } (\mu\text{mol photons})^{-1}$ . Significant differences were found between conditions (Control  $\neq$  C1 & C2  $\neq$  C3; ANOVA,  $p < 0.001^{***}$ ).  $ETR_{II_{max}}$  (Figure 60E) showed the same variation with higher mean values in the control condition ( $153.25 \pm 3.82 \text{ mmol e}^- \text{ mg Chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) and lower in the others without significant differences between C1, C2 and C3. Significant differences were found between control condition and the others for  $ETR_{II_{max}}$  (ANOVA,  $p < 0.001^{***}$ ).  $\sigma_{PII}$  (Figure 60F) showed the same variation than  $ETR_{II_{max}}$  with significant higher values in the control condition ( $4.52 \pm 0.07 \text{ nm}^2 \text{ PSII}^{-1}$ ) and significant lower values in C3 ( $3.73 \pm 0.10 \text{ nm}^2 \text{ PSII}^{-1}$ ) (ANOVA,  $p < 0.001^{***}$ ). NPQ at acclimatation light (Figure 60G) showed a significant decrease between C2 and C3 with higher values in the control condition ( $0.40 \pm 0.07 \text{ rel. unit}$ ) and lower values in C3 ( $0.23 \pm 0.05 \text{ rel. unit}$ ). Significant differences were found between all conditions (Control & C1  $\neq$  C2 & C3; ANOVA,  $p < 0.001^{***}$ ).

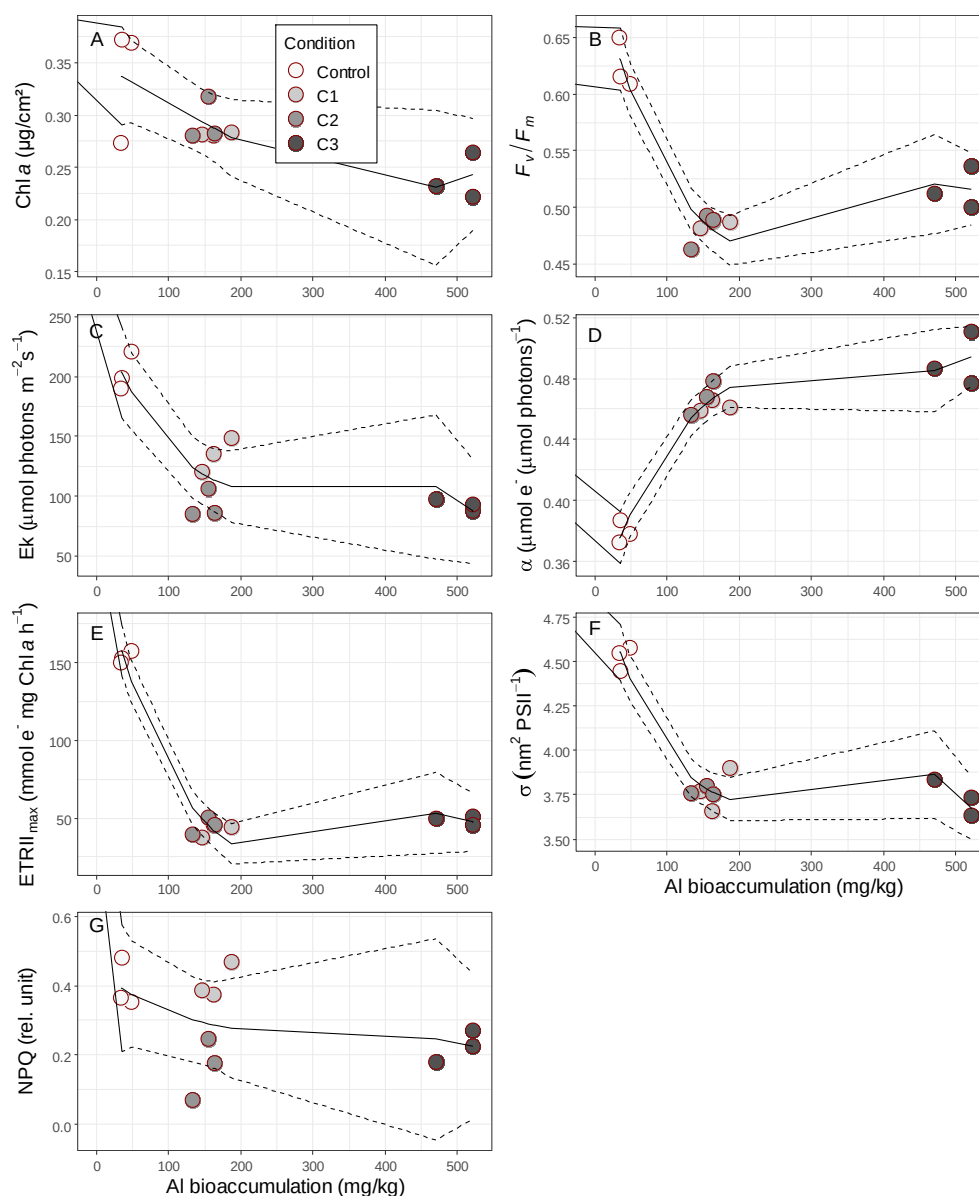


Figure 60 : Microphytobenthic photosynthetic parameters after 13 days of exposure for the 4 experimental conditions as a function of Al bioaccumulation (in  $\text{mg kg}^{-1}$ ). (A) Microphytobenthic biomass (in  $\mu\text{g Chl } a$  per  $\text{cm}^2$ ), (B)  $F_v/F_m$ , (C)  $E_k$  (in  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), (D)  $\alpha$  (in  $\mu\text{mol electrons } (\mu\text{mol photons})^{-1}$ ), (E)  $ETR_{II_{max}}$  (in  $\text{mmol e}^- \text{ mg Chl } a^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), (F)  $\sigma_{PII}$  (in  $\text{nm}^2 \text{ PSII}^{-1}$ ) and (G) NPQ (relative unit). Dotted lines represent the confidence intervals at 95%.

### 3.5.Extracellular polymeric substances

The proteins of the EPSLMW fraction (Figure 61A) showed a slight increase with higher concentrations (C3). Significant differences were found between C3 and the other conditions (Control & C1 & C2  $\neq$  C3; ANOVA,  $p < 0.05^*$ ). The proteins of the EPSHMW fraction (Figure 61B) showed a slight decrease between control and C2 and C3 conditions, with  $0.047 \pm 0.029 \text{ mg glucose } \mu\text{g Chl } a^{-1}$  in the control condition and  $0.0048 \pm 0.0063 \text{ mg glucose } \mu\text{g Chl } a^{-1}$  in C3. Control condition was significantly different from the rest (ANOVA,  $p < 0.05^*$ ). The total proteins fraction (Figure 61C) followed the same concentration profile of the LMW fraction without significant differences between conditions. The

carbohydrates from the EPSLMW fraction (Figure 61D) did not show any significant differences between conditions. The carbohydrates from the EPSHMW fraction (Figure 61E) showed significant differences between conditions (Control  $\neq$  C1 & C2  $\neq$  C3; ANOVA,  $P < 0.01^{**}$ ). As for proteins, total carbohydrates fraction (Figure 61F) follows the LMW fraction dynamic without significant differences between conditions.

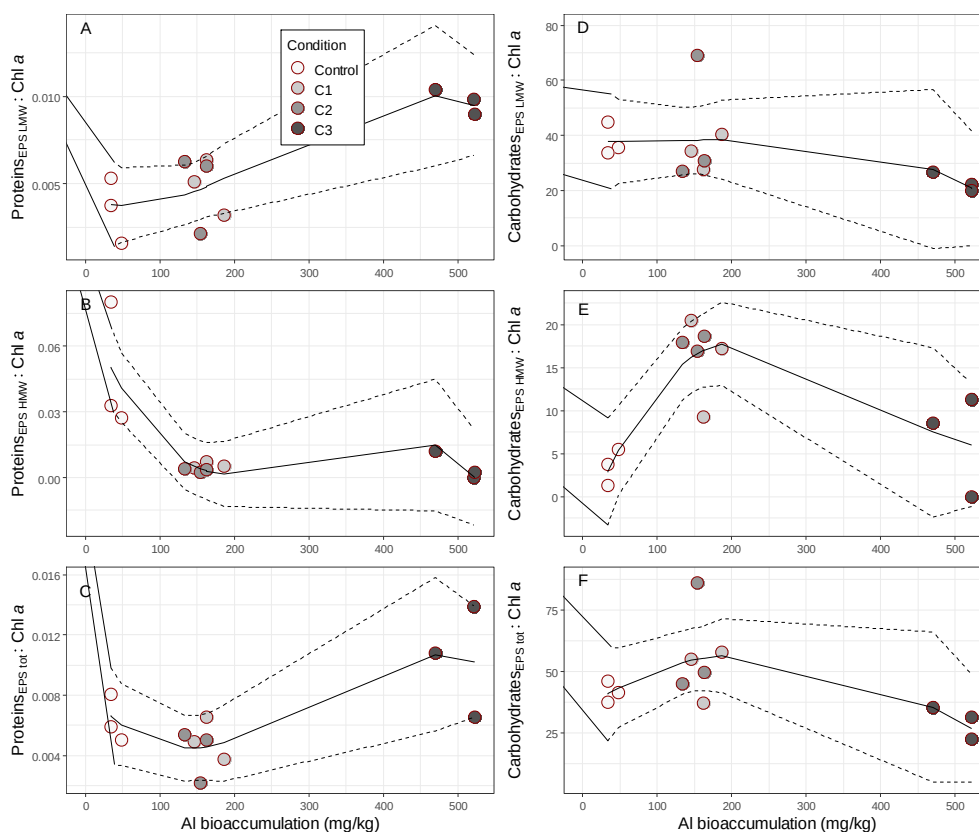


Figure 61 : EPS/Chl  $a$  ratio of proteins (A, B and C) and carbohydrates (D, E and F) fractions according to the molecular weight (LMW (A and D), HMW (B and E) and total (C and F)) after 13 days of exposure for the 4 experimental conditions as a function of Al bioaccumulation (in  $\text{mg kg}^{-1}$ ). Dotted lines represent the confidence intervals at 95%.

## 4. Discussion

Since the industrial age, the assessment of the toxicity of human contaminants on organisms has become a crucial importance to maintain a good ecological status of coastal environment as recommended by European directives such as the Marine Strategy Framework Directive (MSFD) (2008/56/EC). In order to complete data in relation to potential ecotoxicological risks of aluminium-based galvanic anodes, we conducted an experimental by having an integrative approach on the development of MPB.



#### 4.1. Aluminium in the environment

Al is characterised by its relatively short residence time (2-6 years) in surface waters (Kramer et al., 2004). In offshore seawaters, total Al is present at a concentration around  $0.7 \mu\text{g L}^{-1}$  (Tria et al., 2007), while in coastal waters total Al concentrations can be much higher. One of the highest aluminum concentrations ( $151 \mu\text{g L}^{-1}$ ) was recorded in surface waters around Port Botany, Sydney's main shipping port (Jahan and Strezov, 2017). Other sites around the world stand out, such as the port city of Antofagasta in the northern coast of Chile ( $132 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Valdés et al., 2011), or the Egyptian coast ( $106 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Abdel Ghani, 2015). A concentration of  $1,170 \mu\text{g L}^{-1}$  has even already been recorded in the port of Yamba in Australia, with an average concentration of  $224 \mu\text{g L}^{-1}$  (Jahan and Strezov, 2017). These concentrations were found on highly anthropized sites, densely populated areas subject to many economic and industrial activities. In our experiment, the highest total Al concentration released from the anode and tested was  $210 \mu\text{g L}^{-1}$  for condition C3 while the lowest concentration was  $31 \mu\text{g L}^{-1}$  for condition C1 at which significant effects were observed on MPB photosynthesis. The C1 concentration is close to natural conditions and the C2 and C3 concentrations are around those observed in heavily polluted sites. It is also important to consider that in the context of energy transition, more and more offshore wind farms are planned to be installed along the coast. It has recently been shown that for an offshore wind farm of about 75 wind turbines equipped with aluminium-based galvanic anodes, the release of Al into the environment is estimated at  $45 \text{ t y}^{-1}$  and  $2 \text{ t y}^{-1}$  of Zn, or respectively 123 kg and 5.5 kg per day (Kirchgeorg et al., 2018).

In the marine environment, Al speciation is dominated by the aluminate anion  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$  and to a lower level by the neutral Al hydroxide  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (Benezeth et al., 1997). The limit of Al solubility was determined at  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  with beyond a more and more important part of the colloidal and particulate fractions, which become dominant after  $1,500 \mu\text{g L}^{-1}$  (Angel et al., 2016; Golding et al., 2015). The exposure of MPB at the highest condition (C3) involves an Al concentration below the solubility limit of  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ , with the majority of the Al as aluminate dissolved form. Many studies have already shown that pH affects the bioavailability of Al in microalgae and consequently its toxicity to photosynthetic organisms (Gensemer, 1991; Gensemer and Playle, 1999), and studies taking this factor in consideration are required on the marine MPB. According to Millero et al. (2009), metals which form strong complexes with hydroxide and carbonate, such as Al, will undergo significant changes because of ocean acidification. The most significant change will be on the part of the  $\text{Al}(\text{OH})_3$  insoluble form, which will increase by 36% compared to the  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$  complex, making Al more bioavailable to organisms (Millero et al., 2009). Furthermore, Al absorbed by sediments is potentially remobilisable to the aqueous phase, affecting various trophic groups including benthic primary producers such as MPB (Leleyter et al., 2018).

## 4.2. Communities and impact on growth

Scanning electron microscopy allowed us to characterise the composition of the photosynthetic communities that colonised the PVC plates during the exposure. Most of photosynthetic organisms were pennate diatoms associated to cyanobacteria which is characteristic of biofilms on hard surfaces (Balqadi et al., 2018). The prevalence of pennate diatoms can be explained by a fissure along their longitudinal axis, known as raphe, which is involved in adhesion to hard substrates with capsule EPS and are also able to move over the surface (Round et al., 1990).

In our study, the Chl *a* levels show a global decrease between the control condition and C3 indicating that metals released from the anode could have an effect on the biomass of the MPB. These results were in adequation with a previous study carried out with defaunated sediments contaminated with an Al salt solution ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)$ ) (Leleyter et al., 2016). The authors observed negative effects above  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  of Al, then a contamination above  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  resulted in negative effects on growth, low Chl *a* concentrations and massive mortality of diatoms. The high concentrations of Al tested resulted in the formation of large amounts of particulate matter which probably settled on the sediment and inhibited the photosynthesis of the diatoms (Leleyter et al., 2016). Authors later demonstrated that Al released by the anode was partly linked to the acid-soluble fraction which is more available to microalgae (Leleyter et al., 2018). On hard substrates, MPB cells are submitted to various environmental constraints that can affect the growth and the physiology of the diatoms. It must also be considered that diatom communities are not the same between hard surfaces and sediment, the diatoms living in the sediment being also able to migrate vertically. Nevertheless, several genera and species described in Leleyter's experiment, are in common with our study like *Navicula* sp., *Amphora* sp. and *Cylindrotheca closterium*. Most toxicological studies on Al focus on phytoplanktonic algae meet in seawater column and the reported Al concentrations causing 10% inhibition of growth ( $\text{IC}_{10}$ ) range over a very large scale from 14 to  $6,800 \mu\text{g L}^{-1}$  highlighting the interspecificity of the sensitivity of marine microalgae to Al, mostly Bacillariophyceae (diatoms) but also Prymnesiophyceae, Chlorophyceae and Euglenophyceae (Danilov and Ekelund, 2002; Gillmore et al., 2016; Golding et al., 2015; Trenfield et al., 2015; Xie et al., 2015). Among the MPB, *Ceratoneis closterium* (previously *Nitzschia closterium*) is the main species used in ecotoxicology work. This diatom from the Fragilariaceae family has been shown to be particularly sensitive to Al with an  $\text{IC}_{10}$  value ranged from 18 to  $80 \mu\text{g L}^{-1}$  (Gillmore et al., 2016; Golding et al., 2015).

In the literature, the various studies that have covered exposures by Al used a specific salt of Al and not the dissolution of galvanic anodes to produce solubilization of Al. These different approaches may induce various chemical forms of Al and did not take into account interactions with others metals released from the electrochemical source (Caplat et al., 2010). To our knowledge, the

only study that investigated the effect of aluminium-based galvanic anodes in a photosynthetic microorganism was Bell et al. (2020). The authors reported an  $EC_{50}$  of  $5.34 \text{ mg L}^{-1}$  of Al total concentration in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, which is a considerably higher than the highest concentration (C3) tested in our experiment. At this concentration level, the dominant form of Al is the insoluble  $Al(OH)_3$ . Growth was the only indicator studied and it would have been interesting to compare data on photosynthetic parameters with the results of our study. As found in other studies, the Al sensibility of photosynthetic organisms seems to be highly dependent of the taxonomic group studied (Bell et al., 2020; Gillmore et al., 2016; Golding et al., 2015). In addition, it can be presumed that the ecology of the species also plays a role, as Al from dissolution of galvanic anodes is probably less bioavailable to planktonic algae, which is in agreement with *in situ* studies showing a more significant enrichment in the sediment than in the water column (Caplat et al., 2020).

### 4.3. Aluminium bioaccumulation in MPB biofilms

BCFs results (Table XXVIII) confirmed that the MPB has incorporated Al released from the dissolution of the galvanic anodes, in important quantity for the lower C1 condition and at the higher C3 condition. The biofilms exposed to the C1 condition incorporated significantly more Al than the control. For Zn, the levels in the biofilm were below the detection limit except for concentration C3. Despite the lack of specificity for aluminium, five main pathways by which aluminium could be transported across cell membranes have been identified in the literature: paracellular transport (1), transcellular transport (2), active transport (3), channels (4) adsorptive or receptor-mediated endocytosis (5) (Exley and Mold, 2015). BCFs measures the ability of an organism to bioconcentrate an element in its tissue considering the total concentration of that element in the water. The BCF values measured for Al in the MPB depended on the concentration of Al in the chronic exposure water. A decrease in the BCF was observed when the concentration of Al in seawater increases. In their review about metals, McGeer et al. (2003) have already reported similar relationships (McGeer et al., 2003). In the present study, BCFs for Al range from 160 to 532 indicating that the MPB is not a hyper accumulator of Al which is of the same order as oysters *C. gigas* for which the BCFs of Al released by the degradation of galvanic anodes ranged from 220 to 496 (Levallois et al., 2022). As a food source for many species, it is questionable if MPB may facilitate the entry of Al into the food web and its biomagnification in higher trophic level organisms. The transfer of Al along food webs has been studied mainly in freshwaters (Herrmann and Frick, 1995; King et al., 1992). Bioaccumulation analyses on benthic macrofauna revealed Al concentrations of about  $\frac{1}{3}$  of those in their prey and the authors conclude that the high levels of Al found in fish and birds are probably not the result of the trophic pathway (Herrmann and Frick, 1995). In contrast, the crayfish *Pacifastacus leniusculus* have been shown to accumulate Al by feeding on contaminated snails *Lymnaea stagnalis* (Walton et al., 2010).

but to our knowledge, there are no studies involving primary producers in bioconcentration processes along the trophic web. It is also important to consider that as the pH in fresh water is lower, Al is found more in the form of  $Al^{3+}$  which is more directly assimilable by organisms.

#### 4.4. Metals bioaccumulation consequences on MPB photosynthesis

There are only few studies that investigated the influence of Al on microalgae photosynthesis, and no one have investigated it on microphytobenthic organisms. For Zn, it has already been shown that exposure to this metal promoted the proliferation of tolerant species, resulting in the formation of biofilms with a more complex architecture. Exposure to  $100 \text{ mg L}^{-1}$  of Zn resulted in a decrease in the production of EPS but did not affect the biomass of the microphytobenthos (Belando et al., 2017). Microphytobenthic productivity have already been investigated regarding various environmental constraints and pressures such as grazers (Hillebrand et al., 2000), nutrient availability (Kromkamp et al., 1995), light (Kromkamp et al., 1995) or temperature (Bissett et al., 2008). However, the influence of metals released by galvanic anodes on the photosynthetic activity of benthic microphytobenthic biofilms have never been investigated. The present study showed slight consequences of metals released by aluminium-based galvanic anode on the Chl *a* biomass. Important differences of photosynthetic performances and light acclimation were observed. The productivity ( $ETR_{II_{max}}$ ), the acclimation light ( $E_k$ ), the absorption cross section of PSII ( $\sigma_{PII}$ ), the  $F_v/F_m$  and NPQ all showed important decrease with Al concentration increasing. At the same time, our results showed important increase of  $\alpha$  with concentration. These results suggest that MPB cells have different acclimation strategies conditioned by the metal levels. On a structural aspect, the important decrease of  $\sigma_{PII}$  from low exposure (C1) highlights the strong consequence of metals from GACP bioaccumulation on the absorption energy capacity of the MPB organisms.  $\sigma_{PII}$  is related to antenna size, and spectral quality (Ruban et al., 2011), which depends on the type and number of pigments. Al bioaccumulation seemed have important consequences on MPB photobiology and may induced a reorganization of PSII antennae as illustrated by the  $\sigma_{PII}$  variations. This structural modification can explain that the phototrophic organisms were not able to perform photosynthesis correctly resulting with relatively low  $ETR_{II_{max}}$ . This is also supported by the strong decrease of acclimation light ( $E_k$ ) which underline the photoacclimation consequences of Al exposure and bioaccumulation for MPB organisms. The lower productivity recorded in exposed conditions, in particular in C3, could also be explained by the important decrease of  $F_v/F_m$ , a good proxy of the MPB physiological status. A previous study highlighted the Al effects on a marine diatom (*Phaeodactylum tricornutum*) proteome and showed the strong implication of this heavy metal in the physiological quality of these organisms (Xie et al., 2015).

Indeed, metal exposures may up- or down-regulated many cell functions, in particular the photosynthesis by a decrease of the electron transport rates (Xie et al., 2015). Our study confirmed

these hypotheses by absolute ETR measurements and, for the first time, on hard substrate benthic diatoms. The Chl *a* concentration is often considered as a primary production proxy in many studies (Zhou et al., 2018a). However, our results showed that it cannot be considered only. The Al+Zn concentrations could affect growth and biomass differently than cells physiology and photosynthetic performances.

#### 4.5. Biofilm EPS production and composition in regard of aluminium exposures

EPS production in microphytobenthic biofilms have been widely studied in soft bottom habitats, mainly in intertidal systems. The implication of Al on EPS production has almost never been studied and never on hard substrate (natural or artificial) in regard of the photosynthetic activity of the biofilm. The present study introduces new elements on this key component of microphytobenthic biofilms, involved in various ecological and physiological functions such as cells protection, motility or adhesion (Shnyukova and Zolotariova, 2015). The EPS fraction is often considered as a “black hole” in MPB studies. A previous study investigated the effects of Al sulfate contamination of sediment and found an inhibitory effect of Al from 100 mg kg<sup>-1</sup> on the production of colloidal and bound carbohydrates in microphytobenthic biofilms (Gouali, 2013). In the same works, the growth of microphytobenthos was stimulated up to a concentration of 10 mg kg<sup>-1</sup>, but at higher concentrations an inhibition of biofilm growth and a disruption of vertical migration processes were observed. In our context, MPB growing on hard surfaces do not have the possibility to migrate vertically and therefore have limited strategies to counter chemical stress which may explain the observed effects on photosynthetic processes at lower Al concentrations. The present study showed a slight decrease of total carbohydrate production within Al bioaccumulation and different dynamics between carbohydrates from the EPS-LMW fraction and carbohydrates from the EPS-HMW fraction. The intermediate Al bioaccumulation assessed in C1 and C2 induced an increase of carbohydrates from the EPS-HMW fraction and at the same time a slight decrease of carbohydrates from the EPS-LMW fraction. This is linked with an opposite dynamic of proteins fraction: a strong decrease between the control condition and C1 or C2 was observed for the proteins from the EPS-HMW fraction and a slight increase of proteins from the EPS-LMW fraction for the same exposures. For higher Al bioaccumulation, an increase of proteins from the EPS-LMW fraction was recorded and a decrease of both carbohydrate fractions. These results highlight that microphytobenthic biofilms EPS exudation is a complex phenomenon. Orvain et al (2014) have previously shown that protein secretion from EPS is stimulated when the biofilm is confronted to environmental stress (like salinity excess for instance) and therefore proteins seem to be a good indicator of biofilm establishment. Other laboratory studies have clearly shown that the protein content of the bound EPS fraction plays a role in the early stages of biofilm development to provide

for its structuring before the increase in chlorophyll *a* production, probably by facilitating cell-to-surface attachment and cell-to-cell interactions, which could be important in the early stages of MPB development. The increase in total protein production at concentration C3 is linked with the higher bioaccumulation of Al in the cells at this condition, which may be a strategy of the biofilm in response to metallic contamination. The important production of carbohydrates from the EPS-HMW fraction in C1 and C2 may have contributed to protect the MPB cells against Al damages highlighted by the higher  $\alpha$  than in the control condition. The important loss of productivity with Al bioaccumulation especially in C3 can explain the decrease of HMW fraction in C3. This confirmed the fact that EPS-HMW production is highly linked to the photosynthesis and to the production capacity of MPB (Orvain et al., 2014; Underwood et al., 2004).

## 5. Conclusion

Based on the results of the present study, Al released from the galvanic anode (in mixture with other metals such as Zn and other trace elements constituting the anode) may potentially lead to negative consequences on the MPB physiology. Bioconcentration factors confirmed the incorporation of Al from GACP degradation into algal cells, which implies a negative effect of Al and Zn mixture on the photosynthesis of MPB. Our study shows that for a realistic concentration of Al produced by the dissolution of a galvanic anode, the physiology and the biomass of the MPB were impacted. Anode exposure have a clear impact on MPB photosynthesis by affecting their productivity with consequences on acclimation light ( $E_k$ ), absorption cross section of PSII ( $\sigma_{PII}$ ),  $F_v/F_m$  and NPQ. Regarding the EPS production, anode dissolution has an impact on both carbohydrates and protein fractions and on high and low molecular weight with a slight decrease of total carbohydrate production and an increase of the LMW Proteins fraction. These results highlighted that EPS secretion is involved in many biological and physiological functions such as cells protection against contaminants. The metals could be sequestered in the anionic matrix formed by the EPS. This capacity of adsorption and fixation of the EPS allows to protect the integrity of the biological membranes and the functionality of the cellular organelles such as the chloroplasts against the Al. This is particularly important to consider for coastal ecosystems, which are highly anthropised and subject to chemical pressure from galvanic anode degradation products that can reach high concentrations in sites with low hydrodynamism such as harbors. Even if Zn has not been significantly bioaccumulated or was in too low concentration to be detected, its role cannot be totally excluded in the observed effects on the MPB. The present study is the first to focus on the effect of the degradation products of aluminium-based galvanic anodes on hard substrate MPB physiology and photosynthesis which is relevant in an actual context of marine renewable energies development and GACP spreading. In conditions of low hydrodynamics, such as in harbors, the installation of several galvanic anodes may be problematic for the development of MPB.

Our results suggest that further studies are required on this compartment, which is often forgotten in ecotoxicological analyses.

### *Acknowledgements*

The authors thank Gwendoline Guichard for assistance at the SMEL during the experiments and Dr Richard Retoux and Mr Xavier Larose Laboratoire CRISMAT (Normandie Univ, ENSICAEN, UNICAEN, CNRS, CRISMAT, 14000 Caen, France) for technical SEM support for microscopy observations. We also thank the Normandy region and the Seine Normandy water agency (AESN) for their funding.

### **Résultats majeurs**

- Les cellules du MPB ont incorporé l'aluminium provenant de la dégradation de l'anode galvanique contrairement au zinc.
- La physiologie et la biomasse du MPB ont été affectées par une concentration en aluminium équivalente à une concentration environnementale.
- Plusieurs paramètres photosynthétiques ont été affectés négativement comme la productivité et le Fv/Fm ce qui indique de l'état physiologique du microphytobenthos a été impacté.
- L'exposition aux métaux libérés par l'anode galvanique a induit une diminution de la production totale de glucides et une augmentation de la fraction protéique de faible poids moléculaire des EPS.
- La libération des métaux de l'anode galvanique peut potentiellement limiter le développement du microphytobenthos dans les zones à faible hydrodynamisme.

## Discussion : Comparaison des effets des métaux relargués par une anode galvanique à base d'aluminium chez les producteurs primaires

En tant qu'organismes autotrophes, les producteurs primaires sont à la base des réseaux trophiques dans les écosystèmes. Un impact négatif sur ce compartiment biologique peut engendrer des effets cascades sur le reste des groupes écologiques. C'est pourquoi il est important de caractériser les effets du cocktail métallique libéré par les anodes galvaniques sur ce groupe fonctionnel. Au total, 7 espèces de microalgues et de macroalgues ont fait l'objet d'expositions en conditions contrôlées sur différentes durées. Ajouté à cela, nous avons étudié l'impact des métaux sur la colonisation de supports durs par le microphytobenthos.

### 1. Bioaccumulation

Tous les organismes photosynthétiques étudiés ont accumulé de l'aluminium dans leurs cellules proportionnellement à la concentration dans le milieu. La concentration en aluminium de la macroalgue *L. digitata* a atteint  $95,7 \text{ mg kg}^{-1}$  pour une concentration en aluminium dans le milieu de  $227 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , sachant que pour le témoin, la concentration était de  $2,6 \text{ mg kg}^{-1}$ , avec un facteur d'enrichissement de 37. En comparaison, la concentration en aluminium de l'algue brune *P. palmata* a atteint  $1\,757 \text{ mg kg}^{-1}$  pour une concentration en aluminium équivalente dans le milieu de  $197 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , sachant que la concentration dans le témoin était bien plus élevée ( $310,6 \text{ mg kg}^{-1}$ ) et donc un facteur d'enrichissement de seulement de 5,6. Néanmoins, la comparaison reste difficile car la durée d'exposition n'était pas la même entre les deux espèces. Pour une concentration dans le milieu équivalente ( $210 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ), nous avons rapporté une teneur de  $505 \text{ mg kg}^{-1}$  d'aluminium dans les cellules du microphytobenthos. Pour le moment, nous avons seulement fait l'acquisition des résultats de bioaccumulation chez la diatomée *C. calcitrans* lors de l'approche 1 des expositions avec les microalgues. Toujours pour une concentration équivalente à celle du milieu ( $192 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ), la diatomée a présenté un niveau intracellulaire en aluminium de  $37 \text{ mg kg}^{-1}$  ce qui fait donc de cette algue l'organisme photosynthétique ayant accumulé le moins d'aluminium dans nos conditions expérimentales. Cependant, c'est également chez cette espèce que nous avons pu tester des concentrations d'exposition beaucoup plus élevées ( $2\,829 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) et où la teneur intracellulaire en aluminium a atteint  $64\,179 \text{ mg kg}^{-1}$  ce qui constitue un facteur d'enrichissement très élevé. D'après les résultats donnés pour une même concentration d'exposition, on peut établir le classement suivant en partant de l'espèce qui a accumulé le moins d'aluminium jusqu'à celle ayant accumulé le plus d'aluminium :

*Chaetoceros calcitrans* < *Laminaria digitata* < Microphytobenthos < *Palmaria palmata*



Bien évidemment ce classement ne tient pas compte la différence entre les temps d'exposition de chacune des expérimentations, qui s'explique en raison de problématiques pratiques et logistiques. Les algues rouges *P. palmata* n'ont été exposées qu'une semaine car elles étaient destinées à l'alimentation des ormeaux et le microphytobenthos n'a été exposé que 13 jours car au-delà de cette limite, le biofilm se décollait des plaques en PVC.

## 2. Croissance

Aux concentrations testées, nous n'avons constaté aucun effet sur la croissance des macroalgues tandis que la  $CI_{50}$  de la microalgue *C. calcitrans* a été évaluée à 20 702  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour une exposition de 72 heures et à 999  $\mu\text{g L}^{-1}$  lors d'une exposition de 144 heures (6 jours). Concernant les trois autres espèces de microalgues testées, nous avons été en mesure de calculer des  $CI_{50}$  avec le chlorure d'aluminium de respectivement 468, 921 et 2 620  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour *T. suecica*, *E. huxleyi* et *I. galbana*, tandis que les plus fortes concentrations de la solution d'anode galvanique n'ont pas suffisamment inhibé la croissance des algues pour calculer des  $CI_{50}$ . Chez les 4 espèces étudiées, nous constatons une variabilité de la sensibilité en fonction du groupe taxonomique de microalgue. La croissance du thalle et du stipe de la macroalgue *L. digitata* n'a pas été impactée à la plus forte concentration en aluminium testée. En revanche, nous avons relevé une légère inhibition de croissance chez *C. tenuicorne* en réponse à une exposition de 535,8  $\mu\text{g L}^{-1}$  d'aluminium. Pour le microphytobenthos, une baisse significative de la concentration en Chl a (proxy de la biomasse) à partir de 210  $\mu\text{g L}^{-1}$  a été mesurée. Nous avons également pu observer une hausse de la production des protéines totales de la fraction EPS, qui était en lien avec la bioaccumulation d'aluminium plus élevée dans les cellules pour cette condition (210  $\mu\text{g L}^{-1}$  d'Al). Orvain et al. (2014) ont précédemment mis en évidence que la sécrétion de protéines de la fraction EPS était stimulée lorsque le biofilm était confronté à des stress environnementaux. Ces protéines jouent un rôle essentiel dans la mise en place du biofilm afin d'assurer sa structuration avant l'augmentation de la production de la chlorophylle a. Ainsi, ces protéines facilitent probablement l'attachement des cellules au support et améliorent les interactions entre cellules (Gerbersdorf et al., 2009; Lubarsky et al., 2010). Nous pouvons donc supposer que cette hausse de la teneur en protéines constitue une stratégie du biofilm en réponse à la contamination métallique. En comparant les résultats obtenus chez les différents modèles de producteurs primaires, c'est la croissance du microphytobenthos qui est apparue comme la plus impactée par le cocktail métallique libéré par l'anode galvanique.

## 3. Photosynthèse

Dès la plus faible concentration testée (30  $\mu\text{g L}^{-1}$  d'aluminium), nous avons mesuré des effets significatifs sur la plupart des indicateurs photosynthétiques étudiés chez le microphytobenthos

(Fv/Fm,  $\alpha$ , Ek, ETRII<sub>max</sub>), témoignant d'un effet inhibiteur important des métaux issus de l'anode galvanique sur la photosynthèse des cellules du biofilm. Les différentes espèces de microalgues que nous avons testé étaient beaucoup moins sensibles à l'aluminium et au zinc issus de l'anode galvanique en comparaison au microphytobenthos.

Toutes les espèces sont apparues plus vulnérables au chlorure d'aluminium par rapport au cocktail métallique de l'anode galvanique pour une concentration équivalente. C'est seulement lors de l'exposition de 144 heures chez *C. calcitrans*, que nous avons enregistré des effets significatifs sur plusieurs indicateurs photosynthétiques, une baisse du Fv/Fm à partir de 1 327  $\mu\text{g L}^{-1}$  d'aluminium, des augmentations de EK et de rETR<sub>max</sub> ainsi qu'une diminution de  $\alpha$  à partir de 2 829  $\mu\text{g L}^{-1}$ . L'impact sur le rendement quantique maximal du PSII (Fv/Fm) de *C. calcitrans* est visible à une concentration 44 fois plus élevée que celle pour laquelle les premiers effets ont été observés sur le microphytobenthos. La photosynthèse des trois autres espèces ne semble pas avoir été affectée par l'anode galvanique dans nos conditions expérimentales. De la même manière, les premiers résultats rapportés chez les macroalgues semblent confirmer la relative résistance de ces organismes à l'aluminium et nous n'avons constaté aucun effet significatif sur la photosynthèse de *L. digitata* après une exposition à 582  $\mu\text{g L}^{-1}$  d'aluminium.

Au cours de ces travaux de thèse, le microphytobenthos apparaît comme le groupe le plus sensible aux métaux libérés par l'anode galvanique à base d'aluminium. L'exposition à des concentrations réalistes d'un point de vue environnemental (30  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) a eu un impact significatif sur la photosynthèse du biofilm. Les différentes espèces de microalgues et de macroalgues étudiées semblent beaucoup plus résistantes et nous avons constaté peu d'effets que cela soit au niveau de la croissance ou de la photosynthèse. Cependant, tous les organismes photosynthétiques étudiés ont bioaccumulé l'aluminium libéré par l'anode galvanique dans leurs cellules et les résultats auraient peut-être été différents si nous avons pu exposer ces organismes plus longtemps comme cela est le cas dans l'environnement. Le Tableau XXIX synthétise les effets rapportés chez les différents producteurs primaires étudiés dans ce manuscrit.

Tableau XXIX : Synthèse des effets rapportés chez les différents producteurs primaires étudiés au cours des travaux de thèse. Les CE<sub>x</sub> sont basées sur les concentrations d'aluminium dans l'eau.

| Producteurs primaires      | Microphytobenthos (Article 5)                                                                                                                                     | <i>Chaetoceros calcitrans</i>                                                                                                                             | <i>Tetraselmis suecica</i>                                                                                | <i>Emiliana huxleyi</i>                                                                                  | <i>Isochrysis galbana</i>                                                                            | <i>Laminaria digitata</i>                                      | <i>Palmaria palmata</i>                                          | <i>Ceramium tenuicorne</i>                                         |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Bioaccumulation            | 505 mg kg <sup>-1</sup> d'Al<br>([Al]=210 µg L <sup>-1</sup> )                                                                                                    | 20 880 µg g <sup>-1</sup> d'Al<br>([Al]=2829 µg L <sup>-1</sup> ) (72h)<br>Vs<br>64 179 µg g <sup>-1</sup> d'Al<br>([Al]=2776 µg L <sup>-1</sup> ) (144h) | ND                                                                                                        | ND                                                                                                       | ND                                                                                                   | 266 mg kg <sup>-1</sup> d'Al<br>([Al]=581 µg L <sup>-1</sup> ) | 3105 mg kg <sup>-1</sup> d'Al<br>([Al]=2963 µg L <sup>-1</sup> ) | ND                                                                 |
| Croissance                 | Baisse significative de la concentration en Chl a<br>([Al]=210 µg L <sup>-1</sup> )                                                                               | Exposition de 72 heures<br>Cl <sub>50</sub> = 20 702 µg L <sup>-1</sup><br>Vs<br>Exposition de 144 heures<br>Cl <sub>50</sub> = 999 µg L <sup>-1</sup>    | Inhibition de 28 % non significative pour la condition la plus extrême<br>([Al]=6451 µg L <sup>-1</sup> ) | Légère stimulation de la croissance pour la condition la plus extrême<br>([Al]=6451 µg L <sup>-1</sup> ) | Aucune inhibition de croissance pour la condition la plus extrême<br>([Al]=6451 µg L <sup>-1</sup> ) | Pas d'effets significatifs ([Al]=581 µg L <sup>-1</sup> )      | ND                                                               | Inhibition de croissance de 18 %<br>([Al]=536 µg L <sup>-1</sup> ) |
| Photosynthèse              | Effets négatifs significatifs sur tous les paramètres photosynthétiques (Fv/Fm, α, Ek, ETRImax) dès la plus faible concentration<br>([Al]=31 µg L <sup>-1</sup> ) | Baisse significative de α à partir de 2829 µg L <sup>-1</sup> et Fv/Fm à partir de 1327 µg L <sup>-1</sup> d'Al                                           | Pas d'effets significatifs<br>([Al]=6451 µg L <sup>-1</sup> )                                             | Pas d'effets significatifs<br>([Al]=6451 µg L <sup>-1</sup> )                                            | Pas d'effets significatifs<br>([Al]=6451 µg L <sup>-1</sup> )                                        | Pas d'effets significatifs ([Al]=581 µg L <sup>-1</sup> )      | ND                                                               | ND                                                                 |
| Sensibilité de l'organisme | Très sensible                                                                                                                                                     | Peu sensible                                                                                                                                              | Très peu sensible                                                                                         | Très peu sensible                                                                                        | Très peu sensible                                                                                    | Très peu sensible                                              | Très peu sensible                                                | Peu sensible                                                       |

## CHAPITRE V – Discussion générale

Dans le contexte de la perte de biodiversité actuelle, du changement climatique et de la contamination des écosystèmes côtiers, il est plus qu'important de caractériser au mieux l'impact de l'homme sur le vivant. L'objectif de ce travail de thèse était d'analyser les effets potentiels d'une anode galvanique à base d'aluminium sur des organismes marins de différents niveaux trophiques et groupes taxonomiques. L'étude de l'impact des anodes galvaniques sur les êtres vivants est restée marginale jusqu'à ce jour, très peu de scientifiques se sont intéressés à cette thématique malgré l'installation croissante de structures métalliques immergées en mer impliquant la mise en place de système de protection contre la corrosion comme les anodes galvaniques.

Au cours de ce travail de thèse, plusieurs expérimentations ont été menées en milieu contrôlé sur deux espèces de mollusques, l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, et l'ormeau, *Haliotis tuberculata*, ainsi que sur des producteurs primaires que sont le phytoplancton (*Chaetoceros calcitrans*, *Emiliana huxleyi*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*), les macroalgues (*Laminaria digitata*, *Palmaria palmata*, *Ceramium tenuicorne*) et le microphytobenthos (communauté d'espèces). Les expositions menées sur les huîtres et les ormeaux adultes se sont concentrées sur l'analyse de la bioaccumulation des métaux dans les tissus ainsi que sur l'étude d'une batterie de biomarqueurs reflétant des grandes fonctions biologiques tel que la croissance, l'immunité, la reproduction et les réserves énergétiques. L'huître a également fait l'objet d'un test d'embryotoxicité pour évaluer au mieux l'impact sur son cycle de vie. Concernant les producteurs primaires, les indicateurs étudiés étaient principalement le suivi de la croissance, l'évaluation des paramètres photosynthétiques ainsi que la bioaccumulation des métaux dans les cellules.

## 1. L'intérêt d'étudier la toxicité des anodes galvaniques

Comme démontré à plusieurs reprises dans ce manuscrit, il est compliqué d'extrapoler les résultats des études écotoxicologiques réalisées sur les sels d'aluminium et de zinc pour les appliquer au potentiel impact des métaux libérés par les anodes galvaniques. C'est pourquoi, la première partie de ces travaux de thèse a consisté en la mise en place d'un dispositif expérimental reproduisant la dissolution d'une anode galvanique à base d'aluminium dans le milieu marin. Ceci, dans le but de pouvoir ensuite réaliser les différentes expérimentations sur le biote. La forme libre des métaux est considérée comme étant la plus biodisponible pour les organismes aquatiques. De nombreux paramètres physico-chimiques tels que la température, la salinité ou le pH influencent la forme chimique de l'aluminium et du zinc dans l'eau de mer. L'intérêt était donc d'exposer les organismes marins à l'ensemble des métaux libérés par l'anode galvanique et avec la même spéciation chimique que dans les conditions environnementales. Il n'était pas envisageable de réaliser des expositions avec du chlorure ou du sulfate d'aluminium dans la mesure où les anodes galvaniques relarguent également de nombreux autres métaux à l'état de trace comme l'indium, le cadmium, le fer, le silicium ou encore

le cuivre. Néanmoins, pour toutes les analyses de métaux effectuées au cours de ces 3 ans de thèse, seul l'aluminium et le zinc ont été quantifiés à des niveaux significativement supérieurs à ceux des témoins. Il a été constaté que le ratio aluminium/zinc augmentait lorsque la concentration globale en métaux augmentait dans la solution (Figure 62), notamment quand le débit ou la durée de fonctionnement du galvanostat était important. Cela explique que nous n'avons pas réussi à obtenir le même ratio aluminium/zinc entre la solution d'anode galvanique et le mélange chlorure d'aluminium et chlorure de zinc lors de l'essai d'embryotoxicité mené sur les huîtres. Ce phénomène peut s'expliquer par une modification de la spéciation de l'aluminium qui génère une fraction particulière plus importante dans le milieu à partir de 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

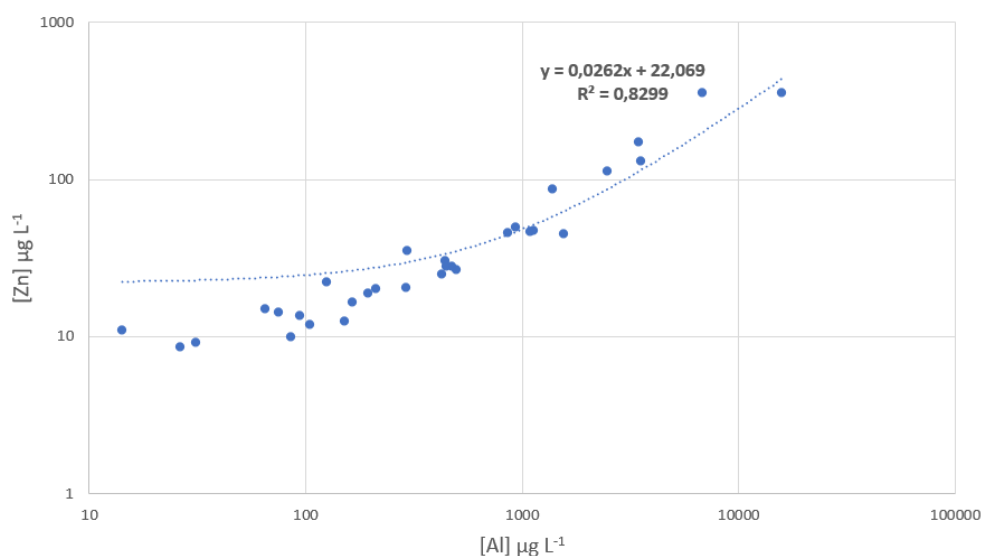


Figure 62 : Concentration en zinc par rapport à la concentration en aluminium lors de la dissolution de l'anode galvanique dans le cadre de nos expérimentations.

Plusieurs expérimentations réalisées au cours de la thèse nous ont démontré l'intérêt d'utiliser une telle solution simulant la dissolution d'une anode galvanique plutôt que du chlorure d'aluminium. En effet, les résultats du test d'embryotoxicité réalisé sur les larves d'huître ont démontré que les larves étaient plus sensibles au chlorure d'aluminium et au chlorure de zinc seuls ou en mélange par rapport à la solution d'anode galvanique. Même si nous n'avons pas réussi à obtenir les mêmes ratio aluminium/zinc dans le mélange, le calcul corrigé des SR ratio a mis en avant des effets antagonistes et additifs de la solution d'anode tandis que pour le mélange chlorure d'aluminium et chlorure de zinc, les effets étaient additifs et synergiques. Les expérimentations sur les microalgues ont également permis de comparer les effets du chlorure d'aluminium par rapport à la solution d'anode galvanique. Il en ressort que pour une concentration équivalente, le chlorure d'aluminium a d'avantage inhibé la croissance des différentes espèces de microalgues.

Ces résultats confirment ceux déjà observés par Caplat et al. (2010) qui ont montré que l'aluminium et le zinc libérés par une anode galvanique étaient moins toxiques chez l'oursin *Paracentrotus lividus* que l'aluminium et le zinc sous leur forme sulfatée. Une telle différence de toxicité est probablement due à une différence de biodisponibilité des métaux pour les organismes, liée au changement de spéciation du métal. La précipitation d'hydroxyde provoquée par la dissolution de l'anode galvanique a pour effet de réduire les espèces ioniques libres Al (III) dans le milieu qui sont les espèces chimiques préférentiellement assimilées par les organismes. Nos travaux soulignent ainsi la nécessité de recréer la dissolution des métaux à partir d'une anode si l'on veut étudier l'impact des anodes galvaniques sur les organismes marins.

## 2. Bioaccumulation des métaux

La bioaccumulation des métaux (hydrophiles) résulte de phénomènes différents de ceux de la bioaccumulation des substances organiques (le plus souvent hydrophobes). L'aluminium et le zinc issus de la dissolution de l'anode galvanique ont deux voies d'entrée possibles chez les organismes aquatiques étudiés. Le milieu d'exposition, c'est-à-dire l'eau contaminée dans laquelle vivent les organismes, constitue la première voie d'entrée. Généralement c'est à partir de l'épithélium branchial ou du manteau que les métaux sont incorporés chez les mollusques, tandis que chez les algues les métaux sont incorporés soit par transport actif, soit par endocytose par l'intermédiaire de protéines (Arunakumara and Zhang, 2008). Chez les consommateurs primaires, l'alimentation constitue la deuxième voie d'entrée des métaux, ces derniers sont intégrés à la nourriture consommée et sont ensuite absorbés par la paroi du tractus digestif. Ces différentes voies de contamination coexistent pour un même métal, et leur importance relative est aussi en fonction de la biodisponibilité de ce métal dans l'environnement et donc de sa forme chimique.

Actuellement, il existe peu de données dans la littérature sur le transfert de l'aluminium dans la chaîne trophique. L'étude sur l'acidification du lac Little Rock dans l'Arkansas aux Etats-Unis a montré que la charge en aluminium entre différents groupes taxonomiques était la suivante : perche < zooplancton < phytoplancton ce qui semble indiquer une dilution de l'aluminium le long de la chaîne trophique (King et al., 1992). Herrmann et Frick (1995) n'ont également trouvé aucune preuve de l'accumulation d'aluminium en amont de la chaîne alimentaire. Lors d'une étude réalisée dans les cours d'eau suédois de différentes acidités et concentrations d'aluminium, des prédateurs tels que *Isoperla grammatica* (Plécoptère) avaient systématiquement des concentrations d'aluminium plus faibles d'environ un tiers de celles des proies dont ils se nourrissaient. Ces auteurs ont conclu que les niveaux élevés d'aluminium chez les poissons dulçaquicoles et les oiseaux ne sont probablement pas le résultat de l'alimentation d'organismes benthiques dans des conditions acides et riches en aluminium (Herrmann and Frick, 1995). Et ainsi, ils concluent qu'il ne semble pas y avoir de

bioaccumulation de l'aluminium le long du réseau trophique comme cela a déjà été constaté pour d'autres contaminants (Gray, 2002). Parmi les organismes marins, notre étude sur les ormeaux est la première, à notre connaissance, à intégrer la thématique de transfert trophique de l'aluminium pour des eaux salines. Les ormeaux placés dans de l'eau naturelle non contaminée mais nourris avec des algues contaminées, n'ont pas accumulé significativement plus d'aluminium et de zinc que les témoins. De plus, le nourrissage avec des algues contaminées en tant que seul moyen de contamination n'a pas entraîné de variation des paramètres biologiques mesurés chez les ormeaux adultes. Les résultats des expérimentations réalisées avec la condition témoin trophique et les algues contaminées semblent indiquer que la voie trophique n'est pas la principale voie d'assimilation de l'aluminium et du zinc chez l'ormeau. Le milieu d'exposition serait donc la principale voie de contamination.

Les métaux présents dans le milieu aquatique se trouvent surtout sous des formes hydrophiles et hydratées et ne peuvent pas traverser les membranes biologiques par simple diffusion. Leur prise en charge fait alors appel à un transport facilité qui implique des transporteurs protéiques ou canaux transmembranaires qui peuvent se retrouver à saturation pour des concentrations élevées en métaux (Pelletier and Campbell, 2008). Chez tous les organismes, l'aluminium est biochimiquement réactif, par contre il n'est requis pour aucun processus biologique essentiel connu (Exley and Mold, 2015). À l'heure actuelle, il n'existe aucune preuve biochimique sur la conservation des processus impliquant l'aluminium au cours de l'évolution et il n'existe pas de ligands, de protéines de transport spécifiques ou des canaux pour faciliter son passage à travers les membranes de manière sélective. On peut également ajouter qu'il n'y a pas de protéines de stockage intracellulaire pour faciliter son homéostasie cellulaire et que, au cours de l'évolution, aucune voie d'excrétion spécifique à l'aluminium n'est apparue (Exley and Mold, 2015). Malgré l'absence de spécificité par rapport à l'aluminium, cinq voies principales par lesquelles l'aluminium pourrait être transporté à travers les membranes cellulaires sont identifiées dans la littérature : le transport paracellulaire (1), le transport transcellulaire (2), le transport actif (3), les canaux ou pores (4), et l'endocytose médiée par des récepteurs (5) (Exley and Mold, 2015). En fonction de sa forme chimique, l'aluminium serait préférentiellement pris en charge par l'une de ces cinq voies de transport. L'espèce chimique la plus disponible pour les organismes aquatiques, la forme trivalente libre  $Al^{3+}$ , serait plutôt destinée à passer à travers les épithéliums/endothéliums par un transport paracellulaire, mais son déplacement dans les cellules sera limité aux canaux ioniques, et dans une certaine mesure par l'endocytose médiée *via* des récepteurs (Figure 59). Les différents organismes étudiés au cours de ses travaux de thèse auraient donc principalement incorporé l'aluminium par le transport paracellulaire qui constituerait la voie dominante considérant la forme majoritaire de l'aluminium dans le milieu. D'un point de vue



mécanistique, il serait ainsi intéressant de réaliser des expérimentations à l'échelle cellulaire sur les potentielles voies d'entrée de l'aluminium.

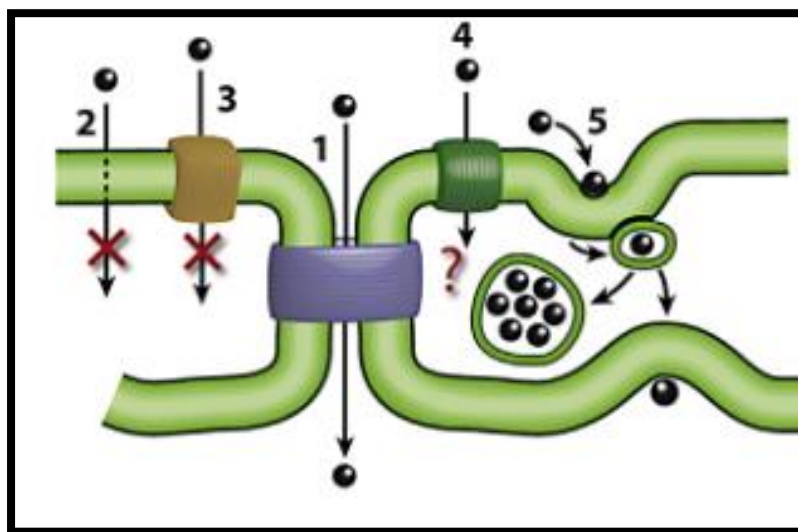


Figure 63 : Le transport de l'aluminium sous sa forme  $\text{Al}^{3+}$  à travers les membranes biologiques au moyen de différents mécanismes : le transport paracellulaire (1), le transport transcellulaire (2), le transport actif (3), les canaux ou pores (4) et l'endocytose adsorptive ou médiée par des récepteurs (5). D'après Exley and Mold (2015).

Il faut considérer que nos études en conditions contrôlées ne reproduisent pas tout à fait les conditions naturelles, ainsi les BCF calculés ne sont pas représentatifs de ce qui se passe *in situ* du fait de la formation fréquente dans l'environnement de complexes métalliques en présence de composés inorganiques et organiques. En présence de matière organique, on constate généralement une diminution notable de la toxicité des métaux, qui présentent une plus faible concentration libre et donc une plus faible biodisponibilité. Dans les essais en laboratoire, l'absence de matières organiques dissoutes ou en suspension augmente considérablement la biodisponibilité des contaminants. Il faudrait donc plutôt considérer des valeurs de BCF déterminées à une concentration pertinente pour l'environnement.

### 3. Sensibilité des organismes marins étudiés aux anodes galvaniques

Le tableau XVI (p 179) synthétise les principaux effets rapportés chez les mollusques et le tableau XXIX (p 237) les principaux effets rapportés chez les producteurs primaires étudiés lors des différentes expérimentations. Quand cela était possible, nous avons calculé des  $\text{CE}_x$  ou  $\text{CI}_x$  qui sont présentées dans le tableau en fonction des concentrations d'aluminium dans l'eau.

Les huîtres adultes ont été relativement résistantes aux plus fortes concentrations imposées ( $296 \mu\text{g L}^{-1}$  d'Al) et peu d'effets physiologiques ont été mesurés mise à part l'augmentation significative des niveaux de MDA dans la glande digestive. Pour l'expérimentation sur les ormeaux, nous avons

exposé les animaux à des concentrations plus élevées (3 550  $\mu\text{g L}^{-1}$  d'Al). La  $\text{CE}_{20}$  et la  $\text{CE}_{50}$  de la croissance pondérale des ormeaux juvéniles ont été évaluées respectivement à 442,8  $\mu\text{g L}^{-1}$  et à 1 690,7  $\mu\text{g L}^{-1}$  et les individus exposés aux plus fortes concentrations présentaient des phénomènes de dépigmentation du pied. Les ormeaux adultes ont présenté une diminution de la numération hémodocytaire, une hausse de l'activité du système lysosomal ainsi qu'une baisse des réserves de glycogènes associée à un décalage de la gamétogenèse à partir d'une concentration d'aluminium dans l'eau de 1 096  $\mu\text{g L}^{-1}$ . L'affaiblissement du système immunitaire des mollusques, même minime, peut compromettre la survie de l'animal en diminuant sa capacité de détoxification des polluants ou en le rendant plus vulnérable aux infections bactériennes et au stress. De tous les animaux étudiés, les larves d'huîtres étaient de loin le modèle le plus sensible aux métaux de l'anode puisque la  $\text{CE}_{20}$  et la  $\text{CE}_{50}$  du développement larvaire ont été évaluées respectivement à 174,5 et 190,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Les expérimentations sur les producteurs primaires ont révélé la faible sensibilité des microalgues et des macroalgues testées à l'aluminium, que cela soit au niveau de la croissance ou des effets sur la photosynthèse. Chez les trois espèces de microalgues de l'approche 2, une concentration d'aluminium de 6 451  $\mu\text{g L}^{-1}$  n'a eu aucun effet marqué sur la photosynthèse et seuls les effets sur la croissance de *C. calcitrans* ont été significatifs à partir de 3 457  $\mu\text{g L}^{-1}$ . En revanche, le microphytobenthos apparaît comme le groupe le plus sensible aux métaux libérés par l'anode galvanique. L'exposition à 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  d'aluminium a eu impact significatif sur la photosynthèse du biofilm. De plus, tous les organismes photosynthétiques étudiés ont bioaccumulé l'aluminium issu de l'anode galvanique dans leurs cellules.

Pour résumer, dans nos conditions expérimentales, le microphytobenthos est apparu comme le modèle d'étude le plus sensible, suivi des larves de *Crassostrea gigas* (Figure 64). Après cela, il est difficile de classer les huîtres adultes, les ormeaux juvéniles et les ormeaux adultes chez qui différents effets ont pu être observés à différentes concentrations entre 300 et 1 000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Ensuite, pour le reste des organismes photosynthétiques, c'est certainement la macroalgue *Ceramium tenuicorne* qui a présenté la plus grande sensibilité suivie de la diatomée *Chaetoceros calcitrans* et de la microalgue *Tetraselmis suecica*. Les macroalgues *Palmaria palmata* et *Laminaria digitata* ainsi que les microalgues *Isochrysis galbana* et *Emiliana huxleyi* n'ont présenté aucun signe d'impact physiologique même aux plus fortes concentrations testées.

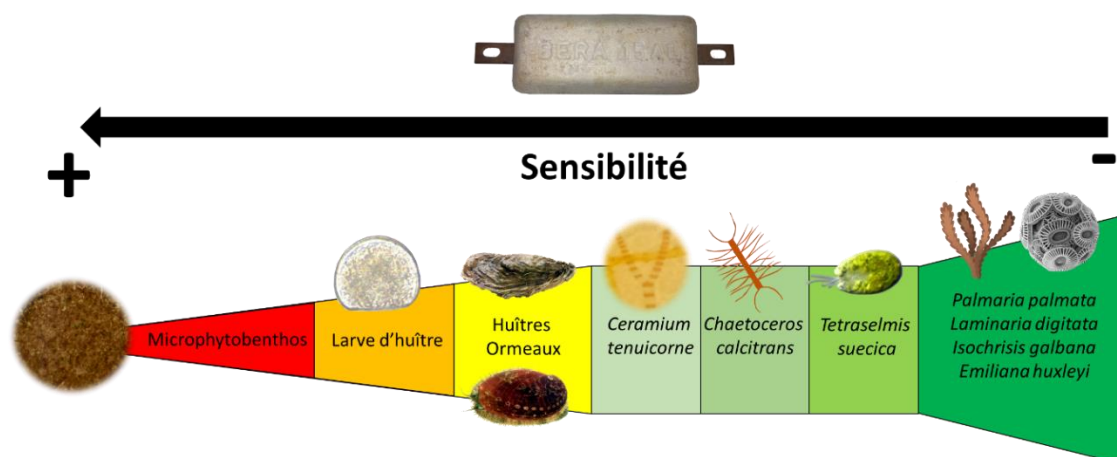


Figure 64 : Schéma récapitulatif des résultats des travaux de thèse. Les différents organismes étudiés dans nos conditions expérimentales sont classés du plus sensible au moins sensible vis-à-vis des métaux libérés par l'anode galvanique à base d'aluminium.

Avant le début des expositions, il nous a fallu cibler les concentrations auxquelles nous souhaitions exposer les différents organismes. Pour cela, nous nous sommes basés sur les données de la littérature. Comme précisé dans le Chapitre I, les concentrations d'aluminium mesurées dans le milieu naturel varient de 0,1 à 151  $\mu\text{g L}^{-1}$  avec un record de 1 170  $\mu\text{g L}^{-1}$  enregistré dans le port de Yamba en Australie (Jahan and Strezov, 2017). Dans les milieux portuaires fortement impactés par les activités humaines, les concentrations en aluminium peuvent aisément dépasser les 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Abdel Ghani, 2015; Jahan and Strezov, 2017; Valdés et al., 2011). Cependant, de manière générale, les concentrations d'aluminium dans les eaux côtières ne dépassent que rarement 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  tandis que les mesures effectuées en plein océan sont systématiquement plus faibles. Concernant le zinc, les concentrations dans les ports peuvent atteindre 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Bird et al., 1996; Wan et al., 2008), voire dépasser 1  $\text{mg L}^{-1}$  dans certains cas extrêmes (Barcellos, 1995; Jeong et al., 2019). Les niveaux élevés en métaux dans les zones portuaires s'expliquent par la multiplicité des activités humaines ainsi que par le faible renouvellement en eau de ces sites créant ainsi une zone de confinement. De plus, ce sont des milieux souvent équipés en anodes galvaniques qui favorisent également l'enrichissement en aluminium et en zinc (Caplat et al., 2020; Leleyter et al., 2007; Rousseau et al., 2009). C'est sur la base de ces données que nous avons ciblé des concentrations pertinentes du point de vue environnemental ainsi que des concentrations plus fortes afin d'établir un seuil de sensibilité des organismes et pouvoir calculer des  $\text{CE}_{50}$  quand cela s'est avéré possible.

Dans un écosystème, un substrat dur permet l'implantation d'espèces fixes et benthiques comme les mollusques, les crustacés ainsi que les nombreux producteurs primaires dont ils dépendent comme le microphytobenthos ou les macroalgues qui sont à la base des réseaux trophiques des substrats durs. D'un autre côté, les réseaux trophiques des substrats meubles tendent à être dominés

par des décomposeurs et des diatomées qui effectuent des migrations verticales dans le sédiment. D'après nos résultats, le microphytobenthos pourrait être impacté par le cocktail de métaux libéré par l'anode galvanique dès une concentration d'aluminium de  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ , ce qui est une concentration totalement réaliste d'un point de vue environnemental (Abdel Ghani, 2015; Jahan and Strezov, 2017; Valdés et al., 2011). Si ce compartiment est impacté, cela pourrait potentiellement se répercuter sur un grand nombre d'organismes dépendants de cette source alimentaire en commençant par les jeunes ormeaux qui consomment principalement ce type de biofilm au début de leur cycle de vie. Une diminution de la biomasse des producteurs primaires, comme observé à une concentration d'aluminium de  $210 \mu\text{g L}^{-1}$ , peut également être néfaste pour la productivité des écosystèmes. Les huîtres adultes et les ormeaux ne semblent pas être affectés directement par des concentrations d'aluminium et de zinc réalistes d'un point de vue environnemental. Cependant, si leurs ressources alimentaires diminuent, il pourrait potentiellement y avoir un impact sur le long terme pour ces consommateurs primaires. De plus, des anomalies larvaires ont été observées chez *C. gigas* pour des concentrations qui s'approchent des maximums environnementaux rapportés dans les eaux contaminées. On peut émettre l'hypothèse que dans de tels milieux, le recrutement des huîtres serait compromis. Des tests d'embryotoxicité réalisés sur les larves de 10 espèces de bivalves avec 10 métaux, dont l'aluminium et le zinc, ont démontré que l'huître creuse était l'espèce la plus sensible (Markich, 2021). D'autres espèces de mollusques seraient donc potentiellement en mesure de supporter des concentrations plus élevées en aluminium. Notre étude confirme la sensibilité des larves d'huîtres aux métaux libérés par l'anode galvanique à base d'aluminium.

#### 4. Perspectives

Une des problématiques liées aux anodes galvaniques n'est pas seulement la hausse des concentrations en métaux dans la colonne d'eau mais également dans le sédiment. Plusieurs études ont mis en évidence une augmentation des concentrations en aluminium et en zinc dans la couche superficielle du sédiment des milieux portuaires où l'utilisation d'anodes galvaniques est courante (Caplat et al., 2020; Gabelle et al., 2012; Rousseau et al., 2009). Un tel enrichissement du sédiment en métaux pourrait potentiellement être néfaste pour la faune épigée qui vit à la surface du substrat ainsi que pour les organismes fouisseurs. En complément de ces travaux de thèse, il serait intéressant d'exposer des espèces qui vivent en abondance dans le sédiment comme c'est le cas d'annélides polychètes de la famille des Nereididae (*Hediste diversicolor*, *Alitta virens*) ou encore d'*Arenicola marina* qui ont déjà fait l'objet de nombreuses études écotoxicologiques (Berthet et al., 2003; Poirier et al., 2006). Ces annélides constituent une grande part de la biomasse benthique des sols vaseux qui sont soumis à de fortes pressions anthropiques à proximité des milieux portuaires. De plus, leur importance dans le fonctionnement des écosystèmes estuariens, leur bonne tolérance à la

contamination, et leur facilité de maintien en laboratoire, en font des espèces bioindicatrices de choix (Galloway et al., 2004; Ruus et al., 2005). Le caractère sédentaire de ces espèces permet également de s'assurer de la source de pollution pour les études *in situ* contrairement à une espèce mobile pouvant se déplacer sur d'autres sites (Edwards et al., 1996). Il serait pertinent de réaliser une contamination du sédiment avec les métaux libérés par une anode galvanique et ensuite y placer des vers provenant d'élevage afin de normaliser la taille des individus. De plus, les vers n'auraient pas été exposés à des métaux avant le début de l'exposition et ne présenteraient pas des niveaux basaux déjà élevés. Des biomarqueurs tel que les métallothionéines pourraient être étudiés car ils sont relativement spécifiques à la pollution métallique (Géret, 2002). Des mesures des concentrations en aluminium et en zinc dans les tissus ainsi que la mise en place d'une double expérimentation avec des poissons en guise de consommateur secondaire seraient également très intéressantes. L'expérimentation consisterait en l'exposition d'annélides polychètes d'un côté et de l'autre par la mise en place de quatre conditions chez une espèce de poisson marin : (i) une condition témoin, (ii) une condition avec des poissons dans de l'eau non contaminée et nourris avec des annélides exposés aux anodes, (iii) une condition avec des poissons dans de l'eau contaminée et nourris avec des annélides exposés aux anodes, (iv) et enfin une condition avec des poissons dans de l'eau contaminée et nourris avec des annélides témoin. Cette expérimentation permettrait à la fois l'étude de l'impact des anodes galvaniques sur deux groupes taxonomiques supplémentaires, mais également de continuer les recherches dans la thématique du transfert de l'aluminium et du zinc dans la chaîne trophique en milieu marin. Doubler le nombre de conditions en incluant une autre variable comme le pH serait également très intéressant dans le contexte de l'acidification des océans et de l'augmentation de la biodisponibilité des métaux avec l'abaissement du pH. À l'heure actuelle, les actinoptérygiens n'ont fait l'objet d'aucune étude concernant l'impact des anodes galvaniques. Pourtant, chez les poissons, il est prouvé que l'aluminium provoque des effets ionorégulateurs pour un pH faible, ainsi que des problèmes respiratoires à cause de l'obstruction des branchiers par le mucus pour des concentrations en aluminium suffisamment élevées ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) qui prédominent à un pH plus élevé (Gensemer and Playle, 1999; Monette et al., 2008; Poléo and Hytterød, 2003).

En ce qui concerne les expérimentations réalisées dans le cadre de cette thèse, il serait pertinent de reproduire ce que nous n'avions pas pu mettre en place au début des expositions sur les huîtres, c'est-à-dire exposer préalablement du phytoplancton avant de le donner à manger aux bivalves. Cette condition trophique avait été envisagée mais jugée trop difficile à mettre en place, là où l'expérimentation avec les ormeaux présentait une plus grande facilité de mise en œuvre avec la contamination des macroalgues. De même, réaliser un test d'embryotoxicité sur les larves d'ormeaux permettrait aussi d'affiner la comparaison de la sensibilité entre les deux modèles de mollusques. À

terme, reproduire l'expérimentation « effet intergénérationnel » sur les huîtres, et pourquoi pas sur les ormeaux, serait également très intéressant afin d'évaluer l'effet de l'anode galvanique sur la descendance des mollusques. Pour cela, nous souhaitons exposer des géniteurs aux métaux libérés par l'anode galvanique pendant toute la phase de gamétogenèse, puis réaliser des fécondations *in vitro* avec ces géniteurs. Les résultats obtenus devraient nous permettre de déterminer l'impact des métaux sur les mitoses goniales et le développement des gamètes mais également sur le développement larvaire. Enfin, les larves viables continueraient leur développement pour se transformer en juvéniles puis en adultes. Cette expérimentation permettrait ainsi d'appréhender l'impact des anodes galvaniques sur le long terme par le biais de différentes générations. De plus, le pH pourrait être inclus comme variable supplémentaire afin de visualiser les potentiels effets additifs ou synergiques de l'acidification des océans dans le cadre du changement climatique.

La baisse des niveaux des MDA observée chez l'huître, traduisant la diminution de la peroxydation lipidique, peut s'expliquer par une défense antioxydante assurée par d'autres enzymes plus sensibles comme la glutathion S-transférase (Belabed and Soltani, 2013; Valavanidis et al., 2006), les catalases (Damiens et al., 2006; Funes et al., 2006), ou encore des protéines spécifiques comme les métallothionéines et leur fonction de séquestration et de détoxification des métaux. Ces mécanismes de détoxification ont peut-être pris le relais par rapport à la peroxydation lipidique en réponse à la contamination métallique du milieu. Des études *in situ* ont notamment confirmé que les niveaux de métallothionéines de *C. gigas* étaient corrélés positivement à la contamination en zinc du milieu impliquant la mise en place d'une réponse de détoxification du bivalve (Mouneyrac et al., 1998). Par conséquent, il serait pertinent d'étudier ces biomarqueurs chez l'huître et l'ormeau pour comparer leurs réponses aux cocktails de métaux libérés par les anodes galvaniques.

Récemment, Barbarin et al. (2022) ont évalué les effets des anodes galvaniques à base d'aluminium sur le pétoncle noir, *Mimachlamys varia*. Pour ce faire, les auteurs ont utilisé un modèle statistique incluant 5 biomarqueurs afin d'avoir une réponse globale de l'impact des zones portuaires sur l'état de santé du pétoncle noir. Il serait intéressant de mettre au point un tel indice/test statistique sur nos résultats afin de pouvoir comparer l'impact des anodes galvaniques sur des modèles issus de différentes études. Enfin, les résultats préliminaires obtenus chez les producteurs primaires méritent grandement d'être approfondis. Il est prévu de compléter les expérimentations chez les microalgues en 2023 dans le cadre du projet ECOCAP (Financement France Energie Marine) afin d'approfondir les résultats obtenus mais à notre connaissance aucune expérimentation n'est pour l'instant envisagée chez les macroalgues.

## Conclusion générale

Les expérimentations réalisées lors de ce travail de thèse ont eu pour objectifs d'apporter des éléments de réponse quant à l'impact potentiel de la dissolution d'une anode galvanique sur quelques organismes marins. L'étude de facteurs de stress environnementaux, de la bioaccumulation des métaux ainsi que l'approche multi biomarqueur mise en place chez les différentes espèces étudiées nous a permis de caractériser au mieux les effets de l'exposition aux métaux afin de comparer les réponses des organismes exposés. Considérant l'ensemble des résultats obtenus à l'issue des expérimentations, il s'avère que les différents organismes testés ont présenté une grande différence de sensibilité au cocktail d'aluminium et de zinc libéré par l'anode galvanique.

Le microphytobenthos a été impacté à partir de concentrations d'aluminium qui sont régulièrement rapportées dans la littérature tandis que le développement des larves d'huîtres a été altéré pour des concentrations d'aluminium légèrement supérieures aux maximums environnementaux. En conditions dites représentatives de l'environnement, aucun effet de l'anode galvanique n'a été constaté sur l'état de santé des huîtres adultes et des ormeaux juvéniles et adultes. Seules des concentrations bien supérieures ont entraîné des altérations du système lysosomal et du métabolisme énergétique ainsi que des retards de croissance. La plupart des organismes photosynthétiques testés, macroalgues et microalgues, se sont avérés relativement résistants aux métaux avec peu, voire aucun effet mesuré lors d'expositions à des concentrations environnementales. Jusqu'ici, peu d'étude s'étaient intéressées aux effets biologiques des anodes galvaniques et ce travail de thèse tend à confirmer la nécessité de travailler avec un dispositif expérimental visant à recréer les conditions de libération des métaux à partir de l'anode. Il ne suffit pas de considérer seulement la concentration d'aluminium, il faut tenir également compte de la charge totale des métaux relargués. Ces derniers peuvent être antagonistes ou au contraire agir en synergie et augmenter leur toxicité comme nous avons pu le mettre en évidence chez les larves d'huîtres avec l'aluminium et le zinc sous leur forme chloré.

Nos résultats ont permis de répondre aux objectifs fixés en début d'étude : évaluer les effets des métaux libérés par l'anode dans la colonne d'eau et comparer les réponses des différentes espèces exposées à de l'eau contaminée, en considérant le transfert des métaux *via* l'alimentation quand cela a été possible. Cependant, quelques questions restent en suspens, notamment concernant le transfert de l'aluminium dans la chaîne trophique. Il serait également pertinent de poursuivre les travaux afin d'étudier le transfert de l'aluminium et du zinc entre des sédiments enrichis par les métaux de l'anode et des modèles biologiques fouisseurs comme des bivalves ou des annélides. Pour pouvoir estimer le risque environnemental des anodes galvaniques dans sa globalité, il convient de continuer les recherches



et de s'intéresser à d'avantage d'espèces et d'autres stades du cycle de vie des organismes. C'est notamment l'un des objectifs du programme ECOCAP (Analyse écotoxicologique des protections cathodiques pour évaluer le risque chimique des éléments libérés par les anodes galvaniques et le courant imposé sur le milieu marin et ses réseaux trophiques) piloté par France Energies Marines et co-piloté par BOREA, démarré en 2021 et qui se terminera en 2024. Le programme a également pour but d'apporter des connaissances dans la dispersion des éléments issus de la protection cathodique par anode galvanique et de la protection cathodique par courant imposé ainsi que d'étudier le transfert trophique des éléments dans les écosystèmes *via* l'application d'un logiciel de modélisation écologique/écosystémique (Ecopath with Ecosim, Ewe) incluant un module Ecotracer permettant le traçage des contaminants.

Avec le changement climatique et l'acidification des océans, il est impératif que les futures études écotoxicologiques considèrent la diminution du pH comme un facteur augmentant la biodisponibilité des métaux et intensifiant leur toxicité chez les organismes marins (Wilson and Hyne, 1997). Élargir le corpus d'espèces ainsi que la batterie de biomarqueurs étudiés (croissance, activité phagocytaire, peroxydation lipidique, glycogène), permettrait de caractériser au mieux les effets potentiels des cocktails de métaux libérés par les anodes galvaniques dans le milieu marin.

## Bibliographie

- Abdel Ghani, S.A., 2015. Trace metals in seawater, sediments and some fish species from Marsa Matrouh Beaches in north-western Mediterranean coast, Egypt. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 41, 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2015.02.006>
- Adams, W.J., Conard, B., Ethier, G., Brix, K.V., Paquin, P.R., DiToro, D.M., 2000. The challenges of hazard identification and classification of insoluble metals and metal substances for the aquatic environment. *Human and Ecological Risk Assessment* 6, 1019–1038.
- Ahsanullah, M., Arnott, G.H., 1978. Acute toxicity of copper, cadmium, and zinc to larvae of the crab *Paragrapsus quadridentatus* (H. Milne Edwards), and implications for water quality criteria. *Marine and Freshwater Research* 29, 1–8.
- Aliko, V., Hajdaraj, G., Caci, A., Faggio, C., 2015. Copper Induced Lysosomal Membrane Destabilisation in Haemolymph Cells of Mediterranean Green Crab (*Carcinus aestuarii*, Nardo, 1847) from the Narta Lagoon (Albania). *Braz. arch. biol. technol.* 58, 750–756. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132015050244>
- Amado Filho, G.M., Karez, C.S., Andrade, L.R., Yoneshigue-Valentin, Y., Pfeiffer, W.C., 1997. Effects on Growth and Accumulation of Zinc in Six Seaweed Species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 37, 223–228. <https://doi.org/10.1006/eesa.1997.1541>
- Amiard-Triquet, C., Berthet, B., Metayer, C., Amiard, J.C., 1986. Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, copper and zinc in the mussel *Mytilus edulis*: II. Experimental study. *Marine Biology* 92, 7–13. <https://doi.org/10.1007/BF00392739>
- Anderson, R.S., 1996. Enhancement of *Perkinsus marinus* Disease Progression in TBT-Exposed Oysters (*Crassostrea virginica*) 4.
- Angel, B.M., Apte, S.C., Batley, G.E., Golding, L.A., 2016. Geochemical controls on aluminium concentrations in coastal waters. *Environ. Chem.* 13, 111. <https://doi.org/10.1071/EN15029>
- Anning, T., MacIntyre, H.L., Pratt, S.M., Sammes, P.J., Gibb, S., Geider, R.J., 2000. Photoacclimation in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Limnology and Oceanography* 45, 1807–1817. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.8.1807>
- Anu, P.R., Bijoy Nandan, S., Jayachandran, P.R., Don Xavier, N.D., 2016. Toxicity effects of copper on the marine diatom, *Chaetoceros calcitrans*. *Regional Studies in Marine Science* 8, 498–504. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2016.07.001>
- Anu, P.R., Bijoy Nandan, S., Jayachandran, P.R., Don Xavier, N.D., Midhun, A.M., Mohan, D., 2018. Toxicity effects of zinc on two marine diatoms, under varying macronutrient environment. *Marine Environmental Research* 142, 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.10.013>
- Araújo, C.V.M., Blasco, J., Moreno-Garrido, I., 2010. Microphytobenthos in ecotoxicology: A review of the use of marine benthic diatoms in bioassays. *Environment International* 36, 637–646. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.04.017>
- Arnot, J., Gobas, F., 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environmental Reviews - ENVIRON REV* 14, 257–297. <https://doi.org/10.1139/A06-005>
- Arunakumara, K.K.I.U., Zhang, X., 2008. Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae. *J. Ocean Univ. China* 7, 60–64. <https://doi.org/10.1007/s11802-008-0060-y>
- Auffret, M., Oubelh, R., 1997. Hemocyte Aggregation in the Oyster *Crassostrea gigas*: In Vitro Measurement and Experimental Modulation by Xenobiotics 8.
- Austin, B., Day, J.G., 1990. Inhibition of prawn pathogenic *Vibrio* spp. by a commercial spray-dried preparation of *Tetraselmis suecica*. *Aquaculture* 90, 389–392.

- Bachère, E., Chagot, D., Grizel, H., 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Developmental & Comparative Immunology* 12, 549–559.
- Balqadi, A.A., Salama, A.J., Satheesh, S., 2018. Microfouling development on artificial substrates deployed in the central Red Sea. *Oceanologia* 60, 219–231. <https://doi.org/10.1016/j.oceano.2017.10.006>
- Barbarin, M., 2023. First quantitative biomonitoring study of two ports (marina, commerce) in French littoral area: Evaluation of metals released into the marine environment and resulting from galvanic anodes. *Science of the Total Environment* 9.
- Barbarin, M., 2022. Environnement & espaces portuaires : suivi de la qualité du milieu pour une meilleure compréhension de l'effet de variables environnementales à une échelle spatio-temporelle. Université de la Rochelle. pp 357.
- Barbucci, A., Cerisola, G., Bruzzone, G., Saccone, A., 1997. Activation of aluminium anodes by the presence of intermetallic compounds. *Electrochimica Acta* 42, 2369–2380. [https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(96\)00420-3](https://doi.org/10.1016/S0013-4686(96)00420-3)
- Barcellos, C., 1995. Geodinâmica de Cádmio e Zinco na Baía de Sepetiba 147.
- Bardal, E., 2007. Corrosion and protection. Springer Science & Business Media.
- Barillé, L., 1995. Ecophysiologie de l'alimentation de l'huître *Crassostrea gigas* soumise aux variations naturelles et contrôlées de la nourriture particulière: de l'ultrastructure à la modélisation (PhD Thesis). La Rochelle.
- Barillé, L., Prou, J., Héral, M., Bourgrier, S., 1993. No influence of food quality, but ration-dependent retention efficiencies in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 171, 91–106. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(93\)90142-B](https://doi.org/10.1016/0022-0981(93)90142-B)
- Basuyaux, O., 1997. Etude et modélisation des paramètres physico-chimiques sur la croissance de l'ormeau (*Haliotis tuberculata*) en élevage en circuit semi-fermé (PhD Thesis). Caen.
- Basuyaux, O., Blin, J.-L., Costil, K., Richard, O., Lebel, J.-M., Serpentin, A., 2018. Assessing the impacts of several algae-based diets on cultured European abalone ( *Haliotis tuberculata* ). *Aquat. Living Resour.* 31, 28. <https://doi.org/10.1051/alr/2018018>
- Bates, S.S., Tessier, A., Campbell, P.G., Létourneau, M., 1985. Zinc–phosphorus interactions and variation in zinc accumulation during growth of *Chlamydomonas variabilis* (Chlorophyceae) in batch culture. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 42, 86–94.
- Belabed, S., Soltani, N., 2013. Acute Toxicity of Cadmium on *Donax trunculus*: Acetylcholinesterase, Glutathione S-Transferase Activities and Pattern of Recovery. *European Journal of Experimental Biology* 3, 54–61.
- Belando, M.D., Marín, A., Aboal, M., García-Fernández, A.J., Marín-Guirao, L., 2017. Combined in situ effects of metals and nutrients on marine biofilms: Shifts in the diatom assemblage structure and biological traits. *Science of The Total Environment* 574, 381–389. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.197>
- Bell, A.M., von der Au, M., Regnery, J., Schmid, M., Meermann, B., Reifferscheid, G., Ternes, T., Buchinger, S., 2020. Does galvanic cathodic protection by aluminum anodes impact marine organisms? *Environmental Sciences Europe* 32, 157. <https://doi.org/10.1186/s12302-020-00441-3>
- Bendjoudi, D., Zouaou, F., Errahmani, M.B., Bendjeddou, K., Chekir, N., 2013. Mesure de deux biomarqueurs catalase et malondialdéhyde chez *Perna perna* et *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca, Bivalvia) suite à une contamination aigüe par *Staphylococcus aureus*. *Travaux de l'Institut Scientifique, Rabat, Série Zoologie* 49, 19–27.
- Bengtsson, B.-E., 1978. Use of a harpacticoid copepod in toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin* 9, 238–241. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(78\)90378-8](https://doi.org/10.1016/0025-326X(78)90378-8)
- Benijts-Claus, C., Benijts, F., 1975. The effect of low lead and zinc concentrations on the larval development of the mud-crab *Rhithropanopeus harrisii* Gould. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, Netherlands. 6, 1975.

- Berry, S.E., Simon, C.J., Foote, A.R., Jerry, D.R., Wade, N.M., 2019. Evaluation of baseline haemolymph biochemistry, volume and total body energetics to determine an accurate condition index in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 228, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2018.10.003>
- Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M., 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 125, 359–369. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(99\)00187-X](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(99)00187-X)
- Berthet, B., Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Berthelot, Y., Le Hen, A., Mastain, O., Rainbow, P.S., Smith, B.D., 2003. Accumulation and Soluble Binding of Cadmium, Copper, and Zinc in the Polychaete *Hediste diversicolor* from Coastal Sites with Different Trace Metal Bioavailabilities. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45, 468–478. <https://doi.org/10.1007/s00244-003-0135-0>
- Bevelander, G., 1988. Abalone: gross and fine structure. Boxwood Press.
- Bharti, A., Velmourougane, K., Prasanna, R., 2017. Phototrophic biofilms: diversity, ecology and applications. *J Appl Phycol* 29, 2729–2744. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1172-9>
- Bhattacharya, D., Yoon, H.S., Hackett, J.D., 2004. Photosynthetic eukaryotes unite: endosymbiosis connects the dots. *Bioessays* 26, 50–60. <https://doi.org/10.1002/bies.10376>
- Bilbao, A., Tuset, V., Viera, M., Vico, G.C.D., Fernández-Palacios, H., Haroun, R., Izquierdo, M., 2010. Reproduction, Fecundity, and Growth of Abalone (*Haliotis Tuberculata Coccinea*, Reeve 1846) in the Canary Islands. *Journal of Shellfish Research* 29, 959–967. <https://doi.org/10.2983/035.029.0430>
- Bird, P., Comber, S.D.W., Gardner, M.J., Ravenscroft, J.E., 1996. Zinc inputs to coastal waters from sacrificial anodes. *Science of The Total Environment* 181, 257–264. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)05025-6](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)05025-6)
- Bissett, A., Reimer, A., Beer, D. de, Shiraishi, F., Arp, G., 2008. Metabolic Microenvironmental Control by Photosynthetic Biofilms under Changing Macroenvironmental Temperature and pH Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6306–6312. <https://doi.org/10.1128/AEM.00877-08>
- Blaber, S.J., 1970. The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus* (L.). *Journal of Molluscan Studies* 39, 231–233.
- Bloom, H., Ayling, G.M., 1977. Heavy metals in the Derwent Estuary. *Environmental Geology* 2, 3–22.
- Boatman, T.G., Geider, R.J., Oxborough, K., 2019. Improving the Accuracy of Single Turnover Active Fluorometry (STAF) for the Estimation of Phytoplankton Primary Productivity (PhytoPP). *Front. Mar. Sci.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00319>
- Boyden, C.R., Watling, H., Thornton, I., 1975. Effect of zinc on the settlement of the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 31, 227–234. <https://doi.org/10.1007/BF00387151>
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding 7.
- Breitwieser, M., Viricel, A., Churlaud, C., Guillot, B., Martin, E., Stenger, P.-L., Huet, V., Fontanaud, A., Thomas-Guyon, H., 2017. First data on three bivalve species exposed to an intra-harbour polymetallic contamination (La Rochelle, France). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 199, 28–37.
- Brereton, A., Lord, H., Thornton, I., Webb, J.S., 1973. Effect of zinc on growth and development of larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology* 19, 96–101. <https://doi.org/10.1007/BF00353580>
- Bresler, V., Bissinger, V., Abelson, A., Dizer, H., Sturm, A., Kratke, R., Fishelson, L., Hansen, P.-D., 1999. Marine molluscs and fish as biomarkers of pollution stress in littoral regions of the Red Sea, Mediterranean Sea and North Sea 25.
- Broecker, W., Clark, E., 2009. Ratio of coccolith  $\text{CaCO}_3$  to foraminifera  $\text{CaCO}_3$  in late Holocene deep sea sediments. *Paleoceanography* 24. <https://doi.org/10.1029/2009PA001731>
- Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., Fournier, M., 1999. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria*

- hemocytes following in vitro exposure to heavy metals. *Toxicology* 142, 145–156. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(99\)00165-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(99)00165-1)
- Brown, C.W., Yoder, J.A., 1994. Coccolithophorid blooms in the global ocean. *J. Geophys. Res.* 99, 7467. <https://doi.org/10.1029/93JC02156>
- Bruland, K.W., Oriens, K.J., Cowen, J.P., 1994. Reactive trace metals in the stratified central North Pacific. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58, 3171–3182. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(94\)90044-2](https://doi.org/10.1016/0016-7037(94)90044-2)
- Bryan, G.W., Potts, G.W., Forster, G.R., 1977. Heavy metals in the gastropod mollusc *Haliotis tuberculata* (L.). *J. Mar. Biol. Ass.* 57, 379–390. <https://doi.org/10.1017/S0025315400021822>
- Buisson, S., Bouchart, V., Guerlet, E., Malas, J.P., Costil, K., 2008. Level of contamination and impact of pesticides in cupped oyster, *Crassostrea gigas*, reared in a shellfish production area in Normandy (France). *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 43, 655–664.
- Bustamante, P., Teyssié, J., Fowler, S., Cotret, O., Danis, B., Miramand, P., Warnau, M., 2002. Biokinetics of zinc and cadmium accumulation and depuration at different stages in the life cycle of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 231, 167–177. <https://doi.org/10.3354/meps231167>
- Calabrese, A., Collier, R.S., Nelson, D.A., MacInnes, J.R., 1973. The toxicity of heavy metals to embryos of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biology* 18, 162–166. <https://doi.org/10.1007/BF00367984>
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 2003. Inorganics and hormesis. *Critical reviews in toxicology* 33, 215–304.
- Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 2001. Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology. *Trends in pharmacological sciences* 22, 285–291.
- Cao, R., Liu, Y., Wang, Q., Dong, Z., Yang, D., Liu, H., Ran, W., Qu, Y., Zhao, J., 2018. Seawater acidification aggravated cadmium toxicity in the oyster *Crassostrea gigas*: metal bioaccumulation, subcellular distribution and multiple physiological responses. *Science of the total environment* 642, 809–823.
- Capinpin, E.C., Encena, V.C., Bayona, N.C., 1998. Studies on the reproductive biology of the Donkey's ear abalone, *Haliotis asinina* Linné. *Aquaculture* 166, 141–150. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00275-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00275-0)
- Caplat, C., Basuyaux, O., Pineau, S., Deborde, J., Grolleau, A.M., Leglatin, S., Mahaut, M.L., 2020. Transfer of elements released by aluminum galvanic anodes in a marine sedimentary compartment after long-term monitoring in harbor and laboratory environments. *Chemosphere* 239, 124720. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124720>
- Caplat, C., Mottin, E., Jean-Marc, L., Serpentin, A., Barillier, D., Mahaut, M.-L., 2012. Impact of a Sacrificial Anode as Assessed by Zinc Accumulation in Different Organs of the Oyster *Crassostrea gigas*: Results from Long- and Short-Term Laboratory Tests. *Archives of environmental contamination and toxicology* 62, 638–49. <https://doi.org/10.1007/s00244-011-9737-0>
- Caplat, C., Oral, R., Mahaut, M.-L., Mao, A., Barillier, D., Guida, M., Della Rocca, C., Pagano, G., 2010. Comparative toxicities of aluminum and zinc from sacrificial anodes or from sulfate salt in sea urchin embryos and sperm. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1138–1143. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.06.024>
- Carre, C., 2017. Utilisation du dépôt calcomagnésien comme outil de décontamination de l'eau de mer (PhD Thesis). Université de la Nouvelle-Calédonie.
- Castagna, A., Sinatra, F., Scalia, M., Capodicasa, V., 1981. Observations of the effect of zinc on the gametes and various development phases of *Arbacia lixula*. *Marine Biology* 64, 285–289.
- Celik, U., Oehlenschläger, J., 2005. Zinc and copper content in marine fish samples collected from the eastern Mediterranean Sea. *Eur Food Res Technol* 220, 37–41. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1104-1>
- Chan, H., 1988. Accumulation and tolerance to cadmium, copper, lead and zinc by the green mussel *Perna viridis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 48, 295–303. <https://doi.org/10.3354/meps048295>

- Chang, H.-F., Wang, S.-L., Lee, D.-C., Hsiao, S.S.-Y., Hashimoto, Y., Yeh, K.-C., 2020. Assessment of indium toxicity to the model plant *Arabidopsis*. *Journal of Hazardous Materials* 387, 121983. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121983>
- Chassot, E., Bonhommeau, S., Dulvy, N.K., Mélin, F., Watson, R., Gascuel, D., Le Pape, O., 2010. Global marine primary production constrains fisheries catches. *Ecology Letters* 13, 495–505. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01443.x>
- Cheng, T.C., 2013. *Invertebrate blood: cells and serum factors*. Springer Science & Business Media.
- Cheng, T.C., 2000. Cellular defense mechanisms in oysters. *Immunology and Pathology*.
- Cheng, T.C., Sullivan, J.T., 1984. Effects of heavy metals on phagocytosis by Molluscan hemocytes. *Marine Environmental Research* 14, 305–315. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(84\)90084-9](https://doi.org/10.1016/0141-1136(84)90084-9)
- Chochois, L., Migné-Fouillen, V., 2011. *Méthodologie utilisée pour la détermination de normes de qualité environnementale (NQE)*. INERIS, Paris.
- Claquin, P., Probert, I., Lefebvre, S., Veron, B., 2008. Effects of temperature on photosynthetic parameters and TEP production in eight species of marine microalgae. *Aquat. Microb. Ecol.* 51, 1–11. <https://doi.org/10.3354/ame01187>
- Clavier, J., Chardy, P., 1989. Investigation into the ecology of the ormer (*Haliotis tuberculata* L.), factors influencing spatial distribution. *Aquatic Living Resources* 2, 191–197.
- Clijsters, H., Van Assche, F., 1985. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynth Res* 7, 31–40. <https://doi.org/10.1007/BF00032920>
- Cullen, J.J., Yang, X., MacIntyre, H.L., 1992. Nutrient Limitation of Marine Photosynthesis, in: Falkowski, P.G., Woodhead, A.D., Vivirito, K. (Eds.), *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea*. Springer US, Boston, MA, pp. 69–88. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0762-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0762-2_5)
- Dallinger, R., Wieser, W., 1984. Molecular fractionation of Zn, Cu, Cd and Pb in the midgut gland of *Helix pomatia* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 79, 125–129.
- Damiens, G., Mouneyrac, C., Quiniou, F., His, E., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., 2006. Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of *Crassostrea gigas*. *Environmental Pollution* 140, 492–499. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.08.006>
- Danilov, R.A., Ekelund, N.G.A., 2002. Effects of Short-term and Long-term Aluminium Stress on Photosynthesis, Respiration, and Reproductive Capacity in a Unicellular Green Flagellate (*Euglena gracilis*). *Acta hydrochim. hydrobiol.* 30, 190–196. <https://doi.org/10.1002/aheh.200390002>
- Davies, A.G., 1973. The kinetics of and a preliminary model for the uptake of radio-zinc by *Phaeodactylum tricornutum* in culture, in: *Radioactive Contamination of the Marine Environment*.
- De la Ballina, N.R., Maresca, F., Cao, A., Villalba, A., 2022. Bivalve Haemocyte Subpopulations: A Review. *Frontiers in Immunology* 13, 826255. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.826255>
- Deborde, J., Refait, P., Bustamante, P., Caplat, C., Basuyaux, O., Grolleau, A.-M., Mahaut, M.-L., Brach-Papa, C., Gonzalez, J.-L., Pineau, S., 2015. Impact of galvanic anode dissolution on metal trace element concentrations in marine waters. *Water, Air, & Soil Pollution* 226, 1–14.
- Decho, A.W., 2000. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* 20, 1257–1273. [https://doi.org/10.1016/S0278-4343\(00\)00022-4](https://doi.org/10.1016/S0278-4343(00)00022-4)
- Delaporte, M., 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species - *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Journal of Experimental Biology* 206, 3053–3064. <https://doi.org/10.1242/jeb.00518>
- Depledge, M.H., Fossi, M.C., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebrates. Ecotoxicology* 3, 161–172. <https://doi.org/10.1007/BF00117081>
- Depledge, M.H., Rainbow, P.S., 1990. Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 97, 1–7.

- Deruytter, D., Baert, J.M., Nevejan, N., De Schamphelaere, K.A., Janssen, C.R., 2017. Mixture toxicity in the marine environment: model development and evidence for synergism at environmental concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36, 3471–3479.
- Devos, A., Voiseux, C., Caplat, C., Fievet, B., 2012. Effect of chronic exposure to zinc in young spats of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 2841–2847. <https://doi.org/10.1002/etc.2012>
- Di Poi, C., Costil, K., Bouchart, V., Halm-Lemeille, M.-P., 2018. Toxicity assessment of five emerging pollutants, alone and in binary or ternary mixtures, towards three aquatic organisms. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 6122–6134. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9306-9>
- Di Poi, C., Evariste, L., Séguin, A., Mottier, A., Pedelucq, J., Lebel, J.-M., Serpentine, A., Budzinski, H., Costil, K., 2016. Sub-chronic exposure to fluoxetine in juvenile oysters (*Crassostrea gigas*): uptake and biological effects. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 5002–5018.
- Dinesh, K.S., Santhanam, P., Ananth, S., Shenbaga Devi, A., Nandakumar, B.P., Balaji Prasath, B., Jeyanthi, S., Jayakshmi, T., Ananthi, P., 2014. Effect of different dosages of zinc on the growth and biomass in five marine microalgae. *Int. J. Fish. Aquac.* 6, 1–8. <https://doi.org/10.5897/IJFA2013.0393>
- Dixit, S., Van Cappellen, P., van Bennekom, A.J., 2001. Processes controlling solubility of biogenic silica and pore water build-up of silicic acid in marine sediments. *Marine Chemistry* 73, 333–352. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(00\)00118-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(00)00118-3)
- Driscoll, C.T., Schecher, W.D., 1990. The chemistry of aluminum in the environment. *Environ Geochem Health* 12, 28–49. <https://doi.org/10.1007/BF01734046>
- Dubief, B., Nunes, F.L.D., Basuyaux, O., Paillard, C., 2017. Immune priming and portal of entry effectors improve response to vibrio infection in a resistant population of the European abalone. *Fish & Shellfish Immunology* 60, 255–264. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.017>
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Phenol sulphuric acid method for total carbohydrate. *Anal. chem* 26, 350.
- Edwards, C.A., Subler, S., Chen, S.K., 1996. Essential criteria for selecting bioindicator species, processes or systems to assess the environmental impact of chemical on soil ecosystems. *Bioindicator systems for soil pollution* 16, 67.
- Eklund, B., 2005. Development of a growth inhibition test with the marine and brackish water red alga *Ceramium tenuicorne*. *Marine pollution bulletin* 50, 921–930.
- Elangovan, R., McCrohan, C.R., Ballance, S., Powell, J.J., White, K.N., 2000. Localization and fate of aluminium in the digestive gland of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Tissue and Cell* 32, 79–87. <https://doi.org/10.1054/tice.1999.0089>
- Ellwood, M.J., Hunter, K.A., 2000. The incorporation of zinc and iron into the frustule of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Limnology and Oceanography* 45, 1517–1524. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.7.1517>
- Ellwood, M.J., Hunter, K.A., 1999. Determination of the Zn/Si ratio in diatom opal: a method for the separation, cleaning and dissolution of diatoms. *Marine Chemistry* 66, 149–160.
- Elston, R., 1983. Histopathology of oxygen intoxication in the juvenile red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. *Journal of Fish Diseases* 6, 101–110.
- Exley, C., 2016. The toxicity of aluminium in humans. *Morphologie* 100, 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2015.12.003>
- Exley, C., House, E.R., 2011. Aluminium in the human brain. *Monatsh Chem* 142, 357–363. <https://doi.org/10.1007/s00706-010-0417-y>
- Exley, C., Mold, M.J., 2015. The binding, transport and fate of aluminium in biological cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 30, 90–95.
- Falkowski, P., Scholes, R.J., Boyle, E.E.A., Canadell, J., Canfield, D., Elser, J., Gruber, N., Hibbard, K., Höglberg, P., Linder, S., 2000. The global carbon cycle: a test of our knowledge of earth as a system. *science* 290, 291–296.

- Field, C.B., 1998. Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* 281, 237–240. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.237>
- Fleeger, J.W., Carman, K.R., Nisbet, R.M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of The Total Environment* 317, 207–233. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00141-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00141-4)
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Fong, P., Biel, N., 2008. Norfluoxetine Induces Spawning and Parturition in Estuarine and Freshwater Bivalves. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 81, 535–8. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9558-7>
- Forster, G.R., 1967. The growth of *Haliotis tuberculata* : results of tagging experiments in Guernsey 1963–65. *J. Mar. Biol. Ass.* 47, 287–300. <https://doi.org/10.1017/S002531540005640X>
- Forster, G.R., Potts, G.W., Swinfen, R., 1982. Changes in the Ormer Populations of Guernsey and Jersey. *J. Mar. Biol. Ass.* 62, 717–727. <https://doi.org/10.1017/S0025315400019871>
- Franco, A., Heude Berthelin, C., Goux, D., Sourdaire, P., Mathieu, M., 2008. Fine structure of the early stages of spermatogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Tissue and Cell* 40, 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2007.12.006>
- Franco, J.L., Trivella, D.B.B., Trevisan, R., Dinslaken, D.F., Marques, M.R.F., Bairy, A.C.D., Dafre, A.L., 2006. Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. *Chemico-Biological Interactions* 160, 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.02.002>
- Franklin, N.M., Stauber, J.L., Apte, S.C., Lim, R.P., 2002. Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. *Environ Toxicol Chem* 21, 742–751. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210409>
- Friedman, C., Biggs, W., Shields, J.D., Hedrick, R., 1997. Transmission Of Withering Syndrome In Black Abalone, *Haliotis Cracherodii* Leach 9.
- Funes, V., Alhama, J., Navas, J.I., López-Barea, J., Peinado, J., 2006. Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral. *Environmental Pollution* 139, 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.05.016>
- Gabe, M., 1968. Techniques histologiques.
- Gabelle, C., Baraud, F., Biree, L., Gouali, S., Hamdoun, H., Rousseau, C., van Veen, E., Leleyter, L., 2012. The impact of aluminium sacrificial anodes on the marine environment: A case study. *Applied Geochemistry* 27, 2088–2095. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2012.07.001>
- Gagnaire, B., Frouin, H., Moreau, K., Thomas-Guyon, H., Renault, T., 2006. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish & Shellfish Immunology* 20, 536–547. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.07.003>
- Gagnon, C., Turcotte, P., 2007. Role of colloids in the physical speciation of metals in the dispersion plume of a major municipal effluent. *Journal of Water Science* 20, 275–285.
- Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2004. Ecosystem management bioindicators: the ECOMAN project – a multi-biomarker approach to ecosystem management. *Marine Environmental Research* 58, 233–237. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.064>
- Galloway, T.S., Depledge, M.H., 2001. Immunotoxicity in Invertebrates: Measurement and Ecotoxicological Relevance 19.
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Clérandeau, C., Mazzella, N., Gourves, P.Y., Morin, B., 2017. Combined effects of temperature and copper and S-metolachlor on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Pollution Bulletin* 115, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.018>
- Gaume, B., Fouchereau-Peron, M., Badou, A., Helléouet, M.-N., Huchette, S., Auzoux-Bordenave, S., 2011. Biomineralization markers during early shell formation in the European abalone *Haliotis tuberculata*, Linnaeus. *Marine biology* 158, 341–353.



- Geffard, A., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C., 2001. Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters (*Crassostrea gigas*) from a clean and a metal-rich site. *Biomarkers* 6, 91–107. <https://doi.org/10.1080/13547500010000860>
- Gehlen, M., Beck, L., Calas, G., Flank, A.-M., Van Bennekom, A.J., Van Beusekom, J.E.E., 2002. Unraveling the atomic structure of biogenic silica: evidence of the structural association of Al and Si in diatom frustules. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66, 1601–1609. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(01\)00877-8](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(01)00877-8)
- Geider, R.J., Delucia, E.H., Falkowski, P.G., Finzi, A.C., Grime, J.P., Grace, J., Kana, T.M., Roche, J.L., Long, S.P., Osborne, B.A., Platt, T., Prentice, I.C., Raven, J.A., Schlesinger, W.H., Smetacek, V., Stuart, V., Sathyendranath, S., Thomas, R.B., Vogelmann, T.C., Williams, P., Woodward, F.I., 2001. Primary productivity of planet earth: biological determinants and physical constraints in terrestrial and aquatic habitats. *Global Change Biology* 7, 849–882. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2486.2001.00448.x>
- Geiger, D.L., 1999. Description of *Haliotis fatui* new species (Gastropoda: Vetigastropoda) from the tropical western Pacific. *NAUTILUS-GREENVILLE* 113, 73–77.
- Gensemer, R.W., 1991. The effects of pH and aluminum on the growth of the acidophilic diatom *Asterionella ralfsii* var. *americana*. *Limnology and Oceanography* 36, 123–131. <https://doi.org/10.4319/lo.1991.36.1.0123>
- Gensemer, R.W., Playle, R.C., 1999. The Bioavailability and Toxicity of Aluminum in Aquatic Environments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 29, 315–450. <https://doi.org/10.1080/10643389991259245>
- Genty, B., Briantais, J.-M., Baker, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 990, 87–92. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9)
- George, J.W., 2001. The Usefulness and Limitations of Hand-held Refractometers in Veterinary Laboratory Medicine: An Historical and Technical Review. *Veterinary Clinical Pathology* 30, 201–210. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2001.tb00432.x>
- Gerbersdorf, S., Westrich, B., Paterson, D., 2009. Microbial Extracellular Polymeric Substances (EPS) in Fresh Water Sediments. *Microbial Ecology* 58, 334–349. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9498-8>
- Géret, F., 2002. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquatic Living Resources* 15, 61–66. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(01\)01147-0](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(01)01147-0)
- Gilbert, R., Duret, J., 2014. Recensement de la conchyliculture 2012. La Charente-Maritime est le premier département producteur de coquillages.
- Gillan, F.T., Fisher, N.S., Johns, R.B., 1983. The effects of copper and zinc on the fatty acids and carotenoids in the marine diatom *Asterionella japonica*.
- Gillmore, M.L., Golding, L.A., Angel, B.M., Adams, M.S., Jolley, D.F., 2016. Toxicity of dissolved and precipitated aluminium to marine diatoms. *Aquatic Toxicology* 174, 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.004>
- Girard, A., 1972. La reproduction de l'Ormeau *Haliotis tuberculata* L. 22.
- Golding, L.A., Angel, B.M., Batley, G.E., Apte, S.C., Krassoi, R., Doyle, C.J., 2015. Derivation of a water quality guideline for aluminium in marine waters: Derivation of a marine water quality guideline for aluminium. *Environ Toxicol Chem* 34, 141–151. <https://doi.org/10.1002/etc.2771>
- Gopalakrishnan, S., Thilagam, H., Huang, W.-B., Wang, K.-J., 2009. Immunomodulation in the marine gastropod *Haliotis diversicolor* exposed to benzo(a)pyrene. *Chemosphere* 75, 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.12.027>
- Gosling, E., 2015. *Marine bivalve molluscs*. John Wiley & Sons.
- Gosling, E., 2003. *Bivalve Molluscs: Biology. Ecology and Culture*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Gouali, S., 2013. Impact environnemental des anodes sacrificielles en aluminium (PhD Thesis). Caen.

- Gourlay-Francé, C., Delmas, F., Mazzella, N., Tusseau-Vuillemin, M.-H., 2010. Que sait-on de la biodisponibilité des contaminants dissous dans le milieu aquatique ? Sciences Eaux & Territoires Numéro 1, 6. <https://doi.org/10.3917/set.001.0006>
- Gray, J.S., 2002. Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. Marine Pollution Bulletin 45, 46–52. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00323-X](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00323-X)
- Grundy, M.M., Moore, M.N., Howell, S.M., Ratcliffe, N.A., 1996. Phagocytic reduction and effects on lysosomal membranes by polycyclic aromatic hydrocarbons, in haemocytes of *Mytilus edulis*. Aquatic Toxicology 34, 273–290. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(95\)00044-5](https://doi.org/10.1016/0166-445X(95)00044-5)
- Grzegorzczak, M., Pogorzelski, S.J., Pospiech, A., Boniewicz-Szmyt, K., 2018. Monitoring of marine biofilm formation dynamics at submerged solid surfaces with multitechnique sensors. Frontiers in Marine Science 5, 363.
- Guibert, A., 2009. Diagnostic de corrosion et prédiction de signature électromagnétique de structures sous-marines sous protection cathodique 219.
- Guida, L., Saidi, Z., Hughes, M.N., Poole, R.K., 1991. Aluminium toxicity and binding to *Escherichia coli*. Arch. Microbiol. 156, 507–512. <https://doi.org/10.1007/BF00245400>
- Guo, F., Tu, R., Wang, W.-X., 2013. Different responses of abalone *Haliotis discus hannai* to waterborne and dietary-borne copper and zinc exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety 91, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.002>
- Guo, X., Hedgecock, D., Hershberger, W.K., Cooper, K., Jr., S.K.A., 1998. Genetic Determinants of Protandric Sex in the Pacific Oyster, *Crassostrea Gigas* Thunberg. Evolution 52, 394–402. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1998.tb01640.x>
- Gupta, S.K., Singh, J., 2011. Evaluation of mollusc as sensitive indicator of heavy metal pollution in aquatic system: a review. IIOAB J 2, 49–57.
- Hameed, M., Khurshid, Z., Bhat, R., Qayoom, I., 2020. Concerns and Threats of Heavy Metals' Contamination on Aquatic Ecosystem. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-48690-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-48690-7_1)
- Handeland, S.O., Wilkinson, E., Sveinsbø, B., McCormick, S.D., Stefansson, S.O., 2004. Temperature influence on the development and loss of seawater tolerance in two fast-growing strains of Atlantic salmon. Aquaculture 233, 513–529. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.08.028>
- Hannam, M.L., Bamber, S.D., Sundt, R.C., Galloway, T.S., 2009. Immune modulation in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to North Sea produced water. Environmental Pollution 157, 1939–1944.
- Harford, A.J., Hogan, A.C., Tsang, J.J., Parry, D.L., Negri, A.P., Adams, M.S., Stauber, J.L., van Dam, R.A., 2011. Effects of alumina refinery wastewater and signature metal constituents at the upper thermal tolerance of: 1. The tropical diatom *Nitzschia closterium*. Marine Pollution Bulletin 62, 466–473. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.01.013>
- Hayashi, I., 1980. The Reproductive Biology of the Ormer, *Haliotis Tuberculata*. J. Mar. Biol. Ass. 60, 415–430. <https://doi.org/10.1017/S0025315400028435>
- Helm, M.M., Millican, P.F., 1977. Experiments in the hatchery rearing of Pacific oyster larvae (*Crassostrea gigas* Thunberg). Aquaculture 11, 1–12. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(77\)90149-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(77)90149-1)
- Herrmann, J., Frick, K., 1995. Do stream invertebrates accumulate aluminium at low pH conditions? Water Air Soil Pollut 85, 407–412. <https://doi.org/10.1007/BF00476863>
- Heude-Berthelin, C., 2000. Etude du métabolisme du glycogène chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Impact sur la reproduction et les mortalités estivales (PhD Thesis). Caen.
- Hillebrand, H., Worm, B., Lotze, H.K., 2000. Marine microbenthic community structure regulated by nitrogen loading and grazing pressure. Marine Ecology Progress Series 204, 27–38. <https://doi.org/10.3354/meps204027>
- Hine, P.M., 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. Fish & Shellfish Immunology 9, 367–385. <https://doi.org/10.1006/fsim.1998.0205>
- His, E., Seaman, M.N.L., Beiras, R., 1997. A simplification the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. Water Research 31, 351–355.

- Hladyz, S., Cook, R.A., Petrie, R., Nielsen, D.L., 2011. Influence of substratum on the variability of benthic biofilm stable isotope signatures: implications for energy flow to a primary consumer. *Hydrobiologia* 664, 135–146. <https://doi.org/10.1007/s10750-010-0593-0>
- Hogstrand, C., Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J., 2012. Homeostasis and toxicology of essential metals. *Fish physiology-zinc* 136–201.
- Hong, H.-K., Donaghy, L., Choi, K.-S., 2019. Flow cytometric characterization of hemocytes of the abalone *Haliotis diversicolor* (Reeve, 1846) and effects of air exposure stresses on hemocyte parameters. *Aquaculture* 506, 401–409. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.001>
- Horvatic, J., Persic, V., 2007. The Effect of Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup> on the Growth Rate of Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin: Microplate Growth Inhibition Test. *Bull Environ Contam Toxicol* 6.
- Huang, R., Boney, A.D., 1984. Growth interactions between littoral diatoms and juvenile marine algae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 81, 21–45. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(84\)90222-3](https://doi.org/10.1016/0022-0981(84)90222-3)
- Huang, X., Guo, F., Ke, C., Wang, W.-X., 2010. Responses of abalone *Haliotis diversicolor* to sublethal exposure of waterborne and dietary silver and cadmium. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1130–1137. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.05.018>
- Huang, X., Ke, C., Wang, W.-X., 2008. Bioaccumulation of silver, cadmium and mercury in the abalone *Haliotis diversicolor* from water and food sources. *Aquaculture* 283, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.004>
- Hung, O.S., Thiyagarajan, V., Zhang, R., Wu, R.S.S., Qian, P.Y., 2007. Attachment of *Balanus amphitrite* larvae to biofilms originating from contrasting environments. *Marine Ecology Progress Series* 333, 229–242.
- Hunt, J.W., Anderson, B.S., 1989. Sublethal effects of zinc and municipal effluents on larvae of the red abalone *Haliotis rufescens*. *Mar. Biol.* 101, 545–552. <https://doi.org/10.1007/BF00541657>
- Hunter, B.L., Laws, E.A., 1981. ATP and chlorophyll a as estimators of phytoplankton carbon biomass 1. *Limnology and Oceanography* 26, 944–956.
- Hydes, D.J., 1983. Distribution of aluminium in waters of the North East Atlantic 25° N to 35° N. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 47, 967–973.
- Hydes, D.J., de Lange, G.J., de Baar, H.J.W., 1988. Dissolved aluminium in the Mediterranean. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 52, 2107–2114. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(88\)90190-1](https://doi.org/10.1016/0016-7037(88)90190-1)
- Iglesias-Rodríguez, M.D., Brown, C.W., Doney, S.C., Kleypas, J., Kolber, D., Kolber, Z., Hayes, P.K., Falkowski, P.G., 2002. Representing key phytoplankton functional groups in ocean carbon cycle models: Coccolithophorids. *Global Biogeochemical Cycles* 16, 47–1–47–20. <https://doi.org/10.1029/2001GB001454>
- Irianto, A., Austin, B., 2002. Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*.
- Jaccard, T., Ariztegui, D., Wilkinson, K.J., 2009. Incorporation of zinc into the frustule of the freshwater diatom *Stephanodiscus hantzschii*. *Chemical Geology* 265, 381–386.
- Jahan, S., Strezov, V., 2017. Water quality assessment of Australian ports using water quality evaluation indices. *PloS one* 12, e0189284.
- Janik, E., Grudziński, W., Gruszecki, W.I., Krupa, Z., 2008. The xanthophyll cycle pigments in *Secale cereale* leaves under combined Cd and high light stress conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 90, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2007.10.006>
- Jelmert, A., Van Leeuwen, H., 2000. Harming local species or preventing the transfer of exotics? Possible negative and positive effects of using zinc anodes for corrosion protection of ballast water tanks. *Water Research* 34, 1937–1940. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00416-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00416-9)
- Jenkins, S.R., Arenas, F., Arrontes, J., Bussell, J., Castro, J., Coleman, R.A., Hawkins, S.J., Kay, S., Martínez, B., Oliveros, J., F.Roberts, M., Sousa, S., Thompson, R.C., Hartnoll, R.G., 2001. European-scale analysis of seasonal variability in limpet grazing activity and microalgal

- abundance. *Marine Ecology Progress Series* 211, 193–203. <https://doi.org/10.3354/meps211193>
- Jeong, C.-B., Kang, H.-M., Lee, M.-C., Byeon, E., Park, H.G., Lee, J.-S., 2019. Effects of polluted seawater on oxidative stress, mortality, and reproductive parameters in the marine rotifer *Brachionus koreanus* and the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Aquatic Toxicology* 208, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.12.019>
- Jickells, T., 1995. Atmospheric inputs of metals and nutrients to the oceans: their magnitude and effects. *Marine Chemistry* 48, 199–214. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(95\)92784-P](https://doi.org/10.1016/0304-4203(95)92784-P)
- Juneau, P., Harrison, P.J., 2005. Comparison by PAM Fluorometry of Photosynthetic Activity of Nine Marine Phytoplankton Grown Under Identical Conditions¶. *Photochemistry and Photobiology* 81, 649–653. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2005.tb00239.x>
- Jupp, B.P., Fowler, S.W., Dobretsov, S., van der Wiele, H., Al-Ghafri, A., 2017. Assessment of heavy metal and petroleum hydrocarbon contamination in the Sultanate of Oman with emphasis on harbours, marinas, terminals and ports. *Marine Pollution Bulletin* 121, 260–273. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.05.015>
- Kang, C.-K., Park, M.S., Lee, P.-Y., Choi, W.-J., Lee, W.-C., 2000. Seasonal variations in condition, reproductive activity, and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in suspended culture in two coastal bays of Korea. *Journal of Shellfish Research* 19, 771–778.
- Karl, D.M., 2002. Hidden in a sea of microbes. *Nature* 415, 590–591. <https://doi.org/10.1038/415590b>
- Khebbab, M.E., Nadji, S., Amrani, A., 2010. The effect of cadmium exposure on malonaldehyde and reduced glutathione concentrations in several tissues of a bivalve mollusc (*Ruditapes decussatus*) fished from Mellah lagoon (North East of Algeria). *Annals of Biological Research* 1, 166–173.
- King, S.O., Mach, C.E., Brezonik, P.L., 1992. Changes in trace metal concentrations in lake water and biota during experimental acidification of Little Rock Lake, Wisconsin, USA. *Environmental Pollution* 78, 9–18. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(92\)90004-T](https://doi.org/10.1016/0269-7491(92)90004-T)
- Kinross, J.H., Read, P.A., Christofi, N., 2000. The influence of pH and aluminium on the growth of filamentous algae in artificial streams. *Archiv für Hydrobiologie* 67–86.
- Kirchgeorg, T., Weinberg, I., Hörnig, M., Baier, R., Schmid, M.J., Brockmeyer, B., 2018. Emissions from corrosion protection systems of offshore wind farms: Evaluation of the potential impact on the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* 136, 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.08.058>
- Kluytmans, J.H., Brands, F., Zandee, D.I., 1988. Interactions of cadmium with the reproductive cycle of *Mytilus edulis* L. *Marine Environmental Research* 24, 189–192. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(88\)90296-6](https://doi.org/10.1016/0141-1136(88)90296-6)
- Kramer, J., Laan, P., Sarthou, G., Timmermans, K.R., de Baar, H.J.W., 2004. Distribution of dissolved aluminium in the high atmospheric input region of the subtropical waters of the North Atlantic Ocean. *Marine Chemistry* 88, 85–101. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2004.03.009>
- Krewski, D., Yokel, R.A., Nieboer, E., Borchelt, D., Cohen, J., Harry, J., Kacew, S., Lindsay, J., Mahfouz, A.M., Rondeau, V., 2007. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 10, 1–269.
- Kromkamp, J., Barranguet, C., Peene, J., 1998. Determination of microphytobenthos PSII quantum efficiency and photosynthetic activity by means of variable chlorophyll fluorescence. *Marine Ecology Progress Series* 162, 45–55.
- Kromkamp, J., Peene, J., van Rijswijk, P., Sandee, A., Goosen, N., 1995. Nutrients, light and primary production by phytoplankton and microphytobenthos in the eutrophic, turbid Westerschelde estuary (The Netherlands). *Hydrobiologia* 311, 9–19.
- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios 14.

- Laouafa, S., 2018. Rôle protecteur de l'estradiol contre les conséquences systémiques et cellulaires dans un modèle d'apnées obstructives du sommeil: implication des récepteurs nucléaires ER $\alpha$  et ER $\beta$  (PhD Thesis). Université de Lyon.
- Latire, T., Le Pabic, C., Mottin, E., Mottier, A., Costil, K., Koueta, N., Lebel, J.-M., Serpentine, A., 2012. Responses of primary cultured haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata* under 10-day exposure to cadmium chloride. *Aquatic Toxicology* 109, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.09.017>
- Law, R.J., Waldock, M.J., Allchin, C.R., Laslett, R.E., Bailey, K.J., 1994. Contaminants in seawater around England and Wales: Results from Monitoring surveys, 1990–1992. *Marine Pollution Bulletin* 28, 668–675. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(94\)90302-6](https://doi.org/10.1016/0025-326X(94)90302-6)
- Le Pabic, C., Caplat, C., Lehodey, J.-P., Dallas, L., Koueta, N., 2015. Physiological perturbations in juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* induced by subchronic exposure to dissolved zinc. *Marine Pollution Bulletin* 95, 678–687. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.02.018>
- Leleyter, L., Baraud, F., Gil, O., Gouali, S., Lemoine, M., Orvain, F., 2016. Aluminium impact on the growth of benthic diatom 20.
- Leleyter, L., Baraud, F., Reinert, T., Gouali, S., Lemoine, M., Gil, O., 2018. Fate of aluminium released by sacrificial anodes—Contamination of marine sediments by environmentally available compounds. *Comptes Rendus Geoscience* 350, 195–201.
- Leleyter, L., Rousseau, C., Gil, O., Baraud, F., 2007. Répartition des métaux lourds dans les différentes fractions des sédiments marins : influence de la protection cathodique. *Comptes Rendus Geoscience* 339, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.crte.2006.10.004>
- Levallois, A., Caplat, C., Basuyaux, O., Lebel, J.-M., Laisney, A., Costil, K., Serpentine, A., 2022. Effects of chronic exposure of metals released from the dissolution of an aluminium galvanic anode on the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology* 106223.
- Levy, J.L., Stauber, J.L., Jolley, D.F., 2007. Sensitivity of marine microalgae to copper: the effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Sci. Total Environ.* 387, 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.07.016>
- Li, Y., Qin, J.G., Li, X., Benkendorff, K., 2010. Assessment of metabolic and immune changes in postspawning Pacific oyster *Crassostrea gigas*: identification of a critical period of vulnerability after spawning: A critical period of vulnerability in postspawning *C. gigas*. *Aquaculture Research* 41, e155–e165. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02489.x>
- Lindblad, E.B., 2004. Aluminium adjuvants—in retrospect and prospect. *Vaccine* 22, 3658–3668. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.03.032>
- Liu, G., Yang, L., Fan, T., Cong, R., Tang, Z., Sun, W., Meng, X., Zhu, L., 2006. Purification and characterization of phenoloxidase from crab *Charybdis japonica*. *Fish & Shellfish Immunology* 20, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.012>
- Liu, Y., Tam, N.F.Y., Guan, Y., Yasojima, M., Zhou, J., Gao, B., 2011. Acute toxicity of nonylphenols and bisphenol A to the embryonic development of the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Ecotoxicology* 20, 1233–1245. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0672-7>
- Liu, Y., Vijver, M.G., Pan, B., Peijnenburg, W.J., 2017. Toxicity models of metal mixtures established on the basis of “additivity” and “interactions.” *Frontiers of Environmental Science & Engineering* 11, 1–13.
- Lorenzon, S., Francese, M., Smith, V.J., Ferrero, E.A., 2001. Heavy metals affect the circulating haemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans*. *Fish & Shellfish Immunology* 11, 459–472. <https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0321>
- Löscher, B.M., 1999. Relationships among Ni, Cu, Zn, and major nutrients in the Southern Ocean. *Marine Chemistry* 67, 67–102. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(99\)00050-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(99)00050-X)
- Lowe, D.M., Fossato, V.U., 2000. The influence of environmental contaminants on lysosomal activity in the digestive cells of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Venice Lagoon. *Aquatic Toxicology* 48, 75–85.
- Lowe, D.M., Pipe, R.K., 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study. *Aquatic Toxicology* 30, 357–365.

- Lubarsky, H.V., Hubas, C., Chocholek, M., Larson, F., Manz, W., Paterson, D.M., Gerbersdorf, S.U., 2010. The Stabilisation Potential of Individual and Mixed Assemblages of Natural Bacteria and Microalgae. *PLoS ONE* 5, e13794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013794>
- Lucas, A., Beninger, P.G., 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture* 44, 187–200. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90243-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90243-1)
- Luna Acosta, A., Bustamante, P., Budzinski, H., Huet, V., Thomas-Guyon, H., 2014. Persistent Organic Pollutants in a marine bivalve on the Marennes-Oléron Bay and the Gironde Estuary (French Atlantic coast) -Part 2: Potential biological effects. *Science of the Total Environment* 514, 511–522.
- Luo, Y., Wang, W.-X., 2022. Immune responses of oyster hemocyte subpopulations to in vitro and in vivo zinc exposure. *Aquatic Toxicology* 242, 106022. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.106022>
- Macdonald, J.M., Shields, J.D., Zimmer-Faust, R.K., 1988. Acute toxicities of eleven metals to early life-history stages of the yellow crab *Cancer anthonyi*. *Mar. Biol.* 98, 201–207. <https://doi.org/10.1007/BF00391195>
- Machill, S., Köhler, L., Ueberlein, S., Hedrich, R., Kunaschk, M., Paasch, S., Schulze, R., Brunner, E., 2013. Analytical studies on the incorporation of aluminium in the cell walls of the marine diatom *Stephanopyxis turris*. *Biometals* 26, 141–150. <https://doi.org/10.1007/s10534-012-9601-3>
- MacInnes, J.R., 1981. Response of embryos of the american oyster, *Crassostrea virginica*, to heavy metal mixtures. *Marine Environmental Research* 4, 217–227. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(81\)90036-2](https://doi.org/10.1016/0141-1136(81)90036-2)
- MacIntyre, H.L., Geider, R.J., Miller, D.C., 1996. Microphytobenthos: The Ecological Role of the “Secret Garden” of Unvegetated, Shallow-Water Marine Habitats. I. Distribution, Abundance and Primary Production. *Estuaries* 19, 186. <https://doi.org/10.2307/1352224>
- MacIntyre, H.L., Kana, T.M., Anning, T., Geider, R.J., 2002. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *J Phycol* 38, 17–38. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.00094.x>
- Malea, P., Rijstenbil, J.W., Haritonidis, S., 2006. Effects of cadmium, zinc and nitrogen status on non-protein thiols in the macroalgae *Enteromorpha* spp. from the Scheldt Estuary (SW Netherlands, Belgium) and Thermaikos Gulf (N Aegean Sea, Greece). *Marine environmental research* 62, 45–60.
- Malet, N., 2005. Ecologie alimentaire de l’huitre *Crassostrea gigas* : dynamiques des compositions isotopiques naturelles 276.
- Mann, R.L., Bureson, E.M., Baker, P.K., 1991. The Decline Of The Virginia Oyster Fishery In Chesapeake Bay Considerations For Introduction Of A Non-Endemic Species, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) 11.
- Mao, A., Mahaut, M.-L., Pineau, S., Barillier, D., Caplat, C., 2011. Assessment of sacrificial anode impact by aluminum accumulation in mussel *Mytilus edulis*: A large-scale laboratory test. *Marine Pollution Bulletin* 62, 2707–2713. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.017>
- Maring, H.B., Duce, R.A., 1987. The impact of atmospheric aerosols on trace metal chemistry in open ocean surface seawater, 1. Aluminum. *Earth and Planetary Science Letters* 84, 381–392. [https://doi.org/10.1016/0012-821X\(87\)90003-3](https://doi.org/10.1016/0012-821X(87)90003-3)
- Markey, K., Baird, A., Humphrey, C., Negri, A., 2007. Insecticides and a fungicide affect multiple coral life stages. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 330, 127–137. <https://doi.org/10.3354/meps330127>
- Markich, S.J., 2021. Comparative embryo/larval sensitivity of Australian marine bivalves to ten metals: A disjunct between physiology and phylogeny. *Science of The Total Environment* 789, 147988. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147988>
- Martin, M., Osborn, K.E., Billig, P., Glickstein, N., 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Marine Pollution Bulletin* 12, 305–308.
- Matozzo, V., Ballarin, L., Pampanin, D., Marin, M., 2001. Effects of Copper and Cadmium Exposure on Functional Responses of Hemocytes in the Clam, *Tapes philippinarum*. *Archives of*

- environmental contamination and toxicology 41, 163–70.  
<https://doi.org/10.1007/s002440010234>
- Mazorra, M.T., Rubio, J.A., Blasco, J., 2002. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: kinetic characteristics and effects of heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 131, 241–249.  
[https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00502-4](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00502-4)
- McGeer, J.C., Brix, K.V., Skeaff, J.M., Deforest, D.K., Brigham, S.I., Adams, W.J., Green, A., 2003. Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals: implications for hazard assessment of metals in the aquatic environment. *Environ. Toxicol. Chem* 22, 1017–1037.
- Meiri, H., Banin, E., Roll, M., Rousseau, A., 1993. Toxic effects of aluminium on nerve cells and synaptic transmission. *Progress in Neurobiology* 40, 89–121. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(93\)90049-X](https://doi.org/10.1016/0301-0082(93)90049-X)
- Menzel, D.W., Hulburt, E.M., Tyther, J.H., 1963. The effects of enriching Sargasso sea water on the production and species composition of the phytoplankton. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts* 10, 209–219. [https://doi.org/10.1016/0011-7471\(63\)90357-7](https://doi.org/10.1016/0011-7471(63)90357-7)
- Mgaya, Y.D., 1995. Synopsis of biological data on the european abalone (Ormer), *Haliotis tuberculata* Linnaeus, 1758 (Gastropoda: Haliotidae) 36.
- Millero, F., Woosley, R., DiTrollo, B., Waters, J., 2009. Effect of Ocean Acidification on the Speciation of Metals in Seawater. *Oceanog.* 22, 72–85. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2009.98>
- Min, E.Y., Cha, Y.-J., Kang, J.-C., 2015. Effects of waterborne nickel on the physiological and immunological parameters of the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* during thermal stress. *Environ Sci Pollut Res* 22, 13546–13555. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4597-1>
- Minguez, L., Halm-Lemeille, M.-P., Costil, K., Bureau, R., Lebel, J.-M., Serpentine, A., 2014. Assessment of cytotoxic and immunomodulatory properties of four antidepressants on primary cultures of abalone hemocytes (*Haliotis tuberculata*). *Aquatic Toxicology* 153, 3–11.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.020>
- Miossec, L., Deuff, R.-M.L., Goulletquer, P., 2009. Alien species alert : *Crassostrea gigas* (Pacific oyster) 46.
- Mohammadirad, A., Abdollahi, M., 2011. A systematic review on oxidant/antioxidant imbalance in aluminium toxicity. *Int J Pharmacol* 7, 12–21.
- Mohammed, A., 2013. Why are early life stages of aquatic organisms more sensitive to toxicants than adults. *New insights into toxicity and drug testing* 49–62.
- Monette, M.Y., Björnsson, B.T., McCormick, S.D., 2008. Effects of short-term acid and aluminum exposure on the parr-smolt transformation in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Disruption of seawater tolerance and endocrine status. *General and Comparative Endocrinology* 158, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.05.014>
- Monteiro, C.M., Fonseca, S.C., Castro, P.M., Malcata, F.X., 2011. Toxicity of cadmium and zinc on two microalgae, *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus pleiomorphus*, from Northern Portugal. *Journal of Applied Phycology* 23, 97–103.
- Monteiro, V., Cavalcante, D.G.S.M., Viléla, M.B.F.A., Sofia, S.H., Martinez, C.B.R., 2011. In vivo and in vitro exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic Toxicology* 104, 291–298.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.05.002>
- Moore, M.N., Shaw, J.P., Pascoe, C., Beesley, A., Viarengo, A., Lowe, D.M., 2020. Anti-oxidative hormetic effects of cellular autophagy induced by nutrient deprivation in a molluscan animal model. *Marine Environmental Research* 156, 104903.
- Moran, S.B., Moore, R.M., 1988. variations in dissolved and aluminum during a spring 11.
- Morelle, J., Schapira, M., Claquin, P., 2017. Dynamics of phytoplankton productivity and exopolysaccharides (EPS and TEP) pools in the Seine Estuary (France, Normandy) over tidal cycles and over two contrasting seasons. *Marine Environmental Research* 131, 162–176.  
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.09.007>

- Moreno-Garrido, I., Lubián, L.M., Soares, A.M.V.M., 2000. Influence of Cellular Density on Determination of EC50 in Microalgal Growth Inhibition Tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47, 112–116. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.1953>
- Morse, A.N., Morse, D.E., 1984. Recruitment and metamorphosis of *Haliotis* larvae induced by molecules uniquely available at the surfaces of crustose red algae. *Journal of experimental marine biology and ecology* 75, 191–215.
- Morse, J.W., Presley, B.J., Taylor, R.J., Benoit, G., Santschi, P., 1993. Trace metal chemistry of Galveston Bay: water, sediments and biota. *Marine Environmental Research* 36, 1–37. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(93\)90087-G](https://doi.org/10.1016/0141-1136(93)90087-G)
- Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Serpentine, A., Lebel, J.M., Jha, A.N., Costil, K., 2013. Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology* 128–129, 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.002>
- Mottier, A., Séguin, A., Devos, A., Pabic, C.L., Voiseux, C., Lebel, J.M., Serpentine, A., Fievet, B., Costil, K., 2015. Effects of subchronic exposure to glyphosate in juvenile oysters (*Crassostrea gigas*): From molecular to individual levels. *Marine Pollution Bulletin* 95, 665–677. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.026>
- Mottin, E., Caplat, C., Latire, T., Mottier, A., Mahaut, M.-L., Costil, K., Barillier, D., Lebel, J.-M., Serpentine, A., 2012. Effect of zinc sacrificial anode degradation on the defence system of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Chronic and acute exposures. *Marine Pollution Bulletin* 64, 1911–1920. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.06.017>
- Mottin, E., Caplat, C., Mahaut, M.-L., Costil, K., Barillier, D., Lebel, J.-M., Serpentine, A., 2010. Effect of in vitro exposure to zinc on immunological parameters of haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata*. *Fish & Shellfish Immunology* 29, 846–853. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.07.022>
- Mouneyrac, C., Amiard, J., Amiard-Triquet, C., 1998. Effects of natural factors (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in resident populations of oysters *Crassostrea gigas* from a polluted estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 162, 125–135. <https://doi.org/10.3354/meps162125>
- Müller, P., Li, X.-P., Niyogi, K.K., 2001. Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiol.* 125, 1558–1566. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1558>
- Mziray, P., Kimirei, I.A., 2016. Bioaccumulation of heavy metals in marine fishes (*Siganus sutor*, *Lethrinus harak*, and *Rastrelliger kanagurta*) from Dar es Salaam Tanzania. *Regional Studies in Marine Science* 7, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2016.05.014>
- Nadella, S.R., Tellis, M., Diamond, R., Smith, S., Bianchini, A., Wood, C.M., 2013. Toxicity of lead and zinc to developing mussel and sea urchin embryos: Critical tissue residues and effects of dissolved organic matter and salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 158, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.04.004>
- Negri, A.P., Harford, A.J., Parry, D.L., van Dam, R.A., 2011. Effects of alumina refinery wastewater and signature metal constituents at the upper thermal tolerance of: 2. The early life stages of the coral *Acropora tenuis*. *Marine Pollution Bulletin* 62, 474–482. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.01.011>
- Nelson, D.M., Tréguer, P., Brzezinski, M.A., Leynaert, A., Quéguiner, B., 1995. Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: Revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochem. Cycles* 9, 359–372. <https://doi.org/10.1029/95GB01070>
- Nicholson, S., 2003. Lysosomal membrane stability, phagocytosis and tolerance to emersion in the mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) following exposure to acute, sublethal, copper. *Chemosphere* 52, 1147–1151. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00328-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00328-X)
- Nicholson, S., Lam, P.K.S., 2005. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia). *Environment International* 31, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.05.007>



- Nicolas, J., Basuyaux, O., Mazurié, J., Thébault, A., 2002. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis. Aquat. Org.* 50, 35–43. <https://doi.org/10.3354/dao050035>
- Nielsen, C., 2005. Trochophora larvae: cell-lineages, ciliary bands and body regions. 2. Other groups and general discussion. *J. Exp. Zool.* 304B, 401–447. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21050>
- Ohkuma, S., Moriyama, Y., Takano, T., 1982. Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein-isothiocyanate-dextran fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 2758–2762. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.9.2758>
- Organisation Internationale de Normalisation, G., 2006. Qualité de l'eau. Essai d'inhibition de la croissance des algues marines avec *Skeletonema costatum* et *Phaeodactylum tricornutum*.
- Orvain, F., de Crignis, M., Guizien, K., Lefebvre, S., Mallet, C., Takahashi, E., Dupuy, C., 2014. Tidal and seasonal effects on the short-term temporal patterns of bacteria, microphytobenthos and exopolymers in natural intertidal biofilms (Brouage, France). *Journal of Sea Research* 92, 6–18.
- Orvain, F., Galois, R., Barnard, C., Sylvestre, A., Blanchard, G., Sauriau, P.-G., 2003. Carbohydrate Production in Relation to Microphytobenthic Biofilm Development: An Integrated Approach in a Tidal Mesocosm. *Microbial Ecology* 45, 237–251.
- Orvain, F., Lefebvre, S., Montepini, J., Sebire, M., Gangnery, A., Sylvand, B., 2012. Spatial and temporal interaction between sediment and microphytobenthos in a temperate estuarine macro-intertidal bay. *Marine Ecology-progress Series* 458, 53–68. <https://doi.org/10.3354/meps09698>
- Overnell, J., McIntosh, R., Fletcher, T.C., 1987. The enhanced induction of metallothionein by zinc, its half-life in the marine fish *Pleuronectes platessa*, and the influence of stress factors on metallothionein levels. *Experientia* 43, 178–181. <https://doi.org/10.1007/BF01942842>
- Oxborough, K., Moore, C.M., Suggett, D.J., Lawson, T., Chan, H.G., Geider, R.J., 2012. Direct estimation of functional PSII reaction center concentration and PSII electron flux on a volume basis: a new approach to the analysis of Fast Repetition Rate fluorometry (FRRf) data. *Limnology and Oceanography: Methods* 10, 142–154. <https://doi.org/10.4319/lom.2012.10.142>
- Paasche, E., 2001. A review of the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae), with particular reference to growth, coccolith formation, and calcification-photosynthesis interactions. *Phycologia* 40, 503–529.
- Paasche, E., 1964. A tracer study of the inorganic carbon uptake during coccolith formation and photosynthesis in the coccolithophorid *Coccolithus huxleyi*. *Physiol Plant Suppl* 3, 1–82.
- Pagano, G., His, E., Beiras, R., De Biase, A., Korkina, L.G., Iaccarino, M., Oral, R., Quiniou, F., Warnau, M., Trieff, N.M., 1996. Cytogenetic, developmental, and biochemical effects of aluminum, iron, and their mixture in sea urchins and mussels. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 466–474. <https://doi.org/10.1007/BF00212429>
- Papp, R., 2011. Les propriétés environnementales des éléments traces. Particularités et conséquences pour l'analyse de risque. Collège National d'Experts en l'Environnement de l'Industrie Chimique.
- Paterson, D.M., 1989a. Short-term changes in the erodibility of intertidal cohesive sediments related to the migratory behavior of epipelagic diatoms. *Limnology and Oceanography* 34, 223–234. <https://doi.org/10.4319/lo.1989.34.1.0223>
- Paterson, D.M., 1989b. Short-term changes in the erodibility of intertidal cohesive sediments related to the migratory behavior of epipelagic diatoms. *Limnology and Oceanography* 34, 223–234. <https://doi.org/10.4319/lo.1989.34.1.0223>
- Pavlaki, M.D., Araújo, M.J., Cardoso, D.N., Silva, A.R.R., Cruz, A., Mendo, S., Soares, A.M., Calado, R., Loureiro, S., 2016. Ecotoxicity and genotoxicity of cadmium in different marine trophic levels. *Environmental pollution* 215, 203–212.
- Pelletier, É., Campbell, P., 2008. L'écotoxicologie aquatique-comparaison entre Les micropolluants organiques et Les métaux: constats actuels et défis pour L'avenir. *Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science* 21, 173–197.
- Perez, T., Sartoretto, S., Soltan, D., Capo, S., Fourt, M., Dutrieux, E., Vacelet, J., Harmelin, J.G., Rebouillon, P., 2000. Etude bibliographique sur les bioindicateurs de l'état du milieu marin.

- Système d'évaluation de la qualité des milieux littoraux, Volet biologique. Agence de l'Eau, Marseille.
- Petrich, S.M., Reish, D.J., 1979. Effects of aluminium and nickel on survival and reproduction in polychaetous annelids. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 23, 698–702. <https://doi.org/10.1007/BF01770027>
- Pfeiffer, T., Ivna, Š., Špoljarić Maronić, D., Maksimovic, I., 2017. Regulation of Photosynthesis in Algae Under Metal Stress.
- Pipe, R.K., Coles, J.A., 1995. Environmental contaminants influencing immunefunction in marine bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology* 5, 581–595. [https://doi.org/10.1016/S1050-4648\(95\)80043-3](https://doi.org/10.1016/S1050-4648(95)80043-3)
- Pipe, R.K., Coles, J.A., Carissan, F.M.M., Ramanathan, K., 1999. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 46, 43–54. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00114-3](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00114-3)
- Plackett, R.L., Hewlett, P.S., 1963. A unified theory for quantal responses to mixtures of drugs: the fitting to data of certain models for two non-interactive drugs with complete positive correlation of tolerances. *Biometrics* 517–531.
- Plum, L.M., Rink, L., Haase, H., 2010. The essential toxin: impact of zinc on human health. *International journal of environmental research and public health* 7, 1342–1365.
- Pohl, C., Kattner, G., Schulz-Baldes, M., 1993. Cadmium, copper, lead and zinc on transects through Arctic and Eastern Atlantic surface and deep waters. *Journal of Marine Systems* 4, 17–29. [https://doi.org/10.1016/0924-7963\(93\)90017-G](https://doi.org/10.1016/0924-7963(93)90017-G)
- Poirier, L., Berthet, B., Amiard, J.-C., Jeantet, A.-Y., Amiard-Triquet, C., 2006. A suitable model for the biomonitoring of trace metal bioavailabilities in estuarine sediments: The annelid polychaete *Nereis diversicolor*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 86, 71–82. <https://doi.org/10.1017/S0025315406012872>
- Poléo, A.B.S., Hytterød, S., 2003. The effect of aluminium in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with special emphasis on alkaline water. *Journal of Inorganic Biochemistry* 97, 89–96. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(03\)00261-7](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(03)00261-7)
- Pollero, R., Huca, G., Brenner, R.R., 1985. Role of hemocytes and plasma on lipid transport in the freshwater mollusc 5.
- Portmann, J.E., 1968. Progress report on a programme of insecticide analysis and toxicity-testing in relation to the marine environment. *Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 17, 247–256.
- Pourgharibshahi, M., Lambert, P., 2016. The role of indium in the activation of aluminum alloy galvanic anodes: Indium's role in Al-Zn-In anodes. *Materials and Corrosion* 67, 857–866. <https://doi.org/10.1002/maco.201508685>
- Prytherch, H.F., 1924. Experiments in the artificial propagation of oysters. US Government Printing Office.
- Pulley, T.E., 1950. The effect of aluminium chloride in small concentration on various marine organisms. *Texas J. Sci* 2, 405–411.
- Rainbow, P.S., Phillips, D.J.H., 1993. Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Marine Pollution Bulletin* 26, 593–601. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(93\)90497-8](https://doi.org/10.1016/0025-326X(93)90497-8)
- Rani, S., Gupta, R.K., Yadav, J., 2017. Heavy metal induced alterations in acetylcholinesterase activity of Indian major carps. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 4.
- Rashid, F., Horobin, R.W., Williams, M.A., 1991. Predicting the behaviour and selectivity of fluorescent probes for lysosomes and related structures by means of structure-activity models. *Histochem J* 23, 450–459. <https://doi.org/10.1007/BF01041375>
- Rauch, J.N., Pacyna, J.M., 2009. Earth's global Ag, Al, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, and Zn cycles. *Global Biogeochemical Cycles* 23. <https://doi.org/10.1029/2008GB003376>
- Reese, A., Voigt, N., Zimmermann, T., Irrgeher, J., Pröfrock, D., 2020. Characterization of alloying components in galvanic anodes as potential environmental tracers for heavy metal emissions from offshore wind structures. *Chemosphere* 257, 127182.

- Refait, Ph., Jeannin, M., Sabot, R., Antony, H., Pineau, S., 2015. Corrosion and cathodic protection of carbon steel in the tidal zone: Products, mechanisms and kinetics. *Corrosion Science* 90, 375–382. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2014.10.035>
- Ren, J.-L., Zhang, G.-L., Zhang, J., Shi, J.-H., Liu, S.-M., Li, F.-M., Jin, J., Liu, C.-G., 2011. Distribution of dissolved aluminum in the Southern Yellow Sea: Influences of a dust storm and the spring bloom. *Marine Chemistry* 125, 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2011.02.004>
- Renault, T., 2015. Immunotoxicological effects of environmental contaminants on marine bivalves. *Fish & Shellfish Immunology* 46, 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.04.011>
- Richmond, M.D., 2002. A field guide to the seashores of Eastern Africa and the Western Indian Ocean Islands.
- Roche, P.M., 2015. L'essentiel sur la protection cathodique 14.
- Rodríguez-Ortega, M.J., Alhama, J., Funes, V., Romero-Ruiz, A., Rodríguez-Ariza, A., López-Barea, J., 2002. Biochemical biomarkers of pollution in the clam *Chamaelea gallina* from South-Spanish littoral. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 21, 542–549.
- Roméo, M., Siau, Y., Sidoumou, Z., Gnassia-Barelli, M., 1999. Heavy metal distribution in different fish species from the Mauritania coast. *Science of The Total Environment* 232, 169–175. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00099-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00099-6)
- Roshan, S., DeVries, T., Wu, J., Chen, G., 2018. The Internal Cycling of Zinc in the Ocean. *Global Biogeochemical Cycles* 32, 1833–1849. <https://doi.org/10.1029/2018GB006045>
- Rosseland, B.O., Blakar, I.A., Bulger, A., Kroglund, F., Kvellstad, A., Lydersen, E., Oughton, D.H., Salbu, B., Staurnes, M., Vogt, R., 1992. The mixing zone between limed and acidic river waters: complex aluminium chemistry and extreme toxicity for salmonids. *Environmental Pollution* 78, 3–8.
- Rost, B., Riebesell, U., 2004. Coccolithophores and the biological pump: responses to environmental changes, in: Thierstein, H.R., Young, J.R. (Eds.), *Coccolithophores*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 99–125. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-06278-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-662-06278-4_5)
- Round, F.E., Crawford, R.M., Mann, D.G., 1990. *Diatoms: biology and morphology of the genera*. Cambridge university press.
- Rousseau, C., Baraud, F., Leleyter, L., Gil, O., 2009. Cathodic protection by zinc sacrificial anodes: Impact on marine sediment metallic contamination. *Journal of Hazardous Materials* 167, 953–958. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.083>
- Roy, A.H., 1968. Aluminium alloy anode and method of using same in cathodic protection. United States Patent Office 3393, 138.
- Ruban, A.V., Johnson, M.P., Duffy, C.D.P., 2011. Natural light harvesting: principles and environmental trends. *Energy Environ. Sci.* 4, 1643–1650. <https://doi.org/10.1039/C0EE00578A>
- Ruesink, J.L., Roegner, G.C., Dumbauld, B.R., Newton, J.A., Armstrong, D.A., 2003. Contributions of coastal and watershed energy sources to secondary production in a Northeastern Pacific Estuary. *Estuaries* 26, 1079–1093. <https://doi.org/10.1007/BF02803365>
- Ruus, A., Schaanning, M., Øxnevad, S., Hylland, K., 2005. Experimental results on bioaccumulation of metals and organic contaminants from marine sediments. *Aquatic Toxicology* 72, 273–292. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.01.004>
- Saçan, M.T., Oztay, F., Bolkent, S., 2007. Exposure of *Dunaliella tertiolecta* to Lead and Aluminum: Toxicity and Effects on Ultrastructure. *Biol Trace Elem Res* 120, 264–272. <https://doi.org/10.1007/s12011-007-8016-4>
- Sakai, S., 1960. ON THE FORMATION OF THE ANNUAL RING ON THE SHELL OF THE ABALONE, *HALIOTIS DISCUS* var. *HANNAI* INO. *Tohoku Journal of Agricultural Research* 11.
- Salgueiro, M.J., Zubillaga, M., Lysionek, A., Sarabia, M.I., Caro, R., De Paoli, T., Hager, A., Weill, R., Boccio, J., 2000. Zinc as an essential micronutrient: A review. *Nutrition Research* 20, 737–755. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(00\)00163-9](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(00)00163-9)
- Sauve, S., Brousseau, P., Pellerin, J., Morin, Y., Senecal, L., Goudreau, P., Fournier, M., 2002. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology* 12.

- Ščančar, J., Milačič, R., 2006. Aluminium speciation in environmental samples: a review. *Anal Bioanal Chem* 386, 999–1012. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0422-5>
- Schreiber, U., 2004. Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview, in: *Chlorophyll a Fluorescence*. Springer, pp. 279–319.
- Schreiber, U., Klughammer, C., Kolbowski, J., 2012. Assessment of wavelength-dependent parameters of photosynthetic electron transport with a new type of multi-color PAM chlorophyll fluorometer. *Photosynthesis research* 113, 127–144.
- Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W., 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res* 10, 51–62. <https://doi.org/10.1007/BF00024185>
- Schubert, W.-D. et al, 1998. A Common Ancestor for Oxygenic and Anoxygenic Photosynthetic Systems: A Comparison Based on the Structural Model of Photosystem I 18.
- Séguin, A., 2016. Évaluation de l'effet des contaminants et de l'environnement sur les bivalves marins et saumâtres par la mise en œuvre d'une batterie de biomarqueurs: approches en milieu contrôlé et in situ (PhD Thesis). Caen.
- Séguin, A., Caplat, C., Serpentine, A., Lebel, J.M., Menet-Nedelec, F., Costil, K., 2016. Metal bioaccumulation and physiological condition of the Pacific oyster ( *Crassostrea gigas* ) reared in two shellfish basins and a marina in Normandy (northwest France). *Marine Pollution Bulletin* 106, 202–214. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.068>
- Séguin, A., Mottier, A., Perron, C., Lebel, J.M., Serpentine, A., Costil, K., 2017. Sub-lethal effects of a glyphosate-based commercial formulation and adjuvants on juvenile oysters ( *Crassostrea gigas* ) exposed for 35 days. *Marine Pollution Bulletin* 117, 348–358. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.02.028>
- Seguineau, C., Racotta, I.S., Palacios, E., Delaporte, M., Moal, J., Soudant, P., 2011. The influence of dietary supplementation of arachidonic acid on prostaglandin production and oxidative stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 160, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.05.011>
- Seidowsky, A., Dupuis, E., Druke, T., Dard, S., Massy, Z.A., Canaud, B., 2018. Intoxication aluminique en hémodialyse chronique. Un diagnostic rarement évoqué de nos jours. Illustration par un cas clinique et revue de la littérature. *Néphrologie & Thérapeutique* 14, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2017.04.002>
- Shahidul Islam, Md., Tanaka, M., 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin* 48, 624–649. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2003.12.004>
- Shaw, J.P., Dondero, F., Moore, M.N., Negri, A., Dagnino, A., Readman, J.W., Lowe, D.R., Frickers, P.E., Beesley, A., Thain, J.E., Viarengo, A., 2011. Integration of biochemical, histochemical and toxicogenomic indices for the assessment of health status of mussels from the Tamar Estuary, U.K. *Marine Environmental Research* 72, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.05.003>
- Shaw, J.P., Large, A.T., Donkin, P., Evans, S.V., Staff, F.J., Livingstone, D.R., Chipman, J.K., Peters, L.D., 2004. Seasonal variation in cytochrome P450 immunopositive protein levels, lipid peroxidation and genetic toxicity in digestive gland of the mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 12.
- Sheahan, D., Brooks, S., Raffo, A., Smedley, C., Law, R., 2007. A Review of the Contaminant Status of SEA 8 covering the Western Approaches. Celtic Sea and English Channel.
- Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanism of bivalve molluscs. *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology* 123, 193–9. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(99\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(99)00033-X)
- Shi, W., Guan, X., Han, Y., Guo, C., Rong, J., Su, W., Zha, S., Wang, Y., Liu, G., 2018. Waterborne Cd<sup>2+</sup> weakens the immune responses of blood clam through impacting Ca<sup>2+</sup> signaling and Ca<sup>2+</sup> related apoptosis pathways. *Fish & Shellfish Immunology* 77, 208–213. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.055>

- Shibli, S.M.A., Jabeera, B., Manu, R., 2007. Development of high performance aluminium alloy sacrificial anodes reinforced with metal oxides. *Materials letters* 61, 3000–3004.
- Shnyukova, E.I., Zolotariova, Y.K., 2015. Diatom Exopolysaccharides: a Review. *IJA* 17. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v17.i1.50>
- Shutler, J.D., Land, P.E., Brown, C.W., Findlay, H.S., Donlon, C.J., Medland, M., Snooke, R., Blackford, J.C., 2013. Coccolithophore surface distributions in the North Atlantic and their modulation of the air-sea flux of CO<sub>2</sub> from 10 years of satellite Earth observation data. *Biogeosciences* 10, 2699–2709. <https://doi.org/10.5194/bg-10-2699-2013>
- Sies, H., 1986. Biochemistry of Oxidative Stress 1058–1071.
- Simkiss, K., Taylor, M.G., 1989. Metal fluxes across the membranes of aquatic organisms. *Rev Aquat Sci* 1, 173–188.
- Simon, C., Fitzgibbon, Q., Battison, A., Carter, C., Battaglione, S., 2015. Bioenergetics of Nutrient Reserves and Metabolism in Spiny Lobster Juveniles *Sagmariasus verreauxi*: Predicting Nutritional Condition from Hemolymph Biochemistry. *Physiological and biochemical zoology*: PBZ 88, 266–283. <https://doi.org/10.1086/681000>
- Skinner, C., Turoczy, N.J., Jones, P.L., Barnett, D., Hodges, R., 2004. Heavy metal concentrations in wild and cultured Blacklip Abalone (*Haliotis rubra* Leach) from southern Australian waters. *Food Chemistry* 85, 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.011>
- Smith, S., Goolsby, A., 1996. A Consumer's Perspective of Aluminum Anode Quality Test Design.
- Sokolova, I.M., 2013. Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integrative and comparative biology* 53, 597–608.
- Soudant, P., E. Chu, F.-L., Volety, A., 2013. Host–parasite interactions: Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, Perkinsus species. *Journal of Invertebrate Pathology* 114, 196–216. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.06.001>
- Staats, N., Stal, L.J., Mur, L.R., 2000. Exopolysaccharide production by the epipellic diatom *Cylindrotheca closterium*: effects of nutrient conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 249, 13–27. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00166-0](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00166-0)
- Stanley Jr, J.K., Byrne, R.H., 1990. Inorganic complexation of Zinc (II) in seawater. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 54, 753–760.
- Stauber, J.L., Florence, T.M., 1990. Mechanism of toxicity of zinc to the marine diatom *Nitzschia closterium*. *Mar. Biol.* 105, 519–524. <https://doi.org/10.1007/BF01316323>
- Staurnes, M., Sigholt, T., Reite, O.B., 1984. Reduced carbonic anhydrase and Na–K–ATPase activity in gills of salmonids exposed to aluminium-containing acid water. *Experientia* 40, 226–227. <https://doi.org/10.1007/BF01963613>
- Steele, D.J., Franklin, D.J., Underwood, G.J.C., 2014. Protection of cells from salinity stress by extracellular polymeric substances in diatom biofilms. *Biofouling* 30, 987–998. <https://doi.org/10.1080/08927014.2014.960859>
- Stephenson, T.A., 1924. Notes on *Haliotis tuberculata*. *J. Mar. Biol. Ass.* 13, 480–495. <https://doi.org/10.1017/S0025315400007621>
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1968. A Practical Handbook of Seawater Analysis. Queen's Printer.
- Suggett, D.J., Prášil, O., Borowitzka, M.A., 2010. Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications. Springer.
- Sunda, W.G., Huntsman, S.A., 2000. Effect of Zn, Mn, and Fe on Cd accumulation in phytoplankton: Implications for oceanic Cd cycling. *Limnology and Oceanography* 45, 1501–1516. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.7.1501>
- Sunda, W.G., Huntsman, S.A., 1992. Feedback interactions between zinc and phytoplankton in seawater. *Limnology and Oceanography* 37, 25–40.
- Sunda, W.G., Tester, P.A., Huntsman, S.A., 1987. Effects of cupric and zinc ion activities on the survival and reproduction of marine copepods. *Mar. Biol.* 94, 203–210. <https://doi.org/10.1007/BF00392932>

- Suresh Kumar, K., Dahms, H.-U., Lee, J.-S., Kim, H.C., Lee, W.C., Shin, K.-H., 2014. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 104, 51–71. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.042>
- Sussarellu, R., Fabioux, C., Camacho Sanchez, M., Le Goïc, N., Lambert, C., Soudant, P., Moraga, D., 2012. Molecular and cellular response to short-term oxygen variations in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 412, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.11.007>
- Suzuki, T., Yoshinaka, R., Mizuta, S., Funakoshi, S., Wada, K., 1991. Extracellular matrix formation by amoebocytes during epithelial regeneration in the pearl oyster *Pinctada fucata* 8.
- Syasina, I.G., Vaschenko, M.A., Zhadan, P.M., 1997. Morphological alterations in the digestive diverticula of *Mizuhopecten yessoensis* (Bivalvia: Pectinidae) from polluted areas of Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Marine Environmental Research* 44, 85–98. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(96\)00104-3](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(96)00104-3)
- Taline, 2018. Transfert d'éléments métalliques constitutifs d'anodes galvaniques Aluminium-Indium vers l'Environnement.
- Tan, B., Mai, K., 2001. Zinc methionine and zinc sulfate as sources of dietary zinc for juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Aquaculture* 192, 67–84. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00435-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00435-X)
- Tanaka, A., Hirata, M., Kiyohara, Y., Nakano, M., Omae, K., Shiratani, M., Koga, K., 2010. Review of pulmonary toxicity of indium compounds to animals and humans. *Thin Solid Films* 518, 2934–2936. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2009.10.123>
- Taylor, A.M., Maher, W.A., 2014. Exposure–dose–response of *Tellina deltoidalis* to metal contaminated estuarine sediments 2. Lead spiked sediments. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 159, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.09.006>
- Teien, H.-C., Standring, W.J.F., Salbu, B., 2006. Mobilization of river transported colloidal aluminium upon mixing with seawater and subsequent deposition in fish gills. *Science of The Total Environment* 364, 149–164. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.01.005>
- Tellis, M.S., Lauer, M.M., Nadella, S., Bianchini, A., Wood, C.M., 2014. Sublethal mechanisms of Pb and Zn toxicity to the purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) during early development. *Aquatic Toxicology* 146, 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.004>
- Thompson, R.C., Moschella, P.S., Jenkins, S.R., Norton, T.A., Hawkins, S.J., 2005. Differences in photosynthetic marine biofilms between sheltered and moderately exposed rocky shores. *Marine Ecology Progress Series* 296, 53–63. <https://doi.org/10.3354/meps296053>
- Thompson, R.C., Norton, T.A., Hawkins, S.J., 2004. Physical Stress and Biological Control Regulate the Producer–Consumer Balance in Intertidal Biofilms. *Ecology* 85, 1372–1382. <https://doi.org/10.1890/03-0279>
- Torres, P., Rodrigues, A., Prestes, A.C., Neto, A.I., Álvaro, N., Martins, G.M., 2020. The Azorean edible abalone *Haliotis tuberculata*, an alternative heavy metal-free marine resource? *Chemosphere* 242, 125177.
- Travers, M.-A., Le Goïc, N., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 800–808. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.08.003>
- Tredici, M.R., Biondi, N., Ponis, E., Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., 2009. Advances in microalgal culture for aquaculture feed and other uses, in: *New Technologies in Aquaculture*. Elsevier, pp. 610–676. <https://doi.org/10.1533/9781845696474.3.610>
- Trefry, J.H., Trocine, R.P., Naito, K.L., Metz, S., 1996. Assessing the Potential for Enhanced Bio Accumulation of Heavy Metals from Produced Water Discharges to the Gulf of Mexico, in: *Produced Water 2*. Springer, pp. 339–354.
- Trenfield, M.A., van Dam, J.W., Harford, A.J., Parry, D., Streten, C., Gibb, K., van Dam, R.A., 2015. Aluminium, gallium, and molybdenum toxicity to the tropical marine microalga *Isochrysis*

- galbana*: Metal toxicity to the tropical marine alga *I. galbana*. Environ Toxicol Chem 34, 1833–1840. <https://doi.org/10.1002/etc.2996>
- Tria, J., Butler, E.C.V., Haddad, P.R., Bowie, A.R., 2007. Determination of aluminium in natural water samples. Analytica Chimica Acta 588, 153–165. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.02.048>
- Tripathi, B.N., Gaur, J.P., 2004. Relationship between copper- and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. Planta 219. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1237-2>
- Türker Saçan, M., Akme Mehmet Balcioglu, I., 2001. Bioaccumulation of Aluminium in *Dunaliella tertiolecta* in Natural Seawater: Aluminium–Metal (Cu, Pb, Se) Interactions and Influence of pH. Bulletin of environmental contamination and toxicology 66, 214–221.
- Underwood, A.J., 1984. Microalgal food and the growth of the intertidal gastropods *Nerita atramentosa* Reeve and *Bembicium nanum* (Lamarck) at four heights on a shore. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 79, 277–291. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(84\)90201-6](https://doi.org/10.1016/0022-0981(84)90201-6)
- Underwood, G.J.C., Boulcott, M., Raines, C.A., Waldron, K., 2004. Environmental Effects on Exopolymer Production by Marine Benthic Diatoms: Dynamics, Changes in Composition, and Pathways of Production1. Journal of Phycology 40, 293–304. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.03076.x>
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullos, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety 64, 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>
- Valdés, J., Román, D., Rivera, L., Ávila, J., Cortés, P., 2011. Metal contents in coastal waters of San Jorge Bay, Antofagasta, northern Chile: a base line for establishing seawater quality guidelines. Environ Monit Assess 183, 231–242. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-1917-x>
- Van Bennekom, A.J., Buma, A.G.J., Nolting, R.F., 1991. Dissolved aluminium in the Weddell-Scotia Confluence and effect of Al on the dissolution kinetics of biogenic silica. Marine Chemistry 35, 423–434. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(09\)90034-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(09)90034-2)
- Vaughn, C.C., Hoellein, T.J., 2018. Bivalve Impacts in Freshwater and Marine Ecosystems. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 49, 183–208. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110617-062703>
- Viarengo, A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. Rev. Aquat. Sci 1, 295–317.
- Viarengo, A., Mancinelli, G., Pertica, M., Fabbri, R., Orunesu, M., 1993. Effects of heavy metals on the Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity present in gill cell plasma-membrane of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology 106, 655–660. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(93\)90223-8](https://doi.org/10.1016/0742-8413(93)90223-8)
- Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Orunesu, M., Zanicchi, G., Moore, M.N., Pipe, R.K., 1984. Possible role of lysosomes in the detoxication of copper in the digestive gland cells of metal-exposed mussels. Marine Environmental Research 14, 469–470. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(84\)90118-1](https://doi.org/10.1016/0141-1136(84)90118-1)
- Viarengo, A., Zanicchi, G., Moore, M.N., Orunesu, M., 1981. Accumulation and detoxication of copper by the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam: A study of the subcellular distribution in the digestive gland cells. Aquatic toxicology 1, 147–157.
- Vindimian, E., 2012. MSeExcel Macro Regtox 7.06 Freely available from Eric Vindimian. IRSTEA, France.
- Vivier, B., 2021. Rôle de la colonisation d'infrastructures marines sur la production et la biodiversité des écosystèmes côtiers en Manche (PhD Thesis). Normandie Université. pp 406.
- Vivier, B., Claquin, P., Lelong, C., Lesage, Q., Peccate, M., Hamel, B., Georges, M., Bourguiba, A., Sebaibi, N., Boutouil, M., Goux, D., Dauvin, J.-C., Orvain, F., 2021. Influence of infrastructure material composition and microtopography on marine biofilm growth and photobiology. Biofouling 37, 740–756. <https://doi.org/10.1080/08927014.2021.1959918>
- Vogeler, S., Bean, T.P., Lyons, B.P., Galloway, T.S., 2016. Dynamics of nuclear receptor gene expression during Pacific oyster development. BMC Dev Biol 16, 33. <https://doi.org/10.1186/s12861-016-0129-6>

- Waller, T.R., 1981. Functional morphology and development of veliger larvae of the European oyster, *Ostrea edulis* Linné. *Smithsonian Contributions to Zoology* 1–70. <https://doi.org/10.5479/si.00810282.328>
- Walne, P.R., Mann, R., 1975. Growth and biochemical composition in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*, in: Ninth European Marine Biology Symposium. Aberdeen University Press Scotland, pp. 587–607.
- Walton, R.C., McCrohan, C.R., Livens, F., White, K.N., 2010. Trophic transfer of aluminium through an aquatic grazer–omnivore food chain. *Aquatic Toxicology* 99, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.003>
- Wan, L., Wang, N., Li, Q., Sun, B., Zhou, Z., Xue, K., Ma, Z., Tian, J., Song, L., 2008. DISTRIBUTION OF DISSOLVED METALS IN SEAWATER OF JINZHOU BAY, CHINA. *Environ Toxicol Chem* 27, 43. <https://doi.org/10.1897/07-155.1>
- Watanabe, T., Kiron, V., Satoh, S., 1997. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* 151, 185–207. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01503-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01503-7)
- Watling, H.R., 1982. Comparative study of the effects of zinc, cadmium, and copper on the larval growth of three oyster species. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 28, 195–201. <https://doi.org/10.1007/BF01608575>
- Webb, W.L., Newton, M., Starr, D., 1974. Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra*: A mathematical model. *Oecologia* 17, 281–291. <https://doi.org/10.1007/BF00345747>
- Westbroek, P., Brown, C.W., Bleijswijk, J. van, Brownlee, C., Brummer, G.J., Conte, M., Egge, J., Fernández, E., Jordan, R., Knappertsbusch, M., Stefels, J., Veldhuis, M., van der Wal, P., Young, J., 1993. A model system approach to biological climate forcing. The example of *Emiliana huxleyi*. *Global and Planetary Change* 8, 27–46. [https://doi.org/10.1016/0921-8181\(93\)90061-R](https://doi.org/10.1016/0921-8181(93)90061-R)
- White, S., Anandraj, A., Bux, F., 2011. PAM fluorometry as a tool to assess microalgal nutrient stress and monitor cellular neutral lipids. *Bioresource Technology* 102, 1675–1682. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.097>
- Willis, J.N., Sunda, W.G., 1984. Relative contributions of food and water in the accumulation of zinc by two species of marine fish. *Mar. Biol.* 80, 273–279. <https://doi.org/10.1007/BF00392822>
- Wilson, S.P., Hyne, R.V., 1997. Toxicity of Acid-Sulfate Soil Leachate and Aluminum to Embryos of the Sydney Rock Oyster. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 37, 30–36. <https://doi.org/10.1006/eesa.1996.1514>
- Winter, A.L., Jordan, R.W., Roth, P.H., 1994. Biogeography of living coccolithophores in ocean waters.
- Witters, H.E., VanPuymbroeck, S., Stouthart, A.J., Bonga, S.E.W., 1996. Physicochemical changes of aluminium in mixing zones: mortality and physiological disturbances in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 15, 986–996.
- Woelke, C.E., 1972. Development of a receiving water quality bioassay criterion based on the 48-hour Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryo.
- Wong, S.W.Y., Leung, P.T.Y., Djurišić, A.B., Leung, K.M.Y., 2010. Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: influences of aggregate size and ion solubility. *Anal Bioanal Chem* 396, 609–618. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3249-z>
- Xie, J., Bai, X., Lavoie, M., Lu, H., Fan, X., Pan, X., Fu, Z., Qian, H., 2015. Analysis of the Proteome of the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum* Exposed to Aluminum Providing Insights into Aluminum Toxicity Mechanisms. *Environ. Sci. Technol.* 49, 11182–11190. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03272>
- Xu, H., Ren, D., 2015. Lysosomal physiology. *Annual review of physiology* 77, 57.
- Yang, G., Hadioui, M., Wang, Q., Wilkinson, K.J., 2019. Role of pH on indium bioaccumulation by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Pollution* 250, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.116>
- Yoshimura, E., Nagasaka, S., Satake, K., Mori, S., 2000. Mechanism of aluminium tolerance in *Cyanidium caldarium* 4.



- Yoshimura, E., Nagasaka, S., Sato, Y., Satake, K., Mori, S., 1999. Extraordinary high aluminium tolerance of the acidophilic thermophilic alga, *Cyanidium caldarium*. *Soil Science and Plant Nutrition* 45, 721–724. <https://doi.org/10.1080/00380768.1999.10415835>
- Young, J.R., Geisen, M., Probert, I., 2005. A review of selected aspects of coccolithophore biology with implications for paleobiodiversity estimation. *Micropaleontology* 51, 267–288. <https://doi.org/10.2113/gsmicropal.51.4.267>
- Ytreberg, E., Karlsson, J., Ndungu, K., Hassellöv, M., Breitbarth, E., Eklund, B., 2010. Influence of salinity and organic matter on the toxicity of Cu to a brackish water and marine clone of the red macroalga *Ceramium tenuicorne*. *Ecotoxicology and environmental safety* 74, 636–42. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.09.013>
- Zhou, L., Liu, J., Xing, S., Tan, Y., Huang, L., 2018a. Phytoplankton responses to aluminum enrichment in the South China Sea. *Journal of Inorganic Biochemistry* 181, 117–131. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.09.022>
- Zhou, L., Tan, Y., Huang, L., Fortin, C., Campbell, P.G.C., 2018b. Aluminum effects on marine phytoplankton: implications for a revised Iron Hypothesis (Iron–Aluminum Hypothesis). *Biogeochemistry* 139, 123–137. <https://doi.org/10.1007/s10533-018-0458-6>
- Zondervan, I., 2007. The effects of light, macronutrients, trace metals and CO<sub>2</sub> on the production of calcium carbonate and organic carbon in coccolithophores—A review. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 54, 521–537. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2006.12.004>

## Webographie

<http://www.epsilon.insee.fr/jspui/handle/1/24415>

<http://molluscabase.org/>

<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=140059>

<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=140656>

<https://doris.ffessm.fr/Especies/Haliotis-tuberculata-tuberculata-Ormeau-437>

## Annexes

Annexe 1 : Tableau de synthèse des concentrations en aluminium mesurées dans les eaux côtières et dans le plein océan. AAS = Atomic absorption spectrometry. FS = fluorescence spectrometry. HHPN-AAS = hydraulic high-pressure nebulization flame furnace atomic absorption spectrometry. ICP-AES = inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. ICP-MS = inductively coupled plasma mass spectroscopy.

| Site                                                     | Technique de dosage | Aluminium dissous ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | Référence                     |
|----------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------|-------------------------------|
| <b>Eaux côtières</b>                                     |                     |                                            |                               |
| Littoral de Al-Khobar - Golfe d'Arabie (Arabie saoudite) | ICP-MS              | 0,60-10,60                                 | Alharbi et al. (2017)         |
| Littoral Al-Khafji - Golfe d'Arabie (Arabie saoudite)    | ICP-MS              | 0,68-1,56                                  | Alharbi et El-Sorogy (2019)   |
| Mer d'Arabie (côté indienne)                             | FS                  | 1,49-2                                     | Upadhyay et Sen Gupta (1994)  |
| Plage de Marsa Matrouh (Egypte)                          | AAS                 | 19,25-106,49                               | Ghani (2015)                  |
| Baie de Floride (États-Unis)                             | ICP-MS              | 0,81-48,5                                  | Caccia et Millero (2003)      |
| Nord de la côte de Taiwan                                | FS                  | 1,81-3,55                                  | Fang et al. (2006)            |
| Baie San Jorge Bay – Antofagasta (Nord du Chili)         | AAS                 | 67,42-131,96                               | Valdès et al. (2011)          |
| A l'extérieur du Port Curtis (Australie)                 | ICP-MS              | 4–5                                        | Angel et al. (2012)           |
| A l'extérieur du Port Curtis (Australie)                 | ICP-MS              | 2–4                                        | Angel et al. (2012)           |
| Cronulla (Australie)                                     | ICP-AES             | 1,3                                        | Angel et al. (2016)           |
| Mer Noire – Rice (Turquie)                               | ICP-AES             | 33-80                                      | Baltas et al. (2017)          |
| Golfe de Guinée                                          | AAS                 | 0,8 $\pm$ 0,3                              | Van Bennekom et Jager (1978)  |
| Port Jackson (Australie)                                 | ICP-AES             | 14-28                                      | Jahan et Strezov (2017)       |
| Port Botany (Australie)                                  | ICP-AES             | 18-151                                     | Jahan et Strezov (2017)       |
| Port Kembla (Australie)                                  | ICP-AES             | 1-37                                       | Jahan et Strezov (2017)       |
| Port New Castle (Australie)                              | ICP-AES             | 3-125                                      | Jahan et Strezov (2017)       |
| Port Yamba (Australie)                                   | ICP-AES             | 22-1170                                    | Jahan et Strezov (2017)       |
| Port Eden (Australie)                                    | ICP-AES             | 13-16                                      | Jahan et Strezov (2017)       |
| <b>Plein Océan</b>                                       |                     |                                            |                               |
| Nord-ouest de l'océan Indien (mer d'Oman)                | FS                  | 0,99-1,4                                   | Upadhyay et Sen Gupta (1994)  |
| Océan austral (mer de Weddell)                           | AAS                 | 0,085 ( $\pm$ 0,035)                       | Sañudo-Wilhelmy et al. (2002) |
| Océan Arctique central                                   | FS                  | 0,111-0,567                                | Moore (1981)                  |
| Atlantique Nord-Est                                      | FS                  | 0,432-0,864                                | Hydes (1983)                  |
| Océan Atlantique Nord                                    | FS                  | 0,165-0,689                                | Kramer et al. (2004)          |
| Méditerranée - bassin oriental                           | FS                  | 1,49-2,03                                  | Hydes et al. (1988)           |

## Annexe 2 : Synthèse des études de toxicité réalisées en laboratoire sur l'impact de l'aluminium chez les organismes marins.

| Espèce                                | Forme d'Al                                                   | Temps d'exposition | Concentrations testées                           | Principaux résultats                                                                                                                        | Référence                  |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| <b>Mollusques</b>                     |                                                              |                    |                                                  |                                                                                                                                             |                            |
| <i>Crassostrea virginica</i>          | AlCl <sub>3</sub>                                            | 42-48 h            | 1000-7500 µg L <sup>-1</sup>                     | Aucun effet observé (phase larvaire)                                                                                                        | Calabrese et al. (1973)    |
| <i>Saccostrea glomerata</i>           | Lixiviât de sol                                              | 48 h               | 100-800 µg L <sup>-1</sup>                       | NOEC = 100 µg L <sup>-1</sup> (phase larvaire)                                                                                              | Wilson et al. (1997)       |
| <i>Mytilus edulis</i>                 | AlCl <sub>3</sub>                                            | 72 h               | 1-10 000 µg L <sup>-1</sup>                      | CL <sub>50</sub> = 250 µg L <sup>-1</sup> (phase larvaire)                                                                                  | Golding et al. (2015)      |
| <i>Saccostrea echinata</i>            | AlCl <sub>3</sub>                                            | 48 h               | 1-10 000 µg L <sup>-1</sup>                      | CL <sub>50</sub> = 410 µg L <sup>-1</sup> (phase larvaire)                                                                                  | Golding et al. (2015)      |
| <i>Mytilus edulis</i>                 | Al (Anode) + Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> | 2 mois             | 530 µg L <sup>-1</sup>                           | Plus d'Al dans la glande digestive des moules contaminées (1700 mg kg <sup>-1</sup> ) que celles non contaminées (281 mg kg <sup>-1</sup> ) | Mao et al. (2011)          |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i>      | Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>              | 48 h               | 1,5-15 000 µg L <sup>-1</sup>                    | NOEC = 2,7 µg L <sup>-1</sup> (phase larvaire)                                                                                              | Pagano et al. (1996)       |
| <i>Magallana gigas</i>                | AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O                          | 48 h               | 12 concentrations                                | CL <sub>50</sub> = 195 µg L <sup>-1</sup> (phase larvaire)                                                                                  | Markich (2021)             |
| <i>Saccostrea glomerata</i>           | AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O                          | 48 h               | 12 concentrations                                | CL <sub>50</sub> = 202 µg L <sup>-1</sup> (phase larvaire)                                                                                  | Markich (2021)             |
| <i>Xenostrobus securis</i>            | AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O                          | 48 h               | 12 concentrations                                | CL <sub>50</sub> = 228 µg L <sup>-1</sup> (phase larvaire)                                                                                  | Markich (2021)             |
| <i>Scaechlamys livida</i>             | AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O                          | 48 h               | 12 concentrations                                | CL <sub>50</sub> = 261 µg L <sup>-1</sup> (phase larvaire)                                                                                  | Markich (2021)             |
| <i>Anadara trapezia</i>               | AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O                          | 48 h               | 12 concentrations                                | CL <sub>50</sub> = 291 µg L <sup>-1</sup> (phase larvaire)                                                                                  | Markich (2021)             |
| <i>Fulvia tenuicostata</i>            | AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O                          | 48 h               | 12 concentrations                                | CL <sub>50</sub> = 352 µg L <sup>-1</sup> (phase larvaire)                                                                                  | Markich (2021)             |
| <i>Hiatalia alba</i>                  | AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O                          | 48 h               | 12 concentrations                                | CL <sub>50</sub> = 377 µg L <sup>-1</sup> (phase larvaire)                                                                                  | Markich (2021)             |
| <i>Barnea australasiae</i>            | AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O                          | 48 h               | 12 concentrations                                | CL <sub>50</sub> = 397 µg L <sup>-1</sup> (phase larvaire)                                                                                  | Markich (2021)             |
| <i>Spisula trigonella</i>             | AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O                          | 48 h               | 12 concentrations                                | CL <sub>50</sub> = 460 µg L <sup>-1</sup> (phase larvaire)                                                                                  | Markich (2021)             |
| <i>Irus crenatus</i>                  | AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O                          | 48 h               | 12 concentrations                                | CL <sub>50</sub> = 498 µg L <sup>-1</sup> (phase larvaire)                                                                                  | Markich (2021)             |
| <i>Haliotis tuberculata</i>           | Al naturel                                                   | Terrain            | Echantillonnage sur le terrain                   | Bioaccumulation : 154-393 mg kg <sup>-1</sup> dans la glande digestive                                                                      | Bryan et al. (1977)        |
| <b>Arthropodes</b>                    |                                                              |                    |                                                  |                                                                                                                                             |                            |
| <i>Cancer anthonyi</i>                | AlCl <sub>3</sub>                                            | 7 jours            | 1000-1 000 000 µg L <sup>-1</sup>                | 0% de mortalité à 1000 µg L <sup>-1</sup> , 17,7 % à 10 000 µg L <sup>-1</sup>                                                              | Macdonald et al. (1988)    |
| <i>Nitocras spinipes</i>              | Al <sup>3+</sup>                                             | 96 h               | X                                                | CL <sub>50</sub> = 10 000 µg L <sup>-1</sup>                                                                                                | Bengtsson (1978)           |
| <b>Annélides</b>                      |                                                              |                    |                                                  |                                                                                                                                             |                            |
| <i>Capitella capitata</i>             | AlCl <sub>3</sub>                                            | 96 h-7 jours       | 10-2000 µg L <sup>-1</sup>                       | Aucun effet observé                                                                                                                         | Petrish et al. (1979)      |
| <i>Ctenodrilus serratus</i>           | AlCl <sub>3</sub>                                            | 96 h-7 jours       | 10-2000 µg L <sup>-1</sup>                       | CL <sub>50</sub> = 480 µg L <sup>-1</sup>                                                                                                   | Petrish et al. (1979)      |
| <i>Neanthes arenaceodentata</i>       | AlCl <sub>3</sub>                                            | 96 h-7 jours       | 10-2000 µg L <sup>-1</sup>                       | Aucun effet observé                                                                                                                         | Petrish et al. (1979)      |
| <i>Myxocolia infundibulum</i>         | Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>              | 24 h               | 10-10 000 µg L <sup>-1</sup>                     | 80 % de retrait dans le tube de l'animal à 84 µg L <sup>-1</sup>                                                                            | Ward (1977)                |
| <b>Echinodermes</b>                   |                                                              |                    |                                                  |                                                                                                                                             |                            |
| <i>Heliocidaris tuberculata</i>       | AlCl <sub>3</sub>                                            | 72 h               | 1-10 000 µg L <sup>-1</sup>                      | Aucun effet observé (phase larvaire)                                                                                                        | Golding et al. (2015)      |
| <i>Sphaerechinus granularis</i>       | Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>              | 72 h               | 1,5-15 000 µg L <sup>-1</sup>                    | Diminution dose-dépendante du succès de la fécondation                                                                                      | Pagano et al. (1996)       |
| <i>Paracentrotus lividus</i>          | Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>              | 72 h               | 1,5-15 000 µg L <sup>-1</sup>                    | Peu d'effets observés                                                                                                                       | Pagano et al. (1996)       |
| <i>Psammachinus microtuberculatus</i> | Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>              | 72 h               | 1,5-15 000 µg L <sup>-1</sup>                    | Mortalité larvaire dose dépendante                                                                                                          | Pagano et al. (1996)       |
| <i>Paracentrotus lividus</i>          | Al (Anode) + Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> | 72 h               | 0,1-10 µM<br>(2,7-270 µg L <sup>-1</sup> )       | Al de l'anode plus toxique que l'Al sulfaté sur le taux de fertilisations des spz                                                           | Caplat et al. (2010)       |
| <b>Poissons</b>                       |                                                              |                    |                                                  |                                                                                                                                             |                            |
| <i>Lates calcarifer</i>               | AlCl <sub>3</sub>                                            | 7 jours            | 1-10 000 µg L <sup>-1</sup>                      | Aucun effet observé (phase larvaire)                                                                                                        | Golding et al. (2015)      |
| <i>Acanthochromis polyacanthus</i>    | AlCl <sub>3</sub>                                            | 7 jours            | 1-10 000 µg L <sup>-1</sup>                      | Aucun effet observé (phase larvaire)                                                                                                        | Golding et al. (2015)      |
| <i>Salmo salar</i>                    | Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> 9H <sub>2</sub> O          | 3 semaines         | 350 µg L <sup>-1</sup>                           | +300% taux de glucose, +30% hématocrite, -15% Cl                                                                                            | Poléo et Hytterod (2003)   |
| <i>Salmo salar</i>                    | AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O                          | 2-5 jours          | 86 µg L <sup>-1</sup> + baisse du pH             | Perte de la tolérance à l'eau de mer pendant la phase smolt                                                                                 | Monette et al. (2008)      |
| <i>Salmo salar</i>                    | Terrain                                                      | 75 h               | 129 ± 52 µg L <sup>-1</sup>                      | Aluminium plus toxique dans les eaux mélanges rivière/eau de                                                                                | Teien et al. (2006)        |
| <i>Siganus sutor</i>                  | Terrain                                                      | Terrain            | Terrain                                          | Bioaccumulation nageoires                                                                                                                   | Mziray and Kimirei (2016)  |
| <i>Lethrinus harak</i>                | Terrain                                                      | Terrain            | Terrain                                          | Bioaccumulation : foie, des muscles et nageoires (poisson benthique)                                                                        | Mziray and Kimirei (2016)  |
| <i>Rastrelliger kanagurta</i>         | Terrain                                                      | Terrain            | Terrain                                          | Faible bioaccumulation (poisson pélagique)                                                                                                  | Mziray and Kimirei (2016)  |
| <i>Fundulus similis</i>               | AlCl <sub>3</sub>                                            | 11 jours           | 10-9000 µg L <sup>-1</sup>                       | Aucun effet observé                                                                                                                         | Pulley (1950)              |
| <i>Fundulus grandis</i>               | AlCl <sub>3</sub>                                            | 11 jours           | 10-9000 µg L <sup>-1</sup>                       | Aucun effet observé                                                                                                                         | Pulley (1950)              |
| <i>Cyprinodon variegatus</i>          | AlCl <sub>3</sub>                                            | 11 jours           | 10-9000 µg L <sup>-1</sup>                       | Aucun effet observé                                                                                                                         | Pulley (1950)              |
| <i>Sciaenops ocellatus</i>            | AlCl <sub>3</sub>                                            | 11 jours           | 10-9000 µg L <sup>-1</sup>                       | Aucun effet observé                                                                                                                         | Pulley (1950)              |
| <i>Cynoscion nebulosus</i>            | AlCl <sub>3</sub>                                            | 11 jours           | 10-9000 µg L <sup>-1</sup>                       | Aucun effet observé                                                                                                                         | Pulley (1950)              |
| <b>Cnidaires</b>                      |                                                              |                    |                                                  |                                                                                                                                             |                            |
| <i>Acropora tenuis</i>                | AlCl <sub>3</sub>                                            | 3-18 h             | X                                                | CL <sub>50</sub> = 2997 µg L <sup>-1</sup> (fécondation), CL <sub>50</sub> = 1945 µg L <sup>-1</sup> (métamorphose larvaire)                | Negri et al. (2011)        |
| <b>Algues</b>                         |                                                              |                    |                                                  |                                                                                                                                             |                            |
| Biofilm                               | Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>              | 9 jours            | 1-1000 mg kg <sup>-1</sup><br>(dans le sédiment) | Stimulation de la croissance jusqu'à 10 mg kg <sup>-1</sup> , forte inhibition à partir de 100 mg kg <sup>-1</sup>                          | Leleyter et al. (2016)     |
| Populations naturelles                | AlCl <sub>3</sub>                                            | 10 à 20 jours      | 13,33 µg L <sup>-1</sup>                         | Impact de l'aluminium sur la vitesse de dissolution et la solubilité de la silice                                                           | Van Bennekom et al. (1991) |
| <i>Stephanopyxis turris</i>           | AlCl <sub>3</sub>                                            | 72 h               | 1400-14 000 µg L <sup>-1</sup>                   | Aucun effet observé jusqu'à 2850 µg L <sup>-1</sup>                                                                                         | Machill et al. (2013)      |
| <i>Thalassiosira weissflogii</i>      | AlCl <sub>3</sub>                                            | 2 h                | 266 µg L <sup>-1</sup>                           | Compartmentation de l'aluminium entre les organites dans les cellules algales                                                               | Liu et al. (2019)          |
| <i>Nitzschia closterium</i>           | AlCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O                          | 72 h               | 3-5650 µg L <sup>-1</sup>                        | CL <sub>50</sub> = 190 µg L <sup>-1</sup> (croissance)                                                                                      | Harford et al. (2011)      |
| <i>Minutocellus polymorphus</i>       | AlCl <sub>3</sub>                                            | 72 h               | 1-10 000 µg L <sup>-1</sup>                      | CL <sub>10</sub> = 690 µg L <sup>-1</sup> (croissance)                                                                                      | Golding et al. (2015)      |
| <i>Ceratoneis closterium</i>          | AlCl <sub>3</sub>                                            | 72 h               | 1-10 000 µg L <sup>-1</sup>                      | CL <sub>10</sub> = 18 µg L <sup>-1</sup> (croissance)                                                                                       | Golding et al. (2015)      |
| <i>Minutocellus polymorphus</i>       | AlCl <sub>3</sub>                                            | 72 h               | 10-10 000 µg L <sup>-1</sup>                     | CL <sub>10</sub> = 540 µg L <sup>-1</sup> (croissance)                                                                                      | Gilmore et al. (2016)      |
| <i>Ceratoneis closterium</i>          | AlCl <sub>3</sub>                                            | 72 h               | 10-10 000 µg L <sup>-1</sup>                     | CL <sub>10</sub> = 80 µg L <sup>-1</sup> (croissance)                                                                                       | Gilmore et al. (2016)      |
| <i>Phaeodactylum tricornutum</i>      | AlCl <sub>3</sub>                                            | 72 h               | 10-10 000 µg L <sup>-1</sup>                     | CL <sub>10</sub> = 2100 µg L <sup>-1</sup> (croissance)                                                                                     | Gilmore et al. (2016)      |
| <i>Phaeodactylum tricornutum</i>      | AlCl <sub>3</sub>                                            | 1-6 h              | 6667-26668 µg L <sup>-1</sup>                    | CL <sub>50</sub> = 11 549 µg L <sup>-1</sup> (photosynthèse)                                                                                | Xie et al. (2015)          |
| <i>Dunaliella tertiolecta</i>         | Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> 9H <sub>2</sub> O          | 24 h               | 250-1000 µg L <sup>-1</sup>                      | Bioaccumulation plus forte quand le pH diminue et la [Al] dans l'eau augmente                                                               | Sağın et al. (2001)        |
| <i>Dunaliella tertiolecta</i>         | Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> 9H <sub>2</sub> O          | 24-72 h            | 4000-32000 µg L <sup>-1</sup>                    | CL <sub>25</sub> = 18 160 µg L <sup>-1</sup> (croissance)                                                                                   | Sağın et al. (2007)        |
| <i>Dunaliella tertiolecta</i>         | AlCl <sub>3</sub>                                            | 72 h               | 1-10 000 µg L <sup>-1</sup>                      | CL <sub>10</sub> = 1400 µg L <sup>-1</sup> (croissance)                                                                                     | Golding et al. (2015)      |
| <i>Tetraselmis sp</i>                 | AlCl <sub>3</sub>                                            | 72 h               | 1-10 000 µg L <sup>-1</sup>                      | CL <sub>10</sub> = 3200 µg L <sup>-1</sup> (croissance)                                                                                     | Golding et al. (2015)      |
| <i>Isochrysis galbana</i>             | AlCl <sub>3</sub>                                            | 72 h               | 2000 µg L <sup>-1</sup>                          | CL <sub>50</sub> = 2570 µg L <sup>-1</sup> (croissance)                                                                                     | Trenfield et al. (2015)    |
| <i>Euglena gracilis</i>               | AlCl <sub>3</sub>                                            | 1 h-7 jours        | 500-15000 µg L <sup>-1</sup>                     | Impact sur la photosynthèse à toutes les concentrations                                                                                     | Danilov et al. (2002)      |
| <i>Hormosira banksii</i>              | AlCl <sub>3</sub>                                            | 72 h               | 1-10 000 µg L <sup>-1</sup>                      | Aucun effet observé                                                                                                                         | Golding et al. (2015)      |
| <i>Ecklonia radiata</i>               | AlCl <sub>3</sub>                                            | 72 h               | 1-10 000 µg L <sup>-1</sup>                      | Diminution du taux germination des embryons à des concentrations > 2000 µg L <sup>-1</sup>                                                  | Golding et al. (2015)      |

Annexe 3 : Tableau de synthèse des concentrations en zinc mesurées dans les eaux côtières et dans le plein océan. AAS = Atomic absorption spectrophotometry. ICP-AES = inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. ICP-MS = inductively coupled plasma mass spectroscopy. CSV = Cathodic stripping voltammetry.

| Site                                                  | Technique de dosage | Zinc dissous ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | Référence                |
|-------------------------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| <b>Eaux côtières</b>                                  |                     |                                       |                          |
| Baie de Poole Harbour (Sud de l'Angleterre)           | AAS                 | 13,2-23                               | Bird et al. (1996)       |
| Manche - Milford Haven (Angleterre)                   | NA                  | 6,06                                  | Sheahan et al. (2007)    |
| Estuaire de Southampton Water (Angleterre)            | NA                  | 4                                     | Sheahan et al. (2007)    |
| Cap Bon (Tunisie)                                     | AAS                 | 7,39-0,34                             | Zaidi et al. (2022)      |
| Chebba (Tunisie)                                      | AAS                 | 3,64-0,45                             | Zaidi et al. (2022)      |
| Port commercial de Gabes (Tunisie)                    | AAS                 | 5,31-0,31                             | Zaidi et al. (2022)      |
| Kerkennah (Tunisie)                                   | AAS                 | 12,62-0,29                            | Zaidi et al. (2022)      |
| Mer Tyrrhénienne                                      | ICP-AES             | 0,54-6,70                             | Ciceri et al. (1992)     |
| Zones côtières en Angleterre                          | AAS                 | 0,22-2,10                             | Law et al. (1994)        |
| Estuaires en Angleterre                               | AAS                 | 0,43-22                               | Law et al. (1994)        |
| Golfe du Mexique                                      | AAS                 | 5                                     | Trefry et al. (1996)     |
| Baie de Galveston (États-Unis)                        | AAS                 | 0,30-4,50                             | Morse et al. (1993)      |
| Estuaire de Savannah (États-Unis)                     | NA                  | 0,20-1,44                             | Sung (1995)              |
| Baie de Narragansett (États-Unis)                     | AAS                 | 0,43-3,66                             | Muller & Kester (1991)   |
| Port Jackson (Australie)                              | ICP-AES             | 9-38                                  | Jahan et Strezov (s2017) |
| Port Botany (Australie)                               | ICP-AES             | 4-25                                  | Jahan et Strezov (2017)  |
| Port New Castle (Australie)                           | ICP-AES             | 1-2                                   | Jahan et Strezov (2017)  |
| Port Yamba (Australie)                                | ICP-AES             | 11-35                                 | Jahan et Strezov (2017)  |
| Port Eden (Australie)                                 | ICP-AES             | 1-29                                  | Jahan et Strezov (2017)  |
| Baie de Jinzhou (Chine)                               | AAS                 | 56,55                                 | Wan et al. (2008)        |
| Estuaire de la rivière Derwent (Tasmanie – Australie) | NA                  | 1500                                  | Bloom et Ayling (1977)   |
| Baie de Sepetiba (Brésil)                             | ICP-AAS             | 1800                                  | Barcellos (1995)         |
| Ulsan (Corée du Sud)                                  | ICP-MS              | 6980                                  | Jeong et al. (2019)      |
| <b>Plein Océan</b>                                    |                     |                                       |                          |
| Eaux de surface de l'Atlantique Nord                  | AAS                 | 0,006-0,118                           | Pohl et al. (1993)       |
| Atlantique Nord Est                                   | CSV                 | 0,011-0,13                            | Ellwood et al. (2000)    |
| Mer du Groenland                                      | AAS                 | 0,033-0,36                            | Pohl et al. (1993)       |
| Mer de Weddell et Mer de Scotia                       | AAS                 | 0,090-0,091                           | Nolting et al. (1994)    |
| Antarctique                                           | AAS                 | 0,085-0,71                            | Löscher (1999)           |
| Eaux de surface du Pacifique Nord                     | AAS                 | 0,015                                 | Bruland et al. (1994)    |
| Eaux profondes du Pacifique Nord                      | AAS                 | 0,523                                 | Bruland et al. (1994)    |
| Mer du Nord                                           | AAS                 | 0,11-2,20                             | Laslett (1995)           |
| Manche                                                | ICP-AES et AAS      | 0,16-0,61                             | Statham et al. (1999)    |

## Annexe 4 : Synthèse des études de toxicité réalisées en laboratoire sur l'impact du zinc chez les organismes marins.

| Espèce                               | Forme de zinc                             | Temps d'exposition | Concentrations testées                                   | Principaux résultats                                                                                                       | Référence                        |
|--------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <b>Mollusques</b>                    |                                           |                    |                                                          |                                                                                                                            |                                  |
| <i>Crassostrea gigas</i>             | Zn (Anode galvanique)                     | 10 & 1 semaine     | 530 + 10 200 µg L <sup>-1</sup>                          | 10 200 µg L <sup>-1</sup> : 80 % de mortalité + inhibition immunité                                                        | Mottin et al. (2012)             |
| <i>Crassostrea gigas</i>             | ZnSO <sub>4</sub>                         | 5-10 jours         | 25-500 µg L <sup>-1</sup>                                | Baisse de la croissance et de la fixation des larves                                                                       | Boyden et al. (1975)             |
| <i>Crassostrea gigas</i>             | ZnSO <sub>4</sub>                         | 5 jours            | 50-500 µg L <sup>-1</sup>                                | Effets sur le dvlp à partir de 100 µg L <sup>-1</sup>                                                                      | Brereton et al. (1973)           |
| <i>Crassostrea gigas</i>             | ZnCl <sub>2</sub>                         | 10 semaines        | 220-2000 µg L <sup>-1</sup>                              | CL <sub>50</sub> = 497 µg L <sup>-1</sup> (naissain)                                                                       | Devos et al. (2012)              |
| <i>Crassostrea virginica</i>         | ZnCl <sub>2</sub>                         | 48 h               | 0-200 µg L <sup>-1</sup>                                 | CL <sub>50</sub> = 205 µg L <sup>-1</sup> (larves)                                                                         | MacInnes et al. (1980)           |
| <i>Crassostrea virginica</i>         | ZnCl <sub>2</sub>                         | 42-48 h            | X                                                        | CL <sub>50</sub> = 310 µg L <sup>-1</sup> (larves)                                                                         | Calabrese et al. (1973)          |
| <i>Crassostrea gigas</i>             | X                                         | 4 jours            | 10-100 µg L <sup>-1</sup>                                | CL <sub>50</sub> (larves de 6 jours) = 80 µg L <sup>-1</sup> CL <sub>50</sub> (larves de 16 jours) = 95 µg L <sup>-1</sup> | Watling (1982)                   |
| <i>Saccostrea cucullata</i>          | X                                         | 4 jours            | 10-100 µg L <sup>-1</sup>                                | CL <sub>50</sub> (larves de 3 jours) = 45 µg L <sup>-1</sup> CL <sub>50</sub> (larves de 13 jours) = 85 µg L <sup>-1</sup> | Watling (1982)                   |
| <i>Striostrea margaritacea</i>       | X                                         | 4 jours            | 10-100 µg L <sup>-1</sup>                                | CL <sub>50</sub> (larves de 3 jours) = 50 µg L <sup>-1</sup> CL <sub>50</sub> (larves de 13 jours) = 85 µg L <sup>-1</sup> | Watling (1982)                   |
| <i>Crassostrea gigas</i>             | Zn environmental                          | 10 mois            | 0,3-25 µg L <sup>-1</sup>                                | Bioacc = 730 µg g <sup>-1</sup>                                                                                            | Baudrimont et al. (2005)         |
| <i>Cerastoderma edule</i>            | Zn environmental                          | 10 mois            | 0,3-25 µg L <sup>-1</sup>                                | Bioacc < 100 µg g <sup>-1</sup>                                                                                            | Baudrimont et al. (2005)         |
| <i>Ruditapes philippinarum</i>       | Zn environmental                          | 10 mois            | 0,3-25 µg L <sup>-1</sup>                                | Bioacc < 100 µg g <sup>-1</sup>                                                                                            | Baudrimont et al. (2005)         |
| <i>Crassostrea gigas</i>             | ZnSO <sub>4</sub>                         | 48 h               | X                                                        | CL <sub>50</sub> = 119 µg L <sup>-1</sup> (larves)                                                                         | Martin et al. (1981)             |
| <i>Mytilus edulis</i>                | ZnSO <sub>4</sub>                         | 48 h               | X                                                        | CL <sub>50</sub> = 175 µg L <sup>-1</sup> (larves)                                                                         | Martin et al. (1981)             |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i>     | ZnSO <sub>4</sub>                         | 48 h               | 46-918 µg L <sup>-1</sup>                                | CL <sub>50</sub> = 172 µg L <sup>-1</sup> (larves)                                                                         | Nadella et al. (2013)            |
| <i>Mytilus trossulus</i>             | ZnSO <sub>4</sub>                         | 48 h               | 46-918 µg L <sup>-1</sup>                                | CL <sub>50</sub> = 135 µg L <sup>-1</sup> (larves)                                                                         | Nadella et al. (2013)            |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i>     | Zn <sup>2+</sup>                          | X                  | 15-65 µg L <sup>-1</sup>                                 | Inhibition de l'activité de la Ca <sup>2+</sup> ATPase                                                                     | Viarengo et al. (1993)           |
| <i>Mytilus edulis</i>                | X                                         | 4-16 jours         | 50-5000 µg L <sup>-1</sup>                               | CL <sub>50</sub> = 5000 µg L <sup>-1</sup> (adultes)                                                                       | Amiard-Triquet et al. (1986)     |
| <i>Perna viridis</i>                 | X                                         | 48 h               | 100-4000 µg L <sup>-1</sup>                              | CL <sub>50</sub> = 2310 µg L <sup>-1</sup> (adultes)                                                                       | D'Silva et Kureishy (1978)       |
| <i>Perna perna</i>                   | ZnCl <sub>2</sub>                         | 48 h               | 1360-13 600 µg L <sup>-1</sup>                           | Inhibition de la glutathion réductase aux plus fortes concentrations                                                       | Franco et al. (2006)             |
| <i>Perna viridis</i>                 | ZnSO <sub>4</sub>                         | 21 jours           | 11-3162 µg L <sup>-1</sup>                               | CL <sub>50</sub> = 6090 µg L <sup>-1</sup> (adultes)                                                                       | Chan et al. (1988)               |
| <i>Cerastoderma edule</i>            | ZnSO <sub>4</sub>                         | 48 h               | 100-1 000 000 µg L <sup>-1</sup>                         | CL <sub>50</sub> = 100 000 µg L <sup>-1</sup> (adultes)                                                                    | Portmann (1968)                  |
| <i>Scrobicularia plana</i>           | Zn <sup>2+</sup>                          | 2 h                | 3 269-65 390 µg L <sup>-1</sup>                          | Inhibition activité phosphatase dans les branchies                                                                         | Mazorra et al. (2002)            |
| <i>Magallana gigas</i>               | ZnCl <sub>2</sub>                         | 48 h               | 12 concentrations                                        | CL <sub>50</sub> = 46 µg L <sup>-1</sup> (larves)                                                                          | Markich (2021)                   |
| <i>Saccostrea glomerata</i>          | ZnCl <sub>2</sub>                         | 48 h               | 12 concentrations                                        | CL <sub>50</sub> = 48,8 µg L <sup>-1</sup> (larves)                                                                        | Markich (2021)                   |
| <i>Xenostrobus securis</i>           | ZnCl <sub>2</sub>                         | 48 h               | 12 concentrations                                        | CL <sub>50</sub> = 61,6 µg L <sup>-1</sup> (larves)                                                                        | Markich (2021)                   |
| <i>Scaevola clausi</i>               | ZnCl <sub>2</sub>                         | 48 h               | 12 concentrations                                        | CL <sub>50</sub> = 65,4 µg L <sup>-1</sup> (larves)                                                                        | Markich (2021)                   |
| <i>Anadara trapezia</i>              | ZnCl <sub>2</sub>                         | 48 h               | 12 concentrations                                        | CL <sub>50</sub> = 83,9 µg L <sup>-1</sup> (larves)                                                                        | Markich (2021)                   |
| <i>Fulvia tenuicostata</i>           | ZnCl <sub>2</sub>                         | 48 h               | 12 concentrations                                        | CL <sub>50</sub> = 104 µg L <sup>-1</sup> (larves)                                                                         | Markich (2021)                   |
| <i>Hiattula alba</i>                 | ZnCl <sub>2</sub>                         | 48 h               | 12 concentrations                                        | CL <sub>50</sub> = 124 µg L <sup>-1</sup> (larves)                                                                         | Markich (2021)                   |
| <i>Barnea australasiae</i>           | ZnCl <sub>2</sub>                         | 48 h               | 12 concentrations                                        | CL <sub>50</sub> = 152 µg L <sup>-1</sup> (larves)                                                                         | Markich (2021)                   |
| <i>Spisula trigonella</i>            | ZnCl <sub>2</sub>                         | 48 h               | 12 concentrations                                        | CL <sub>50</sub> = 172 µg L <sup>-1</sup> (larves)                                                                         | Markich (2021)                   |
| <i>Irus crenatus</i>                 | ZnCl <sub>2</sub>                         | 48 h               | 12 concentrations                                        | CL <sub>50</sub> = 190 µg L <sup>-1</sup> (larves)                                                                         | Markich (2021)                   |
| <i>Mya arenaria</i>                  | ZnCl <sub>2</sub>                         | 18 h               | 0,13-136 000 µg L <sup>-1</sup>                          | Effet hormétique, 130 µg L <sup>-1</sup> : activité de phagocyttaire diminuée                                              | Brousseau et al. (1999)          |
| <i>Haliotis tuberculata</i>          | ZnO                                       | 3 mois             | 200-800 µg L <sup>-1</sup>                               | Forte mortalité à 800 µg L <sup>-1</sup>                                                                                   | Basuyaux (1997)                  |
| <i>Haliotis tuberculata</i>          | ZnCl <sub>2</sub>                         | 24 h               | 1360-136 000 µg L <sup>-1</sup>                          | CL <sub>50</sub> = 42 796 µg L <sup>-1</sup>                                                                               | Mottin et al. (2010)             |
| <i>Haliotis tuberculata</i>          | Zn naturel                                | Terrain            | Terrain                                                  | Bioaccumulation (28 à 656 mg kg <sup>-1</sup> ) : pied, viscères, glande digestive                                         | Bryan et al. (1977)              |
| <i>Potamopyrgus jenkinsi</i>         | ZnCl <sub>2</sub>                         | 1 semaine          | 75-400 µg L <sup>-1</sup>                                | CL <sub>50</sub> = 103 µg L <sup>-1</sup> NOEC = 50-75 µg L <sup>-1</sup>                                                  | Dorgelo et al. (1995)            |
| <i>Littorina obtusata</i>            | <sup>65</sup> Zn                          | 50 jours           | 1 µCi L <sup>-1</sup>                                    | Absorption de Zn plus importante à partir de l'eau que de l'alimentation                                                   | Young (1975)                     |
| <i>Sepia officinalis</i>             | <sup>65</sup> Zn                          | 29 jours           | Proies exposées à 6 kBq <sup>65</sup> Zn L <sup>-1</sup> | Nourriture = principale voie de bioaccumulation du Zn                                                                      | Bustamante et al. (2002)         |
| <i>Sepia officinalis</i>             | ZnCl <sub>2</sub>                         | 2 & 5 semaines     | 50-200 µg L <sup>-1</sup> + 250-1500 µg L <sup>-1</sup>  | Seuil mortalité entre 185-230 µg L <sup>-1</sup>                                                                           | Le Pabic et al. (2015)           |
| <b>Arthropodes</b>                   |                                           |                    |                                                          |                                                                                                                            |                                  |
| <i>Nitocra spinipes</i>              | Zn <sup>2+</sup>                          | 96 h               | X                                                        | CL <sub>50</sub> = 1450 µg L <sup>-1</sup> (adultes)                                                                       | Bengtsson (1978)                 |
| <i>Paragrapsus quadridentatus</i>    | ZnCl <sub>2</sub>                         | 96 h               | 800-2900 µg L <sup>-1</sup>                              | CL <sub>50</sub> = 1230 µg L <sup>-1</sup> (larves)                                                                        | Ahsanullah et al. (1978)         |
| <i>Cancer magister</i>               | ZnSO <sub>4</sub>                         | 96 h               | X                                                        | CL <sub>50</sub> = 456 µg L <sup>-1</sup> (larves)                                                                         | Martin et al. (1981)             |
| <i>Carcinus maenas</i>               | ZnSO <sub>4</sub>                         | 48 h               | 100-1 000 000 µg L <sup>-1</sup>                         | CL <sub>50</sub> = 10 000 µg L <sup>-1</sup> (adultes)                                                                     | Portmann (1968)                  |
| <i>Pandalus montagui</i>             | ZnSO <sub>4</sub>                         | 48 h               | 100-1 000 000 µg L <sup>-1</sup>                         | CL <sub>50</sub> = 12 000 µg L <sup>-1</sup> (adultes)                                                                     | Portmann (1968)                  |
| <i>Crangon crangon</i>               | ZnSO <sub>4</sub>                         | 48 h               | 100-1 000 000 µg L <sup>-1</sup>                         | CL <sub>50</sub> = 100 000 µg L <sup>-1</sup> (adultes)                                                                    | Portmann (1968)                  |
| <i>Rhithropanopeus harrisii</i>      | Zn <sup>2+</sup>                          | 16 jours           | 0-50 µg L <sup>-1</sup>                                  | Retard dvlp larvaire à 50 µg L <sup>-1</sup>                                                                               | Benijts-Claus and Benijts (1975) |
| <i>Palaemon elegans</i>              | Zn <sup>2+</sup>                          | 96 h               | 1000-50 000 µg L <sup>-1</sup>                           | Baisse du nombre d'hémocytes                                                                                               | Lorenzon et al. (2001)           |
| <i>Palaemon elegans</i>              | ZnCl <sub>2</sub>                         | 96 h               | 1000-50 000 µg L <sup>-1</sup>                           | CL <sub>50</sub> (96h) = 26 300 µg L <sup>-1</sup> (adultes)                                                               | Lorenzon et al. (2000)           |
| <i>Charybdis japonica</i>            | Zn <sup>2+</sup>                          | 40 min             | 326 000 µg L <sup>-1</sup>                               | Inhibition de la phénoloxydase                                                                                             | Liu et al. (2006)                |
| <i>Tigriopus japonicus</i>           | nZnO & ZnO                                | 96 h               | 4000-40 000 µg L <sup>-1</sup>                           | CL <sub>50</sub> (nZnO) = 850 µg L <sup>-1</sup> , CL <sub>50</sub> (ZnO) = 430 µg L <sup>-1</sup>                         | Wong et al. (2010)               |
| <i>Elasmopus rapax</i>               | nZnO & ZnO                                | 96 h               | 4000-40 000 µg L <sup>-1</sup>                           | CL <sub>50</sub> (nZnO) = 1190 µg L <sup>-1</sup> , CL <sub>50</sub> (ZnO) = 370 µg L <sup>-1</sup>                        | Wong et al. (2010)               |
| <i>Acartia tonsa</i>                 | ZnCl <sub>2</sub>                         | 96 h               | 0,0013-13 µg L <sup>-1</sup>                             | Taux de ponte affecté dès 0,13 µg L <sup>-1</sup> + 100% de mortalité des nauplii à 13 µg L <sup>-1</sup>                  | Sunda et al. (1987)              |
| <b>Annélides</b>                     |                                           |                    |                                                          |                                                                                                                            |                                  |
| <i>Myxicola infundibulum</i>         | ZnCl <sub>2</sub>                         | 24 h               | 10-10 000 µg L <sup>-1</sup>                             | 80 % de retrait dans le tube de l'animal à 65 µg L <sup>-1</sup>                                                           | Ward (1977)                      |
| <b>Echinodermes</b>                  |                                           |                    |                                                          |                                                                                                                            |                                  |
| <i>Paracentrotus lividus</i>         | ZnSO <sub>4</sub> + Zn (Anode galvanique) | 72 h               | 6.5-653 µg L <sup>-1</sup>                               | Zn (Anode) moins toxique que le ZnSO <sub>4</sub>                                                                          | Caplat et al. (2010)             |
| <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | ZnSO <sub>4</sub>                         | 72 h               | 83-1374 µg L <sup>-1</sup>                               | CL <sub>50</sub> = 151 µg L <sup>-1</sup> (larves)                                                                         | Nadella et al. (2013)            |
| <i>Arbacia lixula</i>                | ZnCl <sub>2</sub>                         | 96 h               | 10-10 000 µg L <sup>-1</sup>                             | Spz moins mobiles et moins d'œufs fécondés 10 µg L <sup>-1</sup>                                                           | Castagna et al. (1981)           |
| <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | ZnSO <sub>4</sub>                         | 96 h               | 106 µg L <sup>-1</sup>                                   | Inhibition de l'absorption de calcium                                                                                      | Tellis et al. (2014)             |
| <b>Tuniciers</b>                     |                                           |                    |                                                          |                                                                                                                            |                                  |
| <i>Styela plicata</i>                | ZnSO <sub>4</sub>                         | 72 h               | 1-1000 µg L <sup>-1</sup>                                | Aucun effet observé                                                                                                        | Tujula et al. (2001)             |

| Poissons                         |                   |              |                                   |                                                                                                      |                                |
|----------------------------------|-------------------|--------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| <i>Gambusia affinis</i>          | <sup>65</sup> Zn  | 120 jours    | 653 µg L <sup>-1</sup>            | Alimentation = 78-82% de l'accumulation de Zn                                                        | Willis et Sunda (1984)         |
| <i>Leiostomus xanthurus</i>      | <sup>65</sup> Zn  | 120 jours    | 653 µg L <sup>-1</sup>            | Alimentation = 78-82% de l'accumulation de Zn                                                        | Willis et Sunda (1984)         |
| 49 espèces de Méditerranée       | Terrain           | Terrain      | Terrain                           | Bioaccumulation de 2,82 à 9,73 µg g <sup>-1</sup>                                                    | Celik et Oehlenschläger (2005) |
| <i>Pleuronectes platessa</i>     | ZnSO <sub>4</sub> | 7 jours      | Injection dans le foie            | Augmentation des niveaux de métallothionéines                                                        | Overnell et al. (1987)         |
| <i>Siganus sutor</i>             | Terrain           | Terrain      | Terrain                           | Peu de bioaccumulation au niveau des muscles                                                         | Mziray and Kimirei (2016)      |
| <i>Lethrinus harak</i>           | Terrain           | Terrain      | Terrain                           | Beaucoup de bioaccumulation dans le foie                                                             | Mziray and Kimirei (2016)      |
| <i>Rostrelliger kanagurta</i>    | Terrain           | Terrain      | Terrain                           | Faible bioaccumulation de zinc                                                                       | Mziray and Kimirei (2016)      |
| <i>Sardinella aurita</i>         | Terrain           | Terrain      | Terrain                           | Faible bioaccumulation (poisson pélagique)                                                           | Roméo et al. (1999)            |
| <i>Scomber japonicus</i>         | Terrain           | Terrain      | Terrain                           | Faible bioaccumulation (poisson pélagique)                                                           | Roméo et al. (1999)            |
| <i>Trachurus trachurus</i>       | Terrain           | Terrain      | Terrain                           | Faible bioaccumulation (poisson pélagique)                                                           | Roméo et al. (1999)            |
| <i>Serranus scriba</i>           | Terrain           | Terrain      | Terrain                           | Bioaccumulation au niveau du foie                                                                    | Roméo et al. (1999)            |
| <i>Epinephelus costae</i>        | Terrain           | Terrain      | Terrain                           | Bioaccumulation surtout au niveau du foie                                                            | Roméo et al. (1999)            |
| <i>Cephalopholis nigri</i>       | Terrain           | Terrain      | Terrain                           | Bioaccumulation au niveau du foie et des branchies                                                   | Roméo et al. (1999)            |
| <i>Pseudupeneus prayensis</i>    | Terrain           | Terrain      | Terrain                           | Bioaccumulation au niveau du foie et des branchies                                                   | Roméo et al. (1999)            |
| <i>Oryzias melastigma</i>        | ZnO               | 5-20 jours   | 100-10 000 µg L <sup>-1</sup>     | Augmentation de la mortalité et de la fréquence cardiaque                                            | Cong et al. (2017)             |
| <i>Oryzias melastigma</i>        | nZnO              | 96 h         | 4000-40000 µg L <sup>-1</sup>     | Augmentation des niveaux de métallothionéines et de la superoxyde dismutase                          | Wong et al. (2010)             |
| Algues                           |                   |              |                                   |                                                                                                      |                                |
| <i>Thalassiosira pseudonana</i>  | nZnO              | 96 h         | 4000-40000 µg L <sup>-1</sup>     | Cl <sub>50</sub> (nZnO) = 4560 µg L <sup>-1</sup> , Cl <sub>50</sub> (ZnO) = 6650 µg L <sup>-1</sup> | Wong et al. (2010)             |
| <i>Skeletonema costatum</i>      | nZnO              | 96 h         | 4000-40000 µg L <sup>-1</sup>     | Cl <sub>50</sub> (nZnO) = 2360 µg L <sup>-1</sup> , Cl <sub>50</sub> (ZnO) = 2970 µg L <sup>-1</sup> | Wong et al. (2010)             |
| <i>Nitzschia closterium</i>      |                   | 27-72 h      | 100-500 µg L <sup>-1</sup>        | Cl <sub>50</sub> = 65 µg/L mais pas d'effet sur la photosynthèse à 500 µg L <sup>-1</sup>            | Stauber et Florence (1990)     |
| <i>Thalassiosira pseudonana</i>  | Zn <sup>2+</sup>  | 6 jours      | X                                 | Carence en zinc = diminution de la capacité de production de silice                                  | Ellwood et al. (2000)          |
| <i>Stephanodiscus hantzschii</i> | Zn <sup>2+</sup>  | X            | 6,5-65 µg L <sup>-1</sup>         | Zn incorporé dans le frustule (en compétition avec Mn)                                               | Jaccard et al. (2009)          |
| <i>Chaetoceros calcitrans</i>    | ZnSO <sub>4</sub> | 96 h-7 jours | 80-1240 µg L <sup>-1</sup>        | Cl <sub>50</sub> = 1240 µg L <sup>-1</sup>                                                           | Anu et al. (2018)              |
| <i>Thalassiosira weissflogii</i> | ZnSO <sub>4</sub> | 96 h-7 jours | 80-520 µg L <sup>-1</sup>         | Cl <sub>50</sub> = 520 µg L <sup>-1</sup>                                                            | Anu et al. (2018)              |
| <i>Thalassiosira weissflogii</i> |                   | X            | X                                 | Carence en zinc = diminution de la capacité de production de silice                                  | Christina et al. (2000)        |
| <i>Thalassiosira weissflogii</i> | <sup>65</sup> Zn  | X            | X                                 | Croissance limitée en dessous de 0,0006 µg L <sup>-1</sup>                                           | Sunda et Huntsman (1992)       |
| <i>Thalassiosira pseudonana</i>  | <sup>65</sup> Zn  | X            | X                                 | Croissance limitée en dessous de 0,0006 µg L <sup>-1</sup>                                           | Sunda et Huntsman (1992)       |
| <i>Thalassiosira oceanica</i>    | <sup>65</sup> Zn  | X            | X                                 | Croissance limitée en dessous de 0,00006 µg L <sup>-1</sup>                                          | Sunda et Huntsman (1992)       |
| <i>Emiliania huxleyi</i>         | <sup>65</sup> Zn  | X            | X                                 | Croissance limitée en dessous de 0,00006 µg L <sup>-1</sup>                                          | Sunda et Huntsman (1992)       |
| <i>Scenedesmu ssp</i>            | ZnCl <sub>2</sub> | 4 h          | 327-6538 µg L <sup>-1</sup>       | La concentration en proline augmente proportionnellement à celle du zinc (effet protecteur)          | Tripathi et Gaur (2004)        |
| <i>Scenedesmus obliquus</i>      | ZnCl <sub>2</sub> | 96 h         | 1000-45000 µg L <sup>-1</sup>     | Cl <sub>50</sub> = 16990 µg L <sup>-1</sup>                                                          | Monteiro et al. (2011)         |
| <i>Desmodesmus pleiomorphus</i>  | ZnCl <sub>2</sub> | 96 h         | 1000-45000 µg L <sup>-1</sup>     | Cl <sub>50</sub> = 4870 µg L <sup>-1</sup>                                                           | Monteiro et al. (2011)         |
| <i>Chlorella marina</i>          | ZnCl <sub>2</sub> | 15 jours     | 5000-1 500 000 µg L <sup>-1</sup> | Limite de croissance à 50 000 µg L <sup>-1</sup>                                                     | Dinesh et al. (2014)           |
| <i>Dunaliella salina</i>         | ZnCl <sub>2</sub> | 15 jours     | 5000-1 500 000 µg L <sup>-1</sup> | Arrêt de croissance au-delà de 5 000 µg L <sup>-1</sup>                                              | Dinesh et al. (2014)           |
| <i>Nannochloropsis</i>           | ZnCl <sub>2</sub> | 15 jours     | 5000-1 500 000 µg L <sup>-1</sup> | Limite de croissance à 50 000 µg L <sup>-1</sup>                                                     | Dinesh et al. (2014)           |
| <i>Tetraselmis</i>               | ZnCl <sub>2</sub> | 15 jours     | 5000-1 500 000 µg L <sup>-1</sup> | Croissance jusqu'à 250 000 µg L <sup>-1</sup>                                                        | Dinesh et al. (2014)           |
| <i>Isochrysis galbana</i>        | ZnCl <sub>2</sub> | 15 jours     | 5000-1 500 000 µg L <sup>-1</sup> | Limite de croissance à 50 000 µg L <sup>-1</sup>                                                     | Dinesh et al. (2014)           |
| <i>Ulva lactuca</i>              | ZnSO <sub>4</sub> | 21 jours     | 10-5000 µg L <sup>-1</sup>        | 100 % de mortalité à 1000 µg L <sup>-1</sup>                                                         | Amado et al. (1997)            |
| <i>Enteromorpha flexuosa</i>     | ZnSO <sub>4</sub> | 21 jours     | 10-5000 µg L <sup>-1</sup>        | 100 % de mortalité à 1000 µg L <sup>-1</sup>                                                         | Amado et al. (1997)            |
| <i>Padina gymnospora</i>         | ZnSO <sub>4</sub> | 21 jours     | 10-5000 µg L <sup>-1</sup>        | 100 % de mortalité à 5000 µg L <sup>-1</sup>                                                         | Amado et al. (1997)            |
| <i>Sargassum filipendula</i>     | ZnSO <sub>4</sub> | 21 jours     | 10-5000 µg L <sup>-1</sup>        | 100 % de mortalité à 5000 µg L <sup>-1</sup>                                                         | Amado et al. (1997)            |
| <i>Hypnea musciformis</i>        | ZnSO <sub>4</sub> | 21 jours     | 10-5000 µg L <sup>-1</sup>        | 100 % de mortalité à 100 µg L <sup>-1</sup>                                                          | Amado et al. (1997)            |
| <i>Spyridia filamentosa</i>      | ZnSO <sub>4</sub> | 21 jours     | 10-5000 µg L <sup>-1</sup>        | 100 % de mortalité à 5000 µg L <sup>-1</sup>                                                         | Amado et al. (1997)            |
| <i>Fucus serratus</i>            | <sup>65</sup> Zn  | 100 jours    | 1 µCi/L                           | Bioaccumulation rapide de zinc (pas de détoxification dans l'eau non contaminée)                     | Young (1975)                   |
| <i>Enteromorpha ssp</i>          | ZnSO <sub>4</sub> | 10 jours     | 100-200 µg L <sup>-1</sup>        | Grosse diminution du rapport redox du glutathion                                                     | Malea et al. (2006)            |
| <i>Hypnea musciformis</i>        | ZnSO <sub>4</sub> | 21 jours     | 10-5000 µg L <sup>-1</sup>        | 100 % de mortalité à 100 µg L <sup>-1</sup>                                                          | Amado et al. (1997)            |
| <i>Spyridia filamentosa</i>      | ZnSO <sub>4</sub> | 21 jours     | 10-5000 µg L <sup>-1</sup>        | 100 % de mortalité à 5000 µg L <sup>-1</sup>                                                         | Amado et al. (1997)            |
| <i>Fucus serratus</i>            | <sup>65</sup> Zn  | 100 jours    | 1 µCi/L                           | Bioaccumulation rapide de zinc (pas de détoxification dans l'eau non contaminée)                     | Young (1975)                   |
| <i>Enteromorpha ssp</i>          | ZnSO <sub>4</sub> | 10 jours     | 100-200 µg L <sup>-1</sup>        | Grosse diminution du rapport redox du glutathion                                                     | Malea et al. (2006)            |

## Annexe 5 : Rapport d'activité du programme RIN ECUME

### **AXE 4 : Influence des paramètres abiotiques et biotiques sur la composante « huître » de l'écosystème.**

Rédacteurs : **A. Levallois**, K. Costil, C. Caplat, A. Serpentine

#### ***Axe 4a : Analyser l'impact des contaminants d'origine anthropique au niveau de traits de vie des organismes***

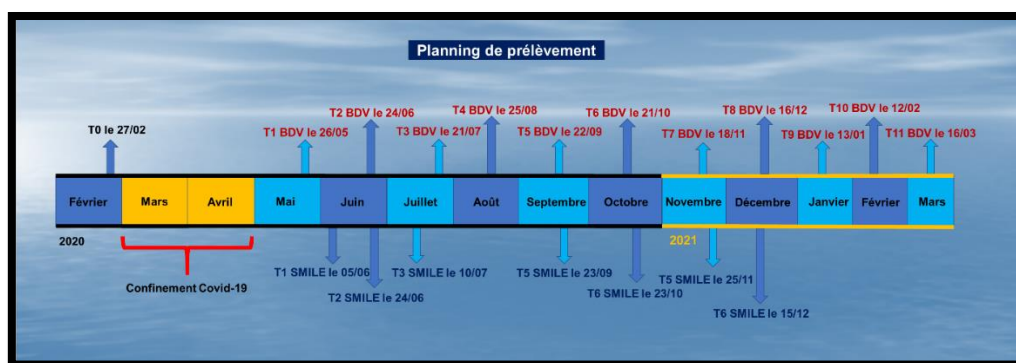
Ce travail de biosurveillance active de deux écosystèmes marins est organisé grâce à des prélèvements mensuels d'huîtres placées, d'une part, dans une cage localisée sous la bouée SMILE et, d'autre part, dans la zone ostréicole en Baie des Veys (BDV). Ces huîtres provenaient d'un même lot d'huîtres de demi-élevage qui a été réparti pour moitié sous la bouée SMILE et en BDV. L'objectif est d'évaluer l'état général (état physiologique) des huîtres et de tenter de faire le lien entre la bioaccumulation des métaux et les paramètres physiologiques (paramètres immunitaires, reproduction, réserves énergétiques).

Pour chaque prélèvement, différents paramètres biologiques ont été étudiés : les paramètres biométriques (croissance) et les indices de condition (taux de remplissage des coquilles par la chair), les paramètres immunitaires (activité phagocytaire, niveau des ROS, état des membranes lysosomales), les réserves énergétiques (teneur en glycogène, indices BRIX et glucose) et le stress oxydant (malondialdéhyde). Intégrant également l'axe 1 (partie chimie), nous étudions aussi, dans l'ensemble des tissus, la bioaccumulation des métaux : constituants d'anodes galvaniques (aluminium et zinc) ainsi que les éléments traces et majeurs de l'eau (cuivre, cadmium, magnésium, calcium ...). Les dosages sont effectués par ICP-MS sur la plateforme de la SFR ICORE PLATIN.

#### **● Méthodologie**

Pour chaque date d'échantillonnage, les huîtres ont été récupérées à Port en Bessin pour le site BDV (prélèvements effectués par l'IFREMER de Port-en-Bessin) ou à Luc-sur-Mer pour le site SMILE (embarquements à partir du CREC) selon le planning suivant (figure 35).





**Fig. 35 :** Planning des prélèvements des huîtres sur les sites de la baie des Veys et de la bouée SMILE.

Suite aux prélèvements, les huîtres sont généralement acclimatées une nuit dans un incubateur (eau à température du site et bullage) mais cela n'a pas toujours été possible en raison de l'heure des marées et/ou de la disponibilité des personnes. Dans un premier temps, chaque huître est grattée et nettoyée pour enlever le *fouling* biologique quand celui-ci est présent. Chaque huître est ensuite pesée et mesurée (longueur, largeur, épaisseur). Les huîtres sont séparées en trois séries. Pour les 12 premières (série 1), un prélèvement de l'hémolymphes dans le muscle adducteur postérieur est réalisé à l'aide d'une seringue pour l'étude des paramètres immunitaires. L'huître est ensuite ouverte et disséquée (Figure 36). Pour un même individu différents organes (ou parties d'organes) sont isolés pour divers dosages et biomarqueurs. Ainsi, les branchies sont prélevées en premier (dosage du malondialdéhyde, MDA, produit final de la peroxydation lipidique). Après découpe longitudinale et symétrique de l'individu, la glande digestive est isolée d'un côté (dosage du MDA dans cet organe). Le reste de la même coupe est alors utilisée pour le dosage du glycogène. Dans l'autre moitié longitudinale, une coupe transversale est effectuée en son centre puis placée dans une cassette histologique pour y être fixée pendant 24h dans le fixateur Davidson avant passage dans des bains d'éthanol suivi d'une inclusion dans la paraffine et enfin d'une découpe au microtome. Une coloration des lames au trichrome de Prenant Gabe permettront de réaliser un suivi des stades de gamétogenèse et ainsi déterminer l'indice de maturité gonadique (MGI).

Pour les 10 huîtres suivantes (série 2), nous prélevons, dans un premier temps, l'hémolymphes dans le muscle adducteur postérieur afin de mesurer les concentrations de glucose et de BRIX à l'aide de réfractomètres spécifiques. Ensuite, une coupe transversale dans la masse viscérale entière est effectuée pour augmenter l'effectif d'individus faisant l'objet d'une analyse histologique (n = 22).

Enfin, les 10 dernières huîtres (série 3) sont décoquillées et la masse viscérale entière est congelée (-20°C) avant d'être lyophilisée, broyée et minéralisée pour le dosage des différents métaux (bioaccumulation).

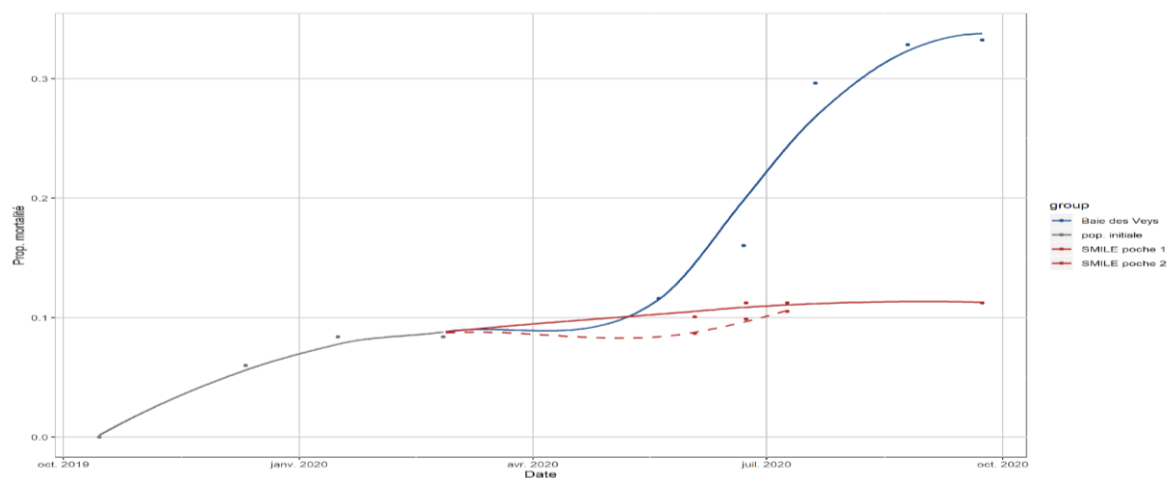


**Fig. 36** : Méthodologie de dissection des huîtres pour les différentes analyses. **A** : Chairs de *Crassostrea gigas* après ouverture de la coquille. **B** : Prélèvement des branchies pour analyse du MDA. **C** : Tissus pour le dosage du glycogène et l'analyse des MDA dans la glande digestive. **D** : Coupe transversale dans la masse viscérale de *C. gigas*. **E** : Coupe histologique (de *C. gigas*) placée dans une cassette avant d'être plongée 24h dans le Davidson.

- **Résultats**

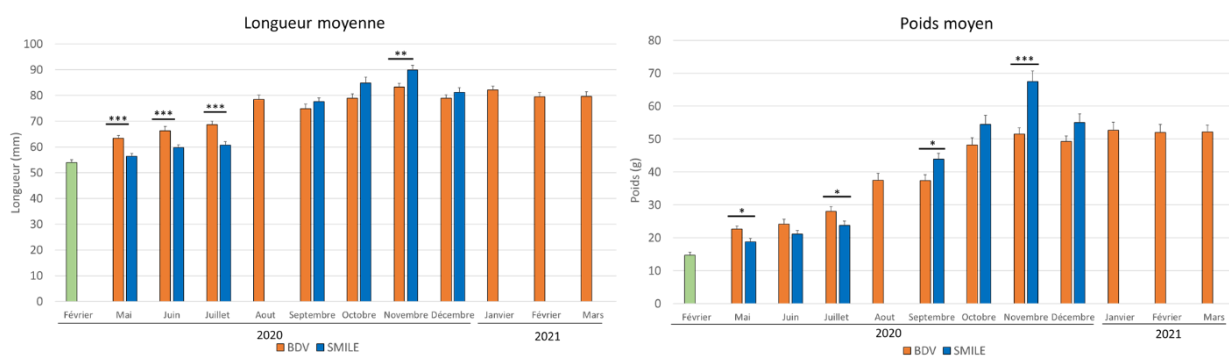
- **Mortalités et Paramètres biométriques**

En période estivale, des mortalités significativement plus importantes sont observées en Baie des Veys comparées à celles enregistrées sous la bouée SMILE (Figure 37).



**Fig. 37** : Mortalité des huîtres placées sous la bouée SMILE et en Baie des Veys.

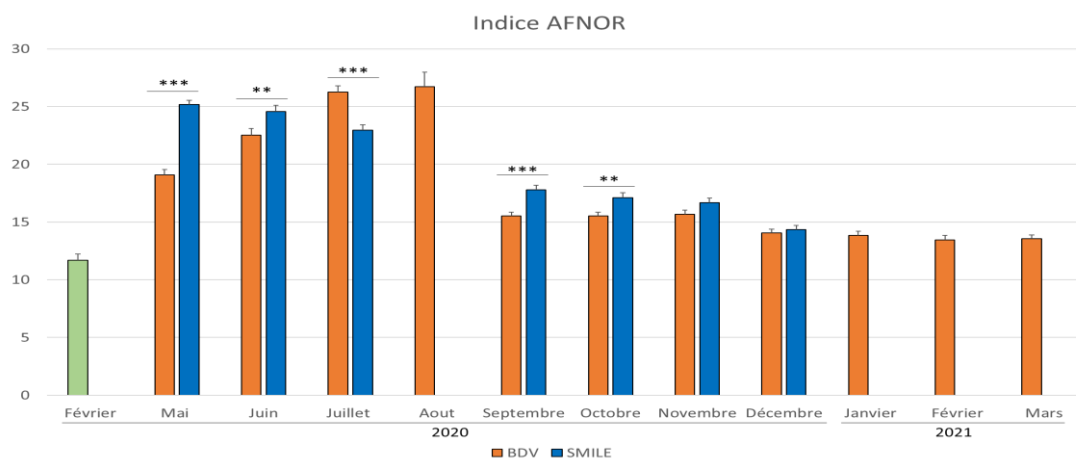
Concernant la croissance, les huîtres présentent une croissance rapide jusqu'à l'automne puis un ralentissement est mesuré pendant la période hivernale quel que soit le site. Cependant, les huîtres sont globalement plus longues et plus lourdes (poids total) en Baie des Veys sur le premier semestre de l'année. En revanche, après la période estivale, les huîtres positionnées sous la bouée SMILE ont rattrapé leur retard de croissance (Figure 38).



**Fig. 38** : Croissance des huîtres placées en Baie des Veys (BDV) et sous la bouée SMILE (SMILE). Des problèmes techniques survenus au niveau de la bouée SMILE nous ont empêchés d’acquérir des données en août 2020 et à partir de janvier 2021.

L’indice AFNOR qui représente le rapport de la masse de chair sur la masse totale de l’huître est largement utilisé par les professionnels pour évaluer la qualité de leurs cheptels. Il montre une baisse importante entre le mois d’août et de septembre quel que soit le site. Cette diminution est à mettre en relation avec l’émission des gamètes durant la période estivale (voir paragraphe suivant). De manière globale, les indices AFNOR sont élevés et permettent de classer les huîtres en « spéciales » (indice > 10,5) (Laisney *et al.* 2018).

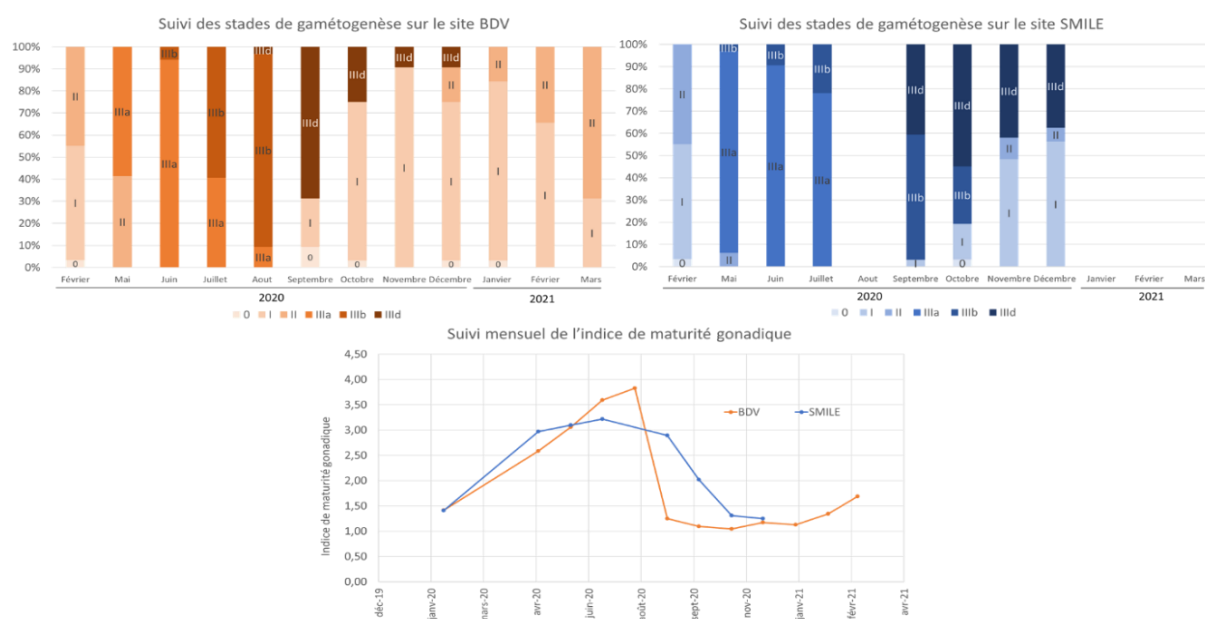
Par ailleurs, nos résultats montrent que ce sont les huîtres localisées sous la bouée SMILE qui présentent globalement les indices les plus élevés, c’est-à-dire un meilleur taux de remplissage comparativement aux huîtres de BDV (Figure 39). Les huîtres placées sous la bouée étant toujours immergées, une meilleure disponibilité en nourriture pourrait expliquer ces différences mais des différences dans la qualité de la ressource trophique ne peuvent être écartées. De plus, les huîtres qui vivent en milieu subtidal (SMILE) sont moins soumises au cycle des marées et se trouvent très probablement dans un environnement moins stressant que leurs congénères vivant en milieu intertidal (BDV), ce qui leur permettrait d’allouer davantage d’énergie à la croissance en chair.



**Fig. 39** : Suivi de l’indice AFNOR des huîtres placées en Baie des Veys (BDV) et sous la bouée SMILE (SMILE).

## ➤ Reproduction

L'analyse des lames histologiques a permis de réaliser un suivi de la gamétogenèse en fonction de la localisation des huîtres. Tout d'abord, nous pouvons observer, sur les graphiques de la figure 40, que le processus de gamétogenèse commence durant la période automnale avec un maximum de stade I (stade des mitoses goniales) pour se terminer durant la période estivale suivante, quel que soit le site. Dans la Baie des Veys, ce cycle est globalement similaire à celui qui avait été décrit en 2000-2001 pour des huîtres de la même classe d'âge (Costil et al., 2005). Cependant, dans la présente étude, un décalage dans l'émission des gamètes est visible en fonction des sites. En effet, la prédominance de stade IIIId (ponte avancée) et la chute brutale de l'indice de maturité gonadique au mois d'août indique des pontes massives et synchronisées sur le site BDV. Pour les huîtres localisées sous la bouée SMILE, l'émission des gamètes semble davantage étalée dans le temps (d'août à novembre). De façon plus tardive, des stades de maturité sexuelle – début de ponte (IIIb) (jusqu'en octobre) et de ponte (IIIId) (jusqu'à décembre) ont été observés pour les huîtres de la bouée SMILE. Cette différence souligne l'importance des stimuli environnementaux dans la ponte des organismes. Ainsi, le cycle de marée (alternance d'immersion / émergence) et/ou les variations de la température ou encore de la ressource trophique pourraient être des facteurs déterminants.



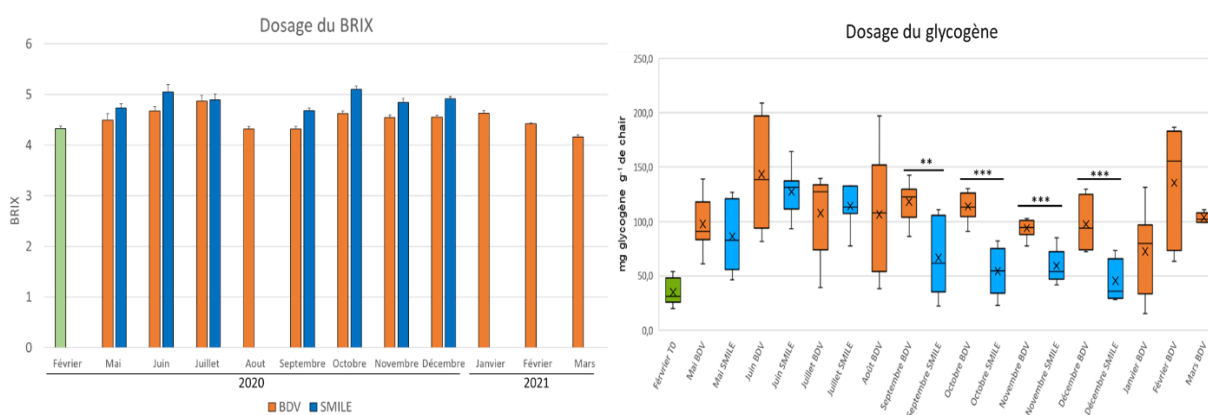
**Fig. 40 :** Suivi des stades de gamétogenèse et de l'indice de maturité gonadique des huîtres placées en Baie des Veys (BDV) et sous la bouée SMILE (SMILE).

## ➤ Réserves énergétiques

L'indice Brix permet de mesurer la concentration en solutés (glucose, glycogène, ...) dans l'hémolymphe des huîtres. Nos résultats montrent une faible variabilité des taux de l'indice BRIX au

cours du temps, ce qui suggère que l'hémolymphe n'est pas un lieu de stockage des solutés privilégié (Figure 41). De plus, aucune différence significative entre les deux sites n'est mesurée). Si ce biomarqueur s'est avéré très pertinent chez les crevettes de la famille des Penaeidae pour évaluer leur état physiologique (e.g. Berry et al., 2019), il est possible qu'il le soit moins chez les huîtres pour lesquels, à notre connaissance, il a été suivi pour la première fois.

En revanche, une différence inter-sites dans le stockage de l'énergie sous forme de glycogène a pu être mesurée (Figure 41). En effet, la teneur en glycogène reste stable (en moyenne 107 mg glycogène g<sup>-1</sup> de chair) tout au long de l'année chez les individus de la BDV (avec néanmoins une forte variabilité inter-individuelle) alors qu'une variation saisonnière est mesurée chez les huîtres de la bouée SMILE. Cette teneur est maximale (147 mg glycogène g<sup>-1</sup> de chair) à la fin du printemps jusqu'au mois août puis elle diminue pendant la période automnale et hivernale (45 mg glycogène g<sup>-1</sup> de chair). Ainsi, une différence significative entre les deux sites apparaît à partir du mois de septembre. Cette variation saisonnière est probablement à mettre en relation avec l'effort de reproduction et au fait qu'une fois qu'elles ont massivement pondu, les huîtres de la BDV mettent davantage en réserve leur énergie (en vue de la prochaine gamétogenèse) que celles localisées sous la bouée SMILE.

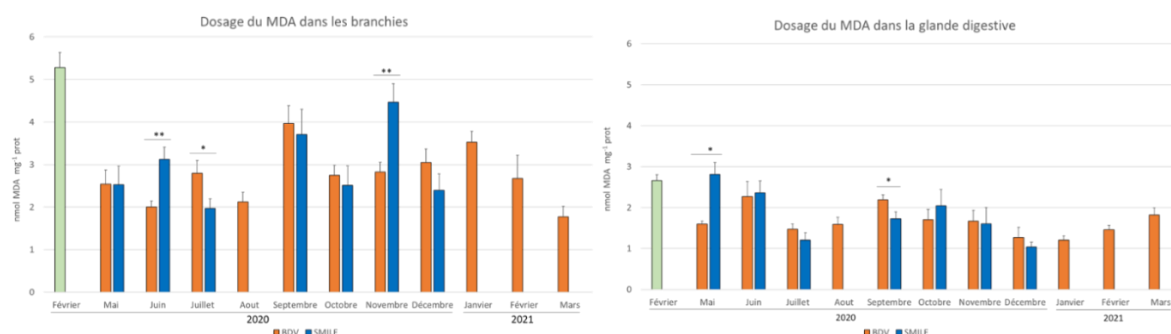


**Fig. 41** : Suivi des réserves énergétiques Brix (hémolymphe) et glycogène (chairs) des huîtres placées en Baie des Veys (BDV) et sous la bouée SMILE (SMILE).

### ➤ Dosage du MDA

Le dosage du malondialdéhyde permet de mesurer la peroxydation lipidique qui représente un marqueur du stress oxydant couramment étudié. Une fluctuation des niveaux de MDA est mesurée sur les deux sites et quel que soit l'organe (branchies vs glande digestive) tout au long de l'année (Figure 42). Globalement, peu de différence significative est déterminée entre les sites sauf de façon ponctuelle au cours de l'année. Les niveaux de MDA sont globalement plus élevés dans les branchies mais dans les deux organes ciblés, ils restent modérés comparés à des expérimentations portant sur

le stress thermique (Jiang et al., 2022) ou du même ordre que ceux d'individus témoins lors d'études écotoxicologiques (e.g. Teng et al., 2021 ; Wei et al., 2022).



**Fig. 42** : Suivi du dosage du malondialdéhyde (MDA) dans les branchies et la glande digestive des huîtres placées en Baie des Veys (BDV) et sous la bouée SMILE (SMILE).

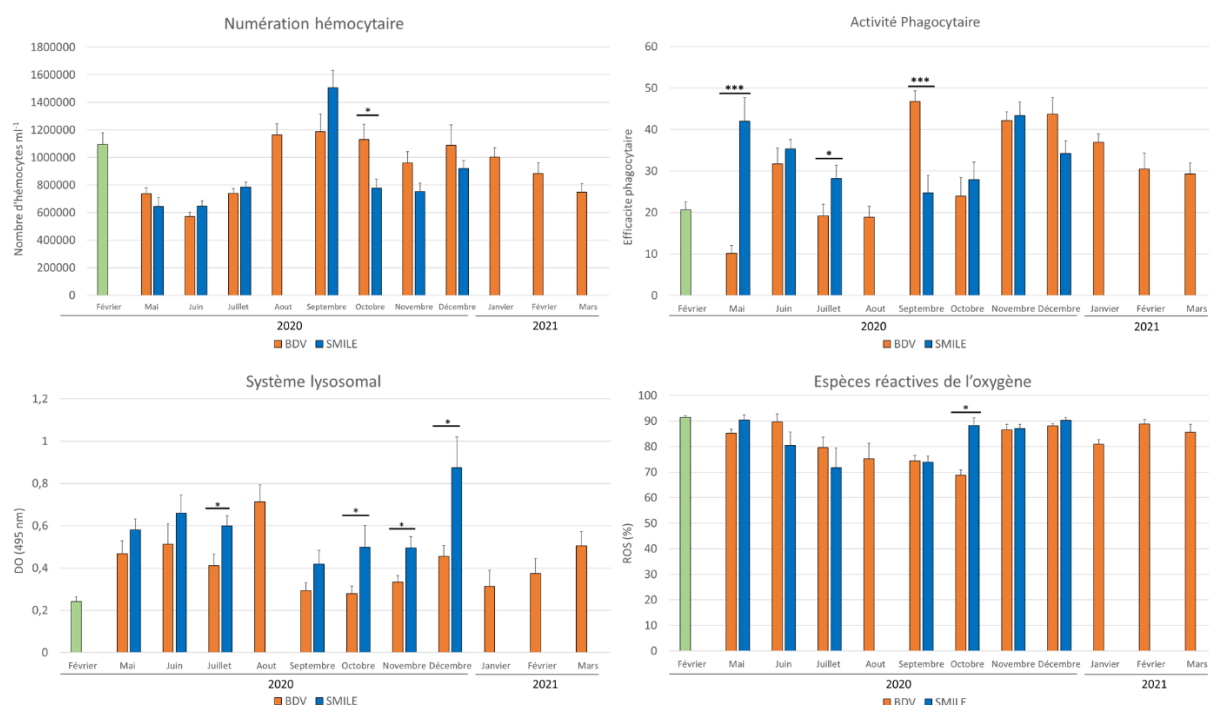
### ➤ Paramètres immunitaires

Les paramètres immunitaires ont été étudiés à travers l'analyse de quatre biomarqueurs différents (Figure 43). Nous constatons une fluctuation des paramètres immunitaires tout au long de l'année quel que soit le paramètre analysé et le site considéré. Ainsi, une hausse de la numération (densité) hématocytaire est mesurée à la fin de l'été sur les deux sites, ce qui coïncide avec la fin de l'émission des gamètes et la phase de résorption des gamètes résiduels dans laquelle les hémocytes sont tout particulièrement impliqués.

D'un point de vue comparatif, les résultats sur l'état des membranes du système lysosomal montrent des valeurs plus élevées sur le site SMILE par rapport aux huîtres de la BDV durant la période automnale/hivernale. Ces différences semblent montrer une déstabilisation des membranes lysosomales des hémocytes de la BDV laissant apparaître un stress pouvant fragiliser la physiologie et la fonction de ces cellules hémocytaires. Cependant, en analysant l'activité phagocytaire, aucune différence significative n'est mesurée entre ces deux sites sur cette même période. Sur la période printemps/été, peu de différences significatives entre les deux sites sont mises en évidence concernant le système lysosomal à l'exception du mois de juillet où une différence ponctuelle entre les deux sites est déterminée. Concernant l'activité phagocytaire, nous observons une forte variabilité inter-individuelle de l'efficacité phagocytaire (pourcentage d'hémocytes ayant incorporé au moins 3 billes) (Figure 43). Les analyses statistiques montrent des différences significatives entre les sites aux mois de mai et juillet indiquant que les hémocytes issus des huîtres de la bouée SMILE présente une activité phagocytaire plus élevée que ceux de la BDV. Cependant, au mois de septembre, l'inverse est mis en évidence.

L'analyse en cytométrie en flux des espèces réactives de l'oxygène (ROS) révèle une très faible variation du pourcentage tant dans le temps qu'entre les deux sites (Figure 43) à l'exception du mois

d'octobre où un stress oxydatif significativement plus important est mesuré au sein des hémocytes issus des huîtres de la bouée SMILE par rapport à celle de la BDV.



**Fig. 43 :** Paramètres immunitaires des hémocytes des huîtres placées en Baie des Veys (BDV) et sous la bouée SMILE (SMILE).

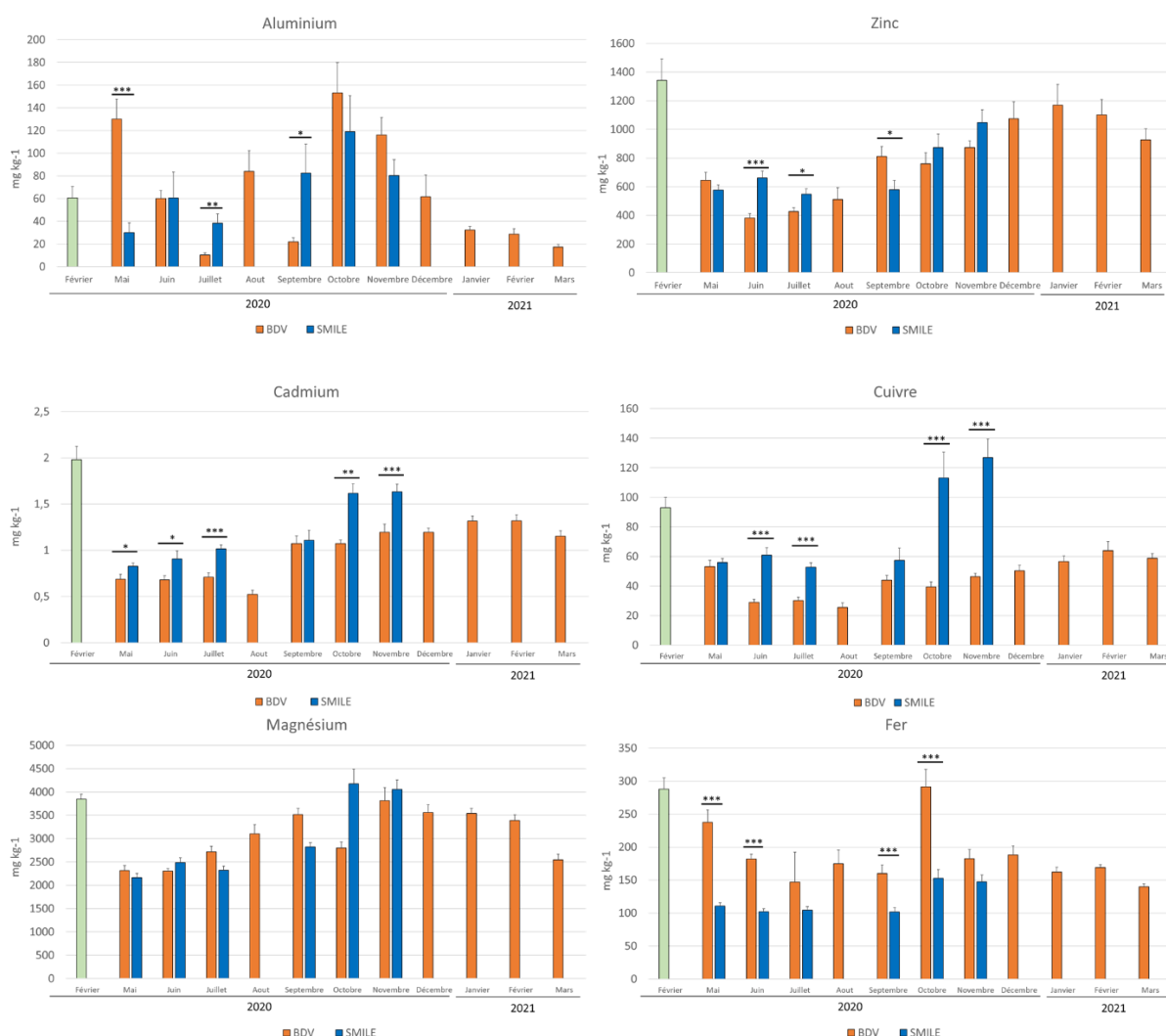
#### ➤ Concentration en éléments chimiques

Concernant la contamination en éléments traces métalliques (ETMs) dans les chairs des huîtres, nos analyses ont porté sur 6 métaux, les plus représentatifs de la contamination de la Baie de Seine et qui sont détectés au-dessus des limites de quantification.

Quel que soit l'ETM et le site considéré, nous mesurons des variations annuelles de la bioaccumulation dans la chair des huîtres. A titre d'exemple, la concentration en aluminium varie de 22 à 153  $\text{mg kg}^{-1}$  alors que celle du zinc oscille entre 382 et 1170  $\text{mg kg}^{-1}$ . Globalement, nous constatons une augmentation des concentrations sur la période automnale et/ou hivernale probablement liée aux apports fluviaux et atmosphériques.

D'un point de vue comparatif entre les deux sites, la bioaccumulation en aluminium et en zinc semble variable. Les huîtres de la bouée SMILE ont une bioaccumulation en zinc plus importante que celles de la BDV en juin et juillet et c'est l'inverse en septembre. Nous pouvons observer le profil inverse pour l'aluminium. Concernant le cadmium et le cuivre, les huîtres de la bouée SMILE présentent une contamination supérieure tout au long de l'année laissant présager un apport de la Seine pour ces composés. Par contre, la tendance est inversée pour le fer avec des concentrations plus élevées dans

les huîtres de la BDV. Le bassin versant de la BDV présente des concentrations naturellement plus fortes de cet élément que celui de la Seine, ce qui peut expliquer ce résultat.



**Fig. 44 :** Evolution des concentrations en éléments chimiques dans les huîtres placées en Baie des Veys (BDV) et sous la bouée SMILE (SMILE).

En conclusion, l'analyse des paramètres biologiques étudiés montre un décalage du cycle de reproduction associé notamment à la teneur en glycogène entre les huîtres localisées en BDV et sous la bouée SMILE. Cependant, il n'y pas de différences marquées concernant les paramètres immunitaires et le stress oxydant pour ces huîtres localisées sur les deux sites contrastés. Ainsi, à ce jour, nous ne pouvons relier les mortalités supérieures observées en Baie des Veys à partir du mois de juillet à un des paramètres étudiés. Ces mortalités ostréicoles en zone côtière à forte richesse trophique sont probablement plus de l'ordre des « mortalités estivales » étudiées dans le cadre du programme MOREST (Samain et al. 2007).

De plus, les résultats nous permettent l'obtention de valeurs basales (de référence), d'une part, des réponses biologiques étudiés et, d'autre part, de la contamination chimique avant la mise en



place du parc éolien de Courseulles-sur-Mer. En effet, les anodes galvaniques utilisées pour limiter la corrosion des mats des éoliennes libèreront une quantité d'ETMs qui pourra être dans le futur une source de contamination chronique potentielle. Ainsi, nous serons dans la capacité de suivre les niveaux de bioaccumulation de ces métaux dans les huîtres et déterminer l'évolution ou non de ces valeurs basales.

## Évaluation des effets biologiques d'une anode galvanique à base d'aluminium sur les organismes marins

**Résumé :** Le déploiement de structures immergées en mer (e.g. parcs éoliens, coques et hélices de navires, infrastructures portuaires...) implique la mise en place de systèmes de protection contre la corrosion. Parmi eux, la protection cathodique par anode galvanique (PCAG) utilisant des plaques constituées d'un alliage métallique, souvent de l'aluminium et du zinc, est une des méthodes les plus pratiquées. L'oxydation de l'anode induit une libération d'ions métalliques ou d'oxyhydroxydes dans l'environnement marin, impliquant un enrichissement potentiel des concentrations en aluminium et en zinc dans la colonne d'eau et dans le sédiment à proximité des anodes galvaniques. Les objectifs de ces travaux de thèse étaient d'étudier les effets de la dissolution d'une anode galvanique à base d'aluminium sur des organismes marins de différents groupes taxonomiques et niveaux trophiques. Des expérimentations en conditions contrôlées ont été menées sur 9 espèces dont l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, l'ormeau européen, *Haliotis tuberculata*, 4 espèces de microalgues, 3 espèces de macroalgues ainsi que sur le microphytobenthos. Les différents organismes testés ont présenté une grande différence de sensibilité au cocktail métallique libéré par l'anode galvanique. Le microphytobenthos a été impacté à partir de concentrations d'aluminium qui sont régulièrement rapportées dans l'environnement tandis que le développement des larves d'huîtres a été altéré pour des concentrations d'aluminium légèrement supérieures aux maximums environnementaux. En conditions dites représentatives de l'environnement, aucun effet de l'anode galvanique n'a été constaté sur l'état de santé des huîtres adultes et des ormeaux juvéniles et adultes. Seules des concentrations bien supérieures ont entraîné des altérations du système lysosomal et du métabolisme énergétique ainsi que des retards de croissance. La plupart des organismes photosynthétiques testés, macroalgues et microalgues, se sont avérés relativement résistants aux métaux avec peu voire aucun effet mesuré sur la croissance et la photosynthèse des algues. Ces travaux approfondissent les connaissances de l'impact des anodes galvaniques sur les organismes marins, notamment sur des groupes d'organismes qui avaient été jusqu'alors que peu considérés dans les études écotoxicologiques sur l'aluminium et le zinc.

**Mots Clés :** anode galvanique, aluminium, zinc, bioaccumulation, cocktail de métaux, huître, ormeaux, algues

## Evaluation of the biological effects of an aluminium-based galvanic anode on marine organisms

**Abstract:** The installation of offshore structures (e.g., wind farms, ship hulls and propellers, port infrastructures...) involves the use of corrosion protection systems. Among them, galvanic anode cathodic protection (GACP) using plates made of a metal alloy, often aluminium and zinc, is one of the most practiced methods. The oxidation of the anode induces a release of metal ions or oxyhydroxides into the marine environment, leading to a potential enrichment of aluminium and zinc concentrations in the water column and in the sediment near the galvanic anodes. The objective of this thesis work was to study the effects of dissolution of an aluminium-based galvanic anode on marine organisms of different taxonomic groups and trophic levels. Experiments under controlled conditions were conducted on 9 species including the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, the European abalone, *Haliotis tuberculata*, 4 species of microalgae, 3 species of macroalgae as well as on the microphytobenthos. The different organisms tested showed a large difference in sensitivity to the cocktail of aluminium and zinc produced by the galvanic anodes. The microphytobenthos was impacted from aluminium concentrations that are regularly reported in the environment, while the development of oyster larvae was compromised for aluminium concentrations slightly above the environmental maximums. Under representative environmental conditions, no effect of galvanic anodes on the health of adult oysters and juvenile and adult abalone was observed. Only significantly higher concentrations induced alterations in the lysosomal system and energy metabolism as well as growth retardation. Most of the photosynthetic organisms tested, both macro- and microalgae, were found to be relatively resistant to metals with few or no effects observed on algal growth and photosynthesis. This work increases our knowledge of the impact of galvanic anodes on marine species, particularly on groups of organisms that were previously rarely considered in ecotoxicological studies on aluminium and zinc.

**Keywords:** galvanic anode, aluminium, zinc, bioaccumulation, metal cocktail, oyster, abalone, algae