***MASTER 2 ECOLOGIE***

***SPECIALITE***

**Fonctionnement et Gestion des Ecosystèmes Marins**
***(FOGEM)***

**Co-habilité entre l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Lille 1) et l'Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO)**

Année 2011-2012

# Effet du réchauffement et de l'acidification de l'eau de mer sur la fécondation et le développement précoce de l'oursin *Paracentrotus lividus*

Mishal COHEN-RENGIFO

José Carlos Hernández Pérez

Université de la Laguna
Département de Biologie Animal

# SOMMAIRE

1 PRELIMINAIRES..... 4

1.1 Abstract..... 4

1.2 Résumé..... 4

1.3 Remerciements..... 5

2 INTRODUCTION..... 5

2.1 Généralités..... 5

2.2 Ecologie et reproduction de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816).....7

3 MATERIELS ET METHODES..... 8

3.1 Aire d'étude: île de Ténérife..... 10

3.2 Collecte et induction à ponte des reproducteurs..... 10

3.3 Expérience 1 : Effet de l'acidification et du réchauffement de l'eau de mer sur la fécondation et le développement larvaire précoce de *Paracentrotus lividus*..... 11

3.3.1 Taux de fécondation et taux de clivage..... 12

3.3.2 Morphométrie des larves Pluteus..... 12

3.3.3 Traitement de données.....13

3.4 Expérience 2 : Effet de l'acidification de l'eau de mer sur le développement larvaire planctonique de *Paracentrotus lividus*..... 14

3.4.1 Conditionnement de l'eau.....14

3.4.2 Contrôle du pH et niveau de saturation de calcite et d'aragonite.....15

3.4.3 Alimentation des larves..... 16

3.4.4 Bio-essais.....16

4 RESULTATS..... 17

4.1 Expérience 1 : Effet de l'acidification et du réchauffement de l'eau

de mer sur la fécondation et le développement larvaire précoce de *Paracentrotus lividus*.....17

4.1.1 Taux de fécondation..... 17

4.1.2 Taux de clivage..... 18

4.1.3 Morphométrie larvaire..... 20

4.2 Expérience 2 : Effet de l'acidification de l'eau de mer sur le développement larvaire planctonique de *Paracentrotus lividus*..... 22

4.2.1 Physico-chimique de l'eau..... 22

4.2.2 Morphométrie larvaire..... 23

4.2.3 Survie et mortalité larvaire..... 25

5 DISCUSSION..... 26

5.1 Fécondation et embryogenèse de *Paracentrotus lividus* dans l'océan du future proche..... 26

5.1.1 Effets du réchauffement..... 26

5.1.2 Effets de l'acidification..... 28

5.2 Développement larvaire de *Paracentrotus lividus* dans le plancton de l'océan future..... 30

5.2.1 Effets du réchauffement..... 30

5.2.2 Effets de l'acidification..... 31

6 CONCLUSIONS..... 33

7 BIBLIOGRAPHIE..... 35

8 ANNEXE 1 : Résultats moyens et photos..... 41

8.1.1 Expérience 1..... 41

8.1.2 Expérience 2..... 42

9 ANNEXE 2 : Résultats statistiques..... 44

9.1.1 Expérience 1..... 44

9.1.2 Expérience 2..... 46

10 ANNEXE 3 : Résultats originaux..... 48

10.1 Expérience 1..... 48

10.1.1 Taux de fécondation..... 48

10.1.2 Taux de clivage..... 49

10.1.3 Morphométrie larvaire..... 51

10.2 Expérience 2..... 54

10.2.1 Paramètres physico-chimique de l'eau..... .....54

10.2.2 Calculs de densité de *Rhodomonas lens* pour nourrir les larves..... 55

10.2.3 Calculs de densité d'œufs et de larves à ensemencer.....56

10.2.4 Densité larvaire..... 57

10.2.5 Morphométrie larvaire..... 58

# 1 PRELIMINAIRES

## 1.1 Abstract

In a context of climate change, increasing values of atmospheric $CO_2$ are tilting the delicate balance of the ocean towards warming and more acidic seawater. Increasing seawater temperatures and acidification constitutes a stressor of marine populations that induce migrations and local extinctions. We evaluated the separated effects of low pH and high temperatures on fertilization and early development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*, as well as the effect of pH on larvae survival and morphometry. Three ranges of pH and temperature were used, corresponding to current seawater conditions and values expected by the IPCC. Five larvae $ml^{-1}$ were sowed on 15 replicas. *Rhodomonas lens* was used as food source at 2000 cells $ml^{-1}$. A slight but significant increase with higher seawater temperatures (19.0°C=97.9%; 22.5°C=99.5%) was showed. As water got warmer, embryo and larval development is accelerated which may result in a reduction of the planktonic dispersal length that would limits gene flow among population. In contrast, we observed a reduction on fertilization at low pHs (pH 8.0=97.4%; pH 7.4=67.1%) and a delay on cleavage and larval development. However, and although larvae were able to survive in all pH treatments (density<10%) the more time eggs and larvae spends in the planktonic phase, the more chance to die by predation. The effect of acidification on larvae morphometric was also clear. Mean post-oral arm lengths were $L_{pH8.0}$= 0.506 mm, $L_{pH7.7}$= 0.538 mm and $L_{pH7.4}$= 0.373 mm. This means that at moderate pH changes larvae would be able to develop; whereas extreme seawater pH values limit larvae development and the achievement of a competent stage. Thus, ocean warming and acidification separately, are important factors with contrasting effects compromising fertilization and early development of *P. lividus* at latitudes around the Canary Islands. However, further multifactorial experimentation is required.

**Key words**: *Paracentrotus lividus*, pH, acidification, temperature, larval development, fertilization, global warming.

## 1.2 Résumé

Dans un contexte de changement climatique, les valeurs croissantes de $CO_2$ font basculer la délicate balance océanique vers des eaux chaudes et acidifiées. La température croissante et l'acidification constituent un stress pour les populations marines en provocant migrations et extinctions locales. Nous avons évalué l'effet séparé de faibles pH et d'hautes températures sur la fécondation et le développement précoce de l'oursin *Paracentrotus lividus* ; ainsi que l'effet du pH sur la survie et morphométrie larvaire. Trois traitements de température et de pH ont été utilisés, correspondant aux conditions de mer actuelles, et prévues par l'IPCC. Cinq larves $ml^{-1}$ ont été semées sur 15 réplicas. La nourriture était constituée de 2000 cellules $ml^{-1}$ de *Rhodomonas lens*. La fécondation a augmenté, légèrement mais significativement, avec des températures plus élevées (97,9% à 19,0°C ; 99,5% à 22,5°C). Le réchauffement de l'eau accélère le développement embryonnaire/larvaire, ce qui peut réduire la distance de dispersion planctonique en limitant le flux de gènes entre populations. En revanche, nous avons observé une réduction significative de la fécondation aux pHs basses (97,4% à pH 8,0 ; 67,1% à pH 7,4) et un retard sur le développement. Cependant, malgré les larves ont sont capables de survivre dans tous les traitements de pH (densité<10%), plus de temps les œufs/larves dépensent dans la phase planctonique, plus importante est la pression de prédation. Les longueurs

moyennes de bras post-oraux ont été: $LMB_{pH8.0}$=0,506 mm; $LMB_{pH7.7}$=0,538 mm and $LMB_{pH7.4}$=0,373 mm. Cela implique que, pour des changements de pH modérés, les larves seraient capables de se développer. Mais des valeurs extrêmes de pH limiteraient le développement des larves et la réussite de l'étape compétente. Ainsi, le réchauffement et l'acidification océanique sont, séparément, des facteurs importants aux effets contrastés, compromettant la fécondation et le développement larvaire de *P. lividus* aux latitudes voisines des îles Canaries. Cependant, l'expérimentation multi-factorielle est nécessaire.

**Mots clés**: *Paracentrotus lividus*, pH, acidification, température, développement larvaire, fécondation, réchauffement climatique.

## 1.3 Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier mon maître de stage José Carlos HERNANDEZ, c'est un excellent guide et une personne qui m'a toujours soutenu. C'est grandement gratifiant de travailler dans un environnement agréable où le partage de connaissance se fait avec les meilleurs rapports personnels. Merci aux membres de l'équipe ACIDROCK pour tout le support et les heures supplémentaires de travail données afin que nos expériences se déroulent pour le mieux. Merci aussi au département de biologie animale de l'ULL de m'avoir permit de collaborer à d'autres projets d'échinodermes autant sur le terrain qu'en laboratoire. Et également, de soutenir ma participation dans la 14ème Conférence International d'échinodermes à Bruxelles qui tient à exposer les résultats obtenu dans le cadre de ce stage. Merci à Juan José Alvarado, mon ancien directeur de mémoire de licence de m'avoir mis en relation avec l'équipe ACIDROCK. Merci à M. ARTIGAS et Mme. GENTILHOMME de l'Université Littoral Côte d'Opale pour leur support et de m'avoir facilité les démarches pour effectuer ce stage à l'étranger.

# 2 INTRODUCTION

## 2.1 Généralités

Depuis la fin du 19ème siècle, les scientifiques ont pris plus largement conscience de l'influence de l'homme sur la planète. Le premier chercheur à avoir étudié le sujet est Georges Perkins Marsh en 1864, avec la première étude majeure sur le changement global dû à l'homme. Pour Antonio Stoppani en 1871, ces changements auront eu une telle importance qu'il a introduit le terme « anthropozoïque » pour définir la période correspondant à ces transformations. Arrhénius et Chamberlain en 1987 ont été les premiers à étudier les relations entre les concentrations en $CO_2$ atmosphériques et le réchauffement global (Zalasiewicz 2011). Enfin, en 2002, Paul Crutzen, prix Nobel de Chimie Atmosphérique, a ressuscité le concept d'anthropocène pour définir la période de

temps actuelle durant laquelle les principaux processus terrestres ont été dominés par l'influence humaine (Crutzen 2002). Ceci est actuellement sujet d'un gros débat.

Les activités humaines liées à l'agriculture et le défrichage des forêts ont provoqués les premières hausses de la concentration de $CO_2$ atmosphérique bien avant l'ère industriel. Toutefois, c'est à partir de 1750 que l'on voit un marqueur non équivoque de l'influence de l'humanité sur la planète vérifié par une croissance exponentielle de la concentration de plusieurs gaz à effet de serre (Brook 2009). Ainsi, la modification de l'environnement par l'homme est devenue une composante importante ayant déclenché le changement climatique global.

Des modèles mondiaux à plusieurs variables concernant le changement climatique ont été faits par l'IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change2007) à partir de séries de données de long terme. Les scénarios les plus optimistes prévoient pour l'année 2100, un réchauffement moyen de la température de surface de l'eau de mer de +1,9°C. Cependant des scénarios plus pessimistes prévoient une augmentation moyenne de +4,0°C avec un maximum de +7,5°C au pôle nord. Concrètement, pour les îles Canaries, la température tends également à l'augmentation d'entre +1°C et +3,5°C.

En plus, depuis les dernières décennies, la concentration de $CO_2$ atmosphérique a augmenté rapidement dû à l'incinération de combustibles fossiles et à la production de ciment. L'océan a absorbé 50% du $CO_2$ anthropogénique émit à l'atmosphère entre 1800 et 1994 (Sabine et al. 2004), ce qui ne veut pas dire que cette abortion s'est arrêté. Au contraire, elle continue et perturbe la délicate balance chimique de l'eau de mer à l'échelle globale. Ainsi, l'absorption de charbon anthropogénique depuis 1750 a conduite à l'acidification de l'océan avec un décrément du pH de 0,1 unité correspondant à une réduction d'environ 8,21 à 8,10 (Royal Society 2005). Les prédictions moyennes basées sur les scénarios de Special Report on Emissions Scenarios (SRES) montrent une réduction du pH de l'océan de surface d'entre -0,14 et -0,35 unités pour la fin du 21$^{ème}$ siècle (IPCC 2007), même de -0,4 et -0,5 (Caldeira & Wicket 2003, Orr et al. 2005, Wooton et al. 2008). Quant aux îles Canaries, le groupe de recherche QUIMA de l'Université las Palmas de Gran Canaria a prévu, pour l'année 2300, un décrément du pH de -0,6 (O. Llinas comm. pers.).

Paradoxalement, ces changements climatiques dus à l'homme affectent le fonctionnement et les services que les écosystèmes offrent, ce qui représente un risque pour le bien-être des humains (Hughes et al. 2003). A ce propos, la dégradation de l'environnement pourrait avoir de nombreux impacts sociaux, sanitaires, politiques (accès à l'eau, hydrocarbures, maladies, etc.) ainsi que législatif, notamment au niveau des impacts humains sur les océans.

Au niveau des effets du changement climatique sur la biota, la température, le pH, la $pCO_2$ et la saturation du $CaCO_3$ sont les facteurs les plus importants

contrôlant la distribution, la physiologie, la morphologie et le comportement des invertébrés marins (Doney et al. 2009). Par exemple, la température de l'océan est l'un des plus évidents, car elle entraine des altérations sur la capacité d'un organisme à s'adapter face au changement de son rang de température et par conséquence du succès de survie (Harley et al. 2006). Ainsi, le déplacement des espèces peut conduire à un basculement de l'organisation et du fonctionnement des écosystèmes.

D'autre, la dissolution du $CO_2$ dans l'eau océanique n'augmente pas seulement la concentration d'ions hydrogène, ce qui entraine la réduction du pH, mais aussi elle réduit la concentration d'ions carbonate (Feely et al. 2004, Dickson 2010). Dans ce cas-là, un désavantage est constaté sur la formation des structures calcaires des poissons et plusieurs organismes calcifiants (Doney et al 2009, Ishimatsu & Dissanayake 2010) tels que les coraux (Hoegh-Guldberg et al. 2007), les mollusques (Comeau 2009) et les échinodermes (O'Donnell et al. 2010). Chez les échinodermes, la dissolution du $CO_2$ fait varier plusieurs processus physiologiques comme la respiration, la fécondation, le développement larvaire, l'alimentation… (Kurihara & Shirayama 2004, Dupont & Throrndyke 2009).

Chez les organismes calcifiants, l'habilité réduite pour produire des structures calciques est particulièrement nuisible aux stages précoces de développement (Kurihara & Shirayama 2004. Ces stages constituent des goulots au niveau des populations car ils déterminent la future abondance des potentiels reproducteurs (Uthicke et al. 2009). Une mortalité de plus de 90% a été observé chez les juvéniles d'organismes marins benthiques. Ceci représente une tendance partagée entre plusieurs taxas qui contrôle la survie et la taille de population (Gosselin & Qian 1997).

## 2.2 Ecologie et reproduction de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

L'oursin *P. lividus* est largement répandu dans la méditerranée et l'atlantique nord, les îles Canaries étant la limite la plus au sud. La température de son environnement varie normalement entre 10 et 15°C en hiver et 18 et 25°C en été. *P. lividus* vit en peuplements denses, dans des cavités creusées par des mouvements de rotation. Il habite généralement aux substrats rocheux entre le intertidale et 20 m de profondeur. Il peut supporter une agitation hydrodynamique non négligeable (mode semi battu). Cependant, des larves peuvent être retrouvées à plusieurs centaines de mètres plus profonds (Boudouresque & Verlaque 2007).

Cet oursin exerce un effet important sur la structure et dynamique de la biocénose des habitats côtiers. S'il est en grande abondance, il peut supprimer des macrophytes des vastes zones provocant les habitats « barren-ground » qui sont caractérisés par des algues corallines incrustantes. L'état barren peut

persister à  moins que l'abondance d'oursins baisse (Bulleri et al. 1999). Dans les écosystèmes méditerranéens barren ground d'eau peu profonde, la suppression de *P. lividus* résulte dans le développement d'organismes multicellulaires filamenteux. Ceci dans la courte période d'un mois (Boudouresque & Verlaque 2007).

Concernant sa reproduction, la maturité sexuelle a été constatée in vitro à 13 – 20 mm de diamètre minimum (Cellario & Fenaux 1990). Toutefois, en milieu naturel à Ténérife, la taille de la première maturité sexuelle (à laquelle 50% de la population est mature) est atteinte à 24,1 mm et la taille de maturité massive (à laquelle 95% de la population est mature) est de 42,7 mm.  Quant à la fécondité, la quantité d'œufs libérée dans la colonne d'eau varie avec la dimension des oursins et elle est maximale à 45mm (Girard-Berard et al. 2010). Selon une approche histologique à Tenerife, la gamétogenèse est plutôt rapide, et plusieurs pontes par an sont observées. Ceci est un contraste par rapport aux populations des plus hautes latitudes où seulement une ou deux pontes sont observées dans l'année (Girard et al. 2008).

Considérant qu'aux îles Canaries, cet oursin est une espèce à intérêt commercial, l'étude de l'impact du changement climatique sur ses stades de développement précoce peut entrainer d'importantes implications au niveau du mangement pécheur et du contrôle de population.

De cette façon, la présente étude a pour but d'évaluer l'effet les valeurs de température et de pH prévues pour la fin du 21ème siècle sur le développement larvaire de l'oursin *Paracentrotus lividus*. Cette étude a lieu à sa limite de distribution la plus au sud, où l'effet du changement global peut se mettre en évidence en avance qu'aux plus hautes latitudes. A ce propos nous avons réalisé deux expérience dont ses objectives sont décrits par la suite. Expérience 1 : Tester l'effet séparé de trois valeurs de pH et de trois valeurs de température sur la fécondation et le développement précoce. Expérience 2 : Tester l'effet de trois valeurs de pH à température constante sur la survie et développement larvaire planctonique.

# 3 MATERIELS ET METHODES

Dans le cadre du stage de la deuxième année du master « Fonctionnement et Gestion des Ecosystèmes Marins » (FOGEM), la présente étude a été effectué entre février et juin 2012 à Ténérife, îles canaries, en Espagne. La direction du stage a été encadré par PhD. José Carlos HERNANDEZ, au sein du groupe de

recherche « Biodiversité, Ecologie Marine et Conservation » appartenant au département de biologie animale de l'Université de La Laguna. Ce stage a fait partie d'un projet majeur compris dans le Plan National du Gouvernement d'Espagne appelé « Influence de la phytocénose, dans des habitats du littoral rocheux, sur la variabilité du pH et ses implications sur la population d'invertébrés calcifiants dans un scénario de changement climatique » (acronyme ACIDROCK).

Nous étions cinq personnes participant au projet. A savoir : Eliseba Garcia et moi même : acteurs principaux chargés de la partie expérimentale et de son analyse ; Celso Hernandez : chargé du control du pH et du niveau de saturation de calcite et d'aragonite ($\Omega_C$ et $\Omega_A$) de l'eau de mer ; José Carlos Hernandez : encadrant du projet ; Sabrina Clemente : conseillère en statistique

En général, nous avons réalisé deux expériences liées entre elles afin de pouvoir tester notre objectif principal :

- Déterminer l'effet du changement climatique sur les premiers stades du développement de l'oursin *Paracentrotus lividus*.

Nous avons également expérimenté des objectifs spécifiques :

- Comparer l'effet des trois différentes valeurs de température à pH constant sur la fécondation et le développement précoce de *P. lividus*.
- Comparer l'effet des trois différentes valeurs de pH à température constante sur la fécondation et le développement précoce de *P. lividus*.
- Evaluer l'effet des trois traitements de pH à température constante sur la survie et le développement larvaire pendant son stade planctonique.

Les hypothèses que l'on cherche à démontrer sont les suivantes :

- $H_1$T° : L'élévation de la température de l'eau de mer augmente le succès de la fécondation et accélère le développement embryonnaire et larvaire précoce de *P. lividus*.
- $H_1$pH : Le déclin du pH océanique diminue le succès de la fécondation et retarde le développement embryonnaire et larvaire planctonique de *P. lividus*.

Pour mettre en œuvre l'installation et les manipulations des nos expériences, la méthodologie utilisée dans le présent travail est concordante avec celles de plusieurs études précédentes rapportées au sujet. A titre référentielle voici quelques exemples : Grosjean et al. (1998), Kurihara & Shirayama (2004), McEdward & Miner (2007) Byrne et al. (2009) et Sheppard-Brennand (2010). Il convient de souligner (noter c'est bien aussi et cependant je trouve que c'est un mot inutile) que l'installation a été essentiellement conçue au sein du groupe de recherche de l'ULL.

## 3.1 Aire d'étude: île de Ténérife

Faisant partie du territoire espagnol, l'archipel des îles Canaries est composé de sept îles. Elles sont localisées zonalement à travers le flanc est du gyre subtropical de l'Atlantique Nord, à l'ouest des côtes marocaines. Ténérife se situe au milieu de l'archipel (28° 16′ 07″ N ; 16° 36′ 20″ O) étant l'île la plus grande avec 81 km de longueur pour 45 km de largeur (Fig. 1) (Bartona et al. 1998).

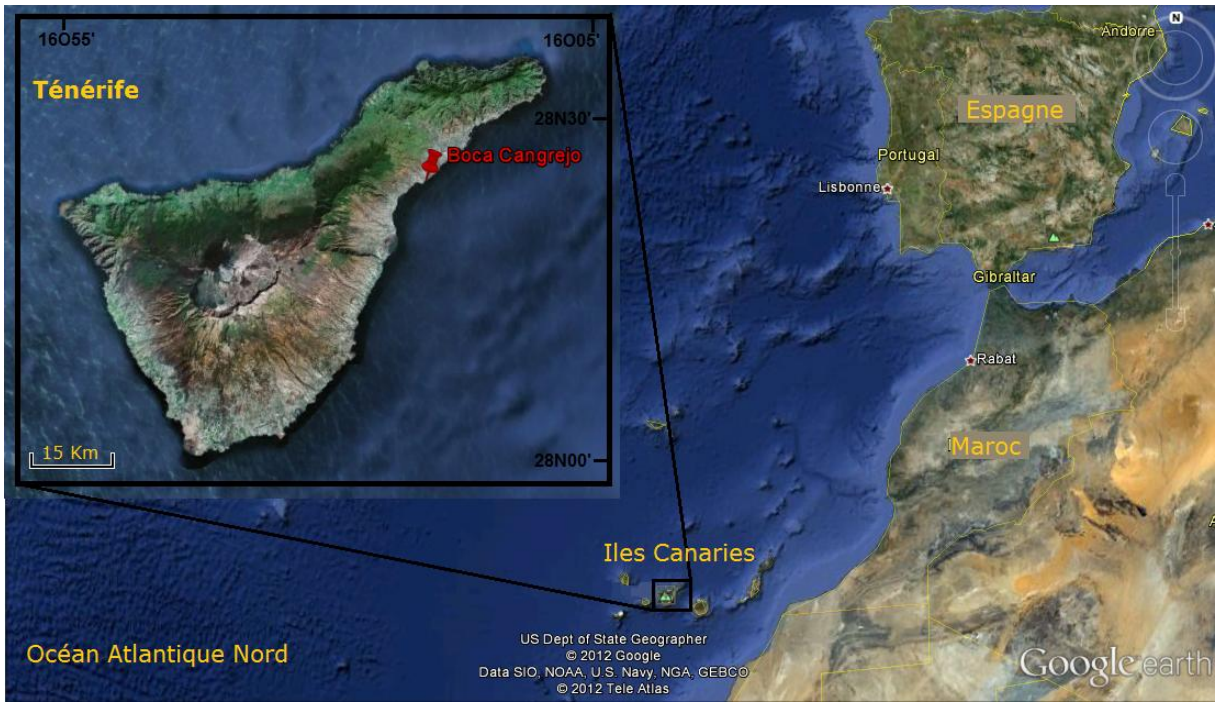



**Figure 1.** Carte de l'île de Ténérife avec le point d'écahntillonage. Source : Google earth

Dans les fonds marins, les pentes escarpées et la faible amplitude des plateformes subtidales limitent la surface potentielle pour l'établissement des espèces littorales. Cependant, grâce à l'importante longitude de côte, la morphologie littorale et l'hétérogénéité de la dynamique marine, il est possible de trouver des habitats et des écosystèmes divers. La faible productivité et la limitation d'espace colonisable entrainent des tailles de population plutôt réduites, ce qui rend ces populations plus vulnérables aux altérations, notamment d'origine anthropique (Hernández et al. 2009).

La température de surface de la mer atteint des valeurs minimales en hiver entre 19 et 21°C. Les valeurs maximales en été oscillent entre 23 et 25°C (Hernández et al. 2009). Le pH en surface est de 8,035 ± 0,005, valeur maximale due à la photosynthèse. La salinité de surface est reportée entre 36,9 et 37,2 (Santana-Casiano et al. 2001, Baltar et al. 2009).

## 3.2 Collecte et induction à ponte des reproducteurs

La collecte des individus de *P. lividus* (Fig. 2A) a eu lieu en mars 2012 auprès du littoral subtidale rocheux (0-5 m de profondeur), dans la baie Boca

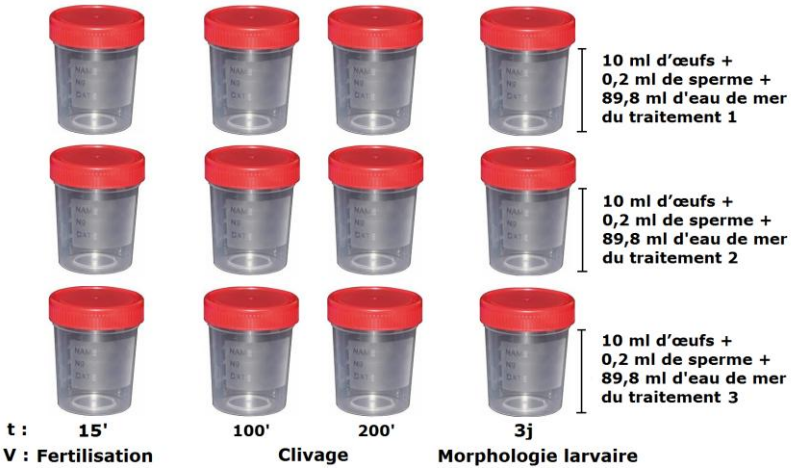
Cangrejo (28°24'N et 16°18'O) sur l'île de Ténérife en Espagne. Les individus ont eu un diamètre moyen de test de 45,8 mm (min = 38 mm ; max = 59 mm).

Pour induire la ponte des individus, nous avons préparé un litre de solution de chlorure de potassium (KCl). Ensuite les oursins ont été injectés avec 2-6 ml du KCl, dans la membrane péristomiale. Et lors de la mise en libération des produits génitaux (entre 10 et 20 minute après l'injection), les oursins ont été placés sur des récipients indépendants remplis à raz bord d'eau de mer, avec le pôle aboral vers le bas de façon à ce qu'il soit immergé (Fig. 2B). La durée d'émission de gamètes a été d'environ deux heures, temps à partir duquel, nous avons commencé les deux expériences suivantes. Nous avons utilisé les produits sexuels de quatre femelles et quatre mâles pour mettre en œuvre les deux expériences. Les gamètes ont été mélangés afin de représenter une population réelle telle qu'en milieu naturel.

**Figure 2. A.** Adultes de *Paracentrotus lividus* collectés pour l'induction de la ponte. **B.** Emission des produits génitaux (ovotides en orage et sperme en blanc) provoquée par l'injection du KCl.

## 3.3 Expérience 1 : Effet de l'acidification et du réchauffement de l'eau de mer sur la fécondation et le développement larvaire précoce de *Paracentrotus lividus*

L'effet de l'acidification et du réchauffement de l'eau de mer a été testé au laboratoire, de façon séparée, en utilisant la même méthodologie, basée principalement sur (Kurihara & Shirayama 2004). Nous avons mis 10 ml d'œufs et 0,2 ml de sperme de *P. lividus*, dans 12 pots de 100 ml, contenant de l'eau de mer des différents traitements. Pour l'expérience avec le pH, l'eau expérimental a provenu de chacun des réservoirs (voir section 3.4.1 et 3.4.2) et pour l'expérience ave la température, nous avons mis les pots au bain marie aux différents températures (Fig. 3).




| | T (°C) | pH | Correspond à la valeur: |
|---|---|---|---|
| Traitement 1 | 19 | 8,0 | actuelle de la mer auprès de Ténérife (contrôle) |
| Traitement 2 | 20,5[1] | 7,7[2] | [1] prévue par l'IPCC pour l'année 2050 aux canaries |
| Traitement 3 | 22,5[2] | 7,4[3] | [2] prévue par l'IPCC pour l'année 2100 aux canaries<br>[3] prévue par l'Université de las Palmas de Gran Canaria pour l'année 2300 aux canaries |

**Figure 3.** Dessin expérimental pour mesurer l'effet du pH et de la température sur les variables (V) fécondation, clivage et morphométrie larvaire de *Paracentrotus lividus*; aux différents temps après l'insémination (t). Tableau descriptive sur les traitements de pH et de température en tant que facteurs.

### 3.3.1 Taux de fécondation et taux de clivage

Quinze après l'insémination (MAI), nous avons pris un pot de chacun des 3 traitements (température/pH). Nous y avons ajouté, 1 ml de formaldéhyde 4% pour fixer les échantillons avant le déclenchement du clivage. La même procédure a été réalisée à 100 et 200 MAI afin de fixer les échantillons aux stades précoces de clivage et aux stades plus tardifs de développement, respectivement.

Pour déterminer le taux de fécondation et le taux de clivage, nous avons pris au hasard 6 aliquotes de 300 œufs pour chacun des trois traitements de température/pH. Ceci pour compter au microscope le nombre d'œuf fertilisés et aux différents stades embryonnaire.

### 3.3.2 Morphométrie des larves Pluteus

Pour mesurer l'effet de l'acidification et du réchauffement de l'eau de mer sur la morphométrie des larves précoces de *P. lividus*, nous avons incubé durant trois jours un pot pour chaque traitement (température/pH). Les pots d'incubation ont deux entrées, une pour maintenir le pH requis et une autre pour l'oxygénation. Trois jours après l'insémination, nous y avons ajouté 1 ml de formaldéhyde 4% pour arrêter le développement.

Ensuite nous avons observé au microscope 6 aliquotes de 10 larves et mesuré (1) la longueur totale (LT), (2) la longueur du corps (LC) et (3) la Longueur des bras post-oraux (LB) (Fig. 4).

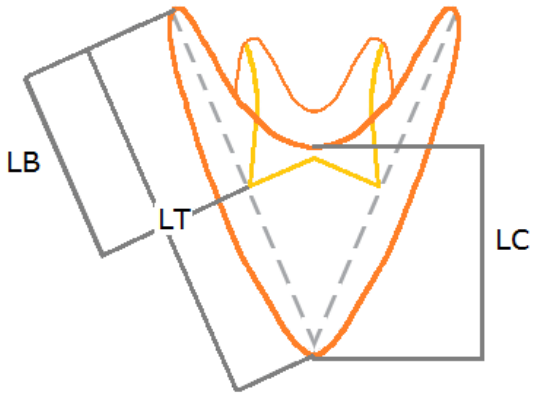



**Figure 4.** Mesures morphométriques prises sur la larve à quatre bras de *Paracentrotus lividus*. LT : Longueur totale ; LC : Longueur du corps ; LB : Longueur des bras post-oraux. Image modifiée provenant de Kurihara & Shiriyama (2004).

### 3.3.3 Traitement de données

L'analyse statistique de données a été réalisée à l'aide du logiciel statistique PRIMER 6 v. 6.1.11 & PERMANOVA+ v. 1.0.1. Nous avons décidé d'utiliser PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance) car c'est un essai semi-paramétrique basé sur les dissimilarités entre observations. Cela permet de tester des réponses simultanées ou des interactions d'une ou plusieurs variables avec un ou plusieurs facteurs. Et ce, en utilisant le dessin expérimental d'un ANOVA, et n'importe quelle mesure de distance et des méthodes de permutation (Anderson et al. 2008).

Le tableau 1 illustre pour chaque variable les facteurs et traitements qui lui correspondent, ainsi que l'analyse statistique utilisée. En résumé nous avons deux expériences : l'une qui utilise comme facteurs le pH et le temps ; et l'autre qui utilise la température et le temps. Les variables ainsi que les analyses statistiques ont été les mêmes pour ces deux expériences.

**Tableau 1.** Description d'analyses statistiques utilisées en fonction des variables et des facteurs.

| Variables | Facteurs | Traitements | Analyses statistiques |
|---|---|---|---|
| Taux de fécondation | pH / T | 8,0 / 19<br>7,7 / 20,5<br>7,4 / 22,5 | PERANOVA à deux voies (univariée à deux facteurs) |
| | temps | 15'<br>100'<br>200' | |

… continuation tableau 1

| Variables | Facteurs | Traitements | Analyses statistiques |
|---|---|---|---|
| Taux d'œufs à 2 blastomères<br>Taux d'œufs à 4 blastomères<br>Taux d'œufs à ≥ 8 blastomères | pH / T<br><br><br>temps | 8,0 / 19<br>7,7 / 20,5<br>7,4 / 22,5<br>15'<br>100'<br>200' | PERMANOVA à deux voies (multivariée à cinq variables et deux facteurs) |
| Longueur totale<br>Longueur des bras post-orale<br>Longueur du corps | temps | 15'<br>100'<br>200' | PERMANOVA à une voie (multivariée à trois variables et un facteur) |

## *3.4* Expérience 2 : Effet de l'acidification de l'eau de mer sur le développement larvaire planctonique de *Paracentrotus lividus*

### 3.4.1 Conditionnement de l'eau

Nous avons construit trois réservoirs d'eau de mer filtrée à utiliser pour les trois traitements (8,0 ; 7,7 ; 7,4) de pH différents. Tous les réservoirs portent les mêmes équipements et dessin (Fig. 5) afin de maintenir les conditions physico-chimique de l'eau ainsi qu'une bonne circulation. Chaque réservoir est composé de deux tanks d'une capacité de 300 l, placé l'un au-dessus de l'autre.

La circulation commence dans le tank inférieur lorsque celui-ci est remplit avec de l'eau filtrée, provenant de l'Institute Océanographique Espagnol. L'eau est envoyée par une pompe dans un thermostat Hilea HC-300A préprogrammé à la température requise. Ensuite elle est déversée dans ce même tank où se trouvent des filtres de cristaux. A l'aide d'une autre pompe, l'eau sort du tank inférieur et passe par le système de filtrage. Celui est composé de trois filtres dans l'ordre indiqué ci dessous (Fig. 5):

1. Filtre de papier de 50µm, qui a pour but d'enlever les particules grossier
2. Filtre de papier de 10µm, qui a pour but d'enlever les particules plus fines
3. Filtre UV Sterilizer UV AS-11W, qui a pour but d'éliminer les microorganismes restants.

L'eau sortante des filtres est alors dépourvue de particules inférieures à 10µm et d'organismes vivants. Elle est incorporée au tank supérieur à partir duquel elle est déversée à nouveau au tank inférieur à travers d'un trou dans la base. Dans le tank supérieur, il y a une structure en méthacrylate qui porte 15 béchers en plastique d'une capacité de 2l chacun. Les béchers sont remplit avec de l'eau provenant du filtre UV et contiennent les larves. Chaque bécher constitue une réplique du traitement. Au-dessus de ces béchers, se trouve un système de

simulation de mouvement aquatique, qui consiste en une structure en PVC qui porte 15 palettes, chacune placées à l'intérieur de chaque bécher. Un moteur externe assure le mouvement de cette structure. Ce système maintient l'aération au sein des béchers (Fig. 6).

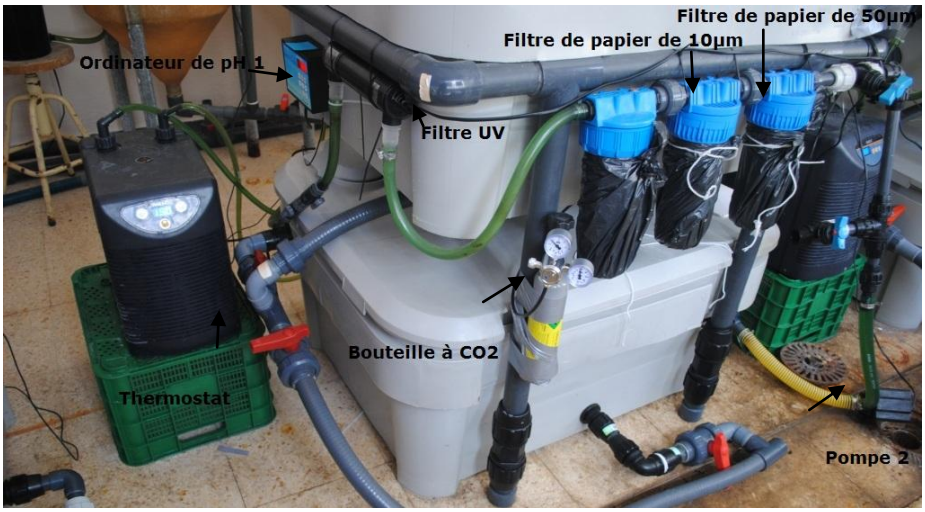



**Figure 5.** Réservoir d'eau avec ses deux tanks, ses systèmes filtrants et régulants et un de ses sets Aqualine.

### 3.4.2 Contrôle du pH et niveau de saturation de calcite et d'aragonite

Pour contrôler le pH de l'eau contenue dans chaque réservoir, nous avons deux sets complets Aqualine pour engraissement $CO_2$. Nous utilisons un set pour injecter du $CO_2$ au tank inférieur (Fig. 5) et l'autre set pour injecter du $CO_2$ à chaque bécher à travers le système de régulation du $CO_2$ (Fig. 6). Pour mesurer et contrôler le pH nous avons deux ordinateurs de pH Aqua Medic commandés par des microprocesseurs. L'un qui mesure le pH du tank inférieur et l'autre pour mesurer les béchers du tank supérieur.

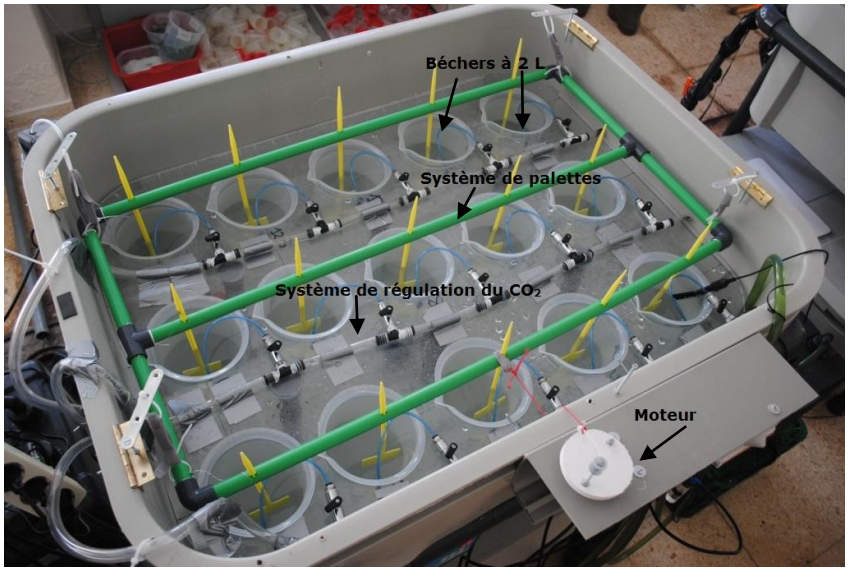



**Figure 6.** Tank supérieur avec ses systèmes de palettes et de régulation du $CO_2$, ses 15 béchers et son moteur.

Toutes les 4 heures, nous avons pris deux mesures de pH de l'eau contenue dans les béchers. La dernière mesure ayant lieu vers 22h. Pour chaque traitement (cf. Fig. 5), le rang de variation du pH est de ± 0,5 de telle sorte que si la mesure de l'un de ces béchers n'est pas dans ce rang, nous procédons à réguler le pH indépendamment dans les béchers concernés.

Nous avons calculé les $\Omega_C$ et $\Omega_A$ de l'eau de mer contenue dans les trois réservoirs à l'aide du logiciel $CO_2$ SYS (Lewis & Wallace 1998). Pour cela il a fallu déterminer l'alcalinité totale de l'eau de mer en utilisant un équipement de titrage automatique Methrohm 665 Dosimat à cellule ouverte et un pHmètre Methrohm 826 pH mobile. Ceci correspond à la méthode SOP 3b (Dickson et al. 2007).

Ainsi, l'alcalinité totale est définie par le nombre de moles d'ion hydrogène équivalant à l'excès d'accepteurs d'électrons sur les donneurs de protons dans 1 kilogramme d'eau de mer. Le principe : Une quantité connue d'eau de mer est placée dans une cellule ouverte où elle est titrée avec une solution d'acide chlorhydrique. L'échantillon d'eau de mer est d'abord acidifiée à un pH d'entre 3,5 et 4,0 avec une aliquote unique de titrant. Ensuite, la solution est agitée pendant 6 minutes, ce qui permet au $CO_2$ formé de s'échapper. L'évolution du titrage est surveillée en utilisant une électrode de pH en verre. L'alcalinité totale est numérisée à partir du volume de titrant et des calculs correcteurs.

### 3.4.3 Alimentation des larves

Les larves ont été alimentées tous les jours avec la microalgue *Rhodomonas lens* Pascher 1913. Pour préparer la culture algale, nous avons mis dans l'autoclave une fiole de 200 ml remplie d'eau de mer d'une salinité comprise entre 35 et 37. Lorsque l'eau de mer est stérile, nous avons y ajouté 0,5 ml de *R. lens* et 0,2 ml du milieu de culture F/2 enrichit de Guillard (Salas-Garza 2005). Les larves ont été nourries à partir des 72 heurs où la bouche des larves est formée. La concentration de *R. lens* était de 2 000 cellules $ml^{-1}$ (voir les calculs dans l'annexe 3 – 10.2.), ce qui correspond à la concentration optimal pour la culture larvaire de *P. lividus* (Lopez et al. 2011) et coïncide avec les valeurs actuelles du picoplancton de l'eau de mer (Baltar et al. 2009).

### 3.4.4 Bio-essais

Afin de déterminer l'effet du pH sur le développement larvaire des oursins, nous avons testé trois traitements de pH (8,4, 7,7 et 7,4) avec des conditions de température, salinité et nourriture constantes pendant le cycle de vie planctonique de *P. lividus*. Nous avons mélangé les produits génitaux. Lorsque le taux de fécondation a été supérieur à 95%, nous avons filtré (maille de 50 µm) les œufs fécondés avec de l'eau de mer pour éliminer les impuretés. Puis, nous avons divisé le volume filtré en trois parties qui ont été transposées chacune

dans un cône avec de l'eau de mer aux différents pH. Nous avons patienté deux jours pour que les premières larves se développent dans les cônes. Finalement, nous avons semé les larves dans les verres de chaque réservoir afin d'obtenir une densité de 5 larves $ml^{-1}$. Les calcules sont détaillés dans l'annexe 3 – 10.2.2.

Les recomptages de densité et les mesures de morphométrie de larves ont été effectués de façon intercalés. Un jour été dédié au recomptage de densité, le suivant aux mesures de larves, et ce pendant toute la durée de l'expérience. Au total nous avons effectué ces recomptages aux 10 moments différents. Afin de calculer la densité larvaire, nous avons recompté la quantité de larves présentes dans 3 aliquotes de 1 ml par verre. Ensuite les densités des 15 verres par traitement on été moyennées par temps de mesure afin d'obtenir l'évolution de la densité au cours du temps par traitement de pH.

Concernant la morphométrie, nous avons photographié 2 larves par verre et ultérieurement nous avons mesuré la longueur des bras post-oral à l'aide des photographies et du logiciel ImageJ. De façon similaire aux calculs des densités, nous avons moyenné la longueur de bras post-oraux par verre et ensuite par traitement. Aussi bien pour la densité comme pour la longueur, nous avons testé une PERANOVA à 1 voie et deux facteurs (ph et temps de mesure).

La routine journalière comprenait la mesure des paramètres physico-chimique de l'eau, comme la salinité, la température et le pH, ainsi que l'alimentation de larves et la vérification de toutes les installations (circulation d'eau, mouvement de palettes, flux de $CO_2$). Une fois par semaine, l'eau des béchers est changée à l'aide d'un filtre à 50 µm.

# 4 RESULTATS

## 4.1 Expérience 1 : Effet de l'acidification et du réchauffement de l'eau de mer sur la fécondation et le développement larvaire précoce de *Paracentrotus lividus*

### 4.1.1 Taux de fécondation

L'interaction des facteurs température et temps après l'insémination (TAI), ainsi que l'interaction du pH et le TAI a résulté très significative (p-perm = 0,001). C'est-à-dire que l'influence de la température et du pH sur le taux de fécondation (TF) varie considérablement avec le temps depuis l'insémination. Nous voyons dans le test de contraste deux à deux, qu'à 15 minutes après l'insémination

(MAI), le TF varie significativement entre tous les traitements de température étant la combinaison 19-22,5 °C la plus différent. Ceci est également applicable aux traitements de pH (p-MC = 0,001) (Annexe 2 - tableau 1 et 2). La fécondation à 15 MAI a été définie para la présence de la membrane de fécondation (Fig. 10).

A 15 MAI nous constatons deux tendances claires : (1) le TF augmente légèrement avec la température et (2) il décroit considérablement aux pH acides. A température contrôle (19°C) le TF est de 97,9% et à 22,5 °C augmente jusqu'à 99,5%. En revanche au pH contrôle, 97,4% d'œufs sont fertilisés, tandis qu'à pH 7,4, seulement 67,% (Fig. 7). A 100 et 200 MAI uniquement le taux fécondation à pH 7,4 est très significativement différent (Annexe 2 - tableau 1 et 2).

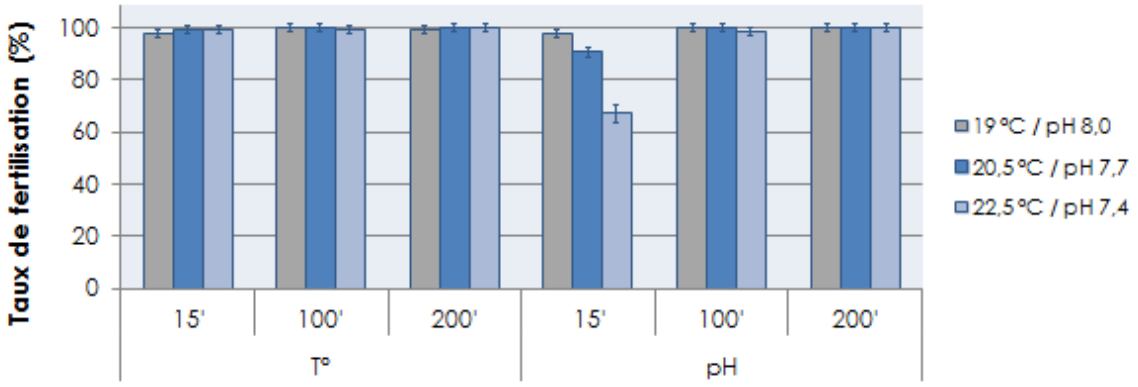



**Figure 7.** Taux moyenne de fécondation aux différents temps après de l'insémination pour les traitements (Trait) de température et de ph.

### 4.1.2 Taux de clivage

L'influence de la température et du pH sur le taux d'œufs aux différents stades de clivage, varie considérablement avec le temps depuis l'insémination, car l'interaction des facteurs a été significative (p-perm = 0,001). D'après les tests de contrastes deux à deux, les différences entre tous les contrastes des traitements sont significative (p-perm = 0,001) (Annexe 2 – tableau 3 et 4).

En ce qui concerne l'expérience avec le facteur température, plus l'eau est chaude, plus importante le taux d'œufs clivés, ce qui a été à 100 MAI >95% et à 200 MAI >98%. Quant à l'expérience avec le facteur pH, plus l'eau de mer devient acide, moins nous trouvons des œufs non clivés. Au pH contrôle à 100 MAI le taux d'œufs clivé est de 76%, et il décroit jusqu'à 8% à pH 7,4. A 200 MAI contrôle, le taux d'œufs clivé est de 87%, et il diminue à 25,3% à pH 7,4 (Annexe 1 – tableau 2).

L'Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) (Fig. 8 et Fig. 9) montre la formation de deux groupes bien différenciés en fonction du TAI, tant pour l'expérience avec la température que celle avec le pH, ce qui représente

l'évolution embryonnaire au cours du temps. Au sein des ces groupes, nous voyons clairement des sub-groupements correspondant aux différents traitements, soit de pH soit de température.

Plus l'eau est chaude et plus le temps avance, plus importante est la proportion d'œufs aux stades de clivage avancés. Nous remarquons qu'au traitement contrôle, à 100 MAI la plupart des œufs sont divisés en 2 blastomères et à 200 MAI en 8 blastomères. Cependant à 100 MAI, lors du réchauffement de l'eau, notamment à 22,5 °C, la plupart des œufs sont passés au stade de développement suivant à 4 blastomères (Fig. 8). Ce traitement a été significativement différent du reste (p-perm = 0,001).

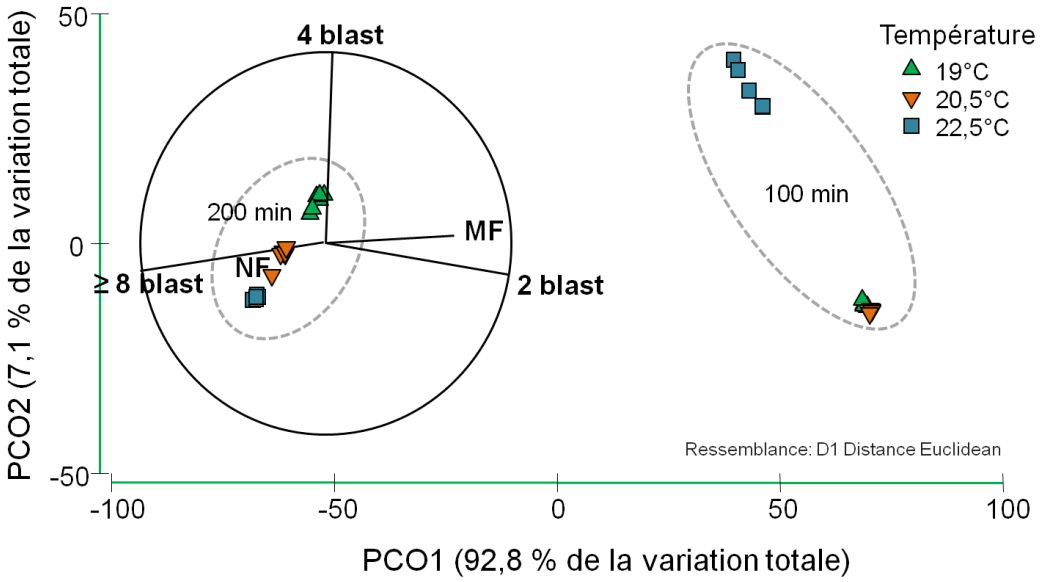



**Figure 8.** Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) indiquant la proportion d'œufs aux cinq stades de développement selon trois traitements de température aux deux laps de temps après l'insémination. blast : blastomère ; NF : œufs non fertilisés ; MF : œufs avec membrane de fécondation.

En autre, nous voyons qu'à 100 et 200 MAI, le stade normal de développement est, respectivement, à 2 et à ≥8 blastomères. Mais plus l'eau s'acidifie, plus importante est la proportion d'œufs n'ayant pas démarrés le clivage (Fig. 9). Ainsi, la proportion d'œufs divisés en ≥8 blastomères décroit de ~67% à ~8% à 100MAI ; et de ~82% à 17% à 200 MAI (Annexe 1 – tableau 2).

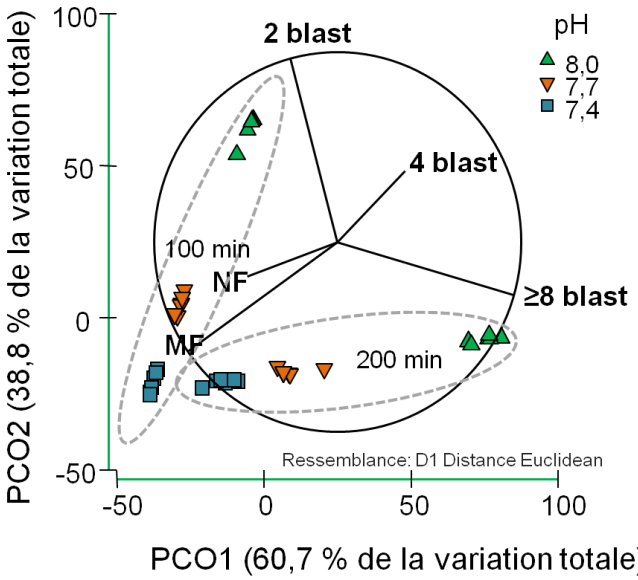



**Figure 9.** Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) indiquant la proportion d'œufs aux cinq stades de développement selon trois traitements de pH aux deux laps de temps après l'insémination. blast : blastomère ; NF : œufs non fertilisés ; MF : œufs avec membrane de fécondation.

Il est indiqué, dans la figure 10, un œuf non fertilisé et les différents stades de développement embryonnaire, à partir de la fécondation et première division cellulaire jusqu'au stade à plus de 16 blastomères.

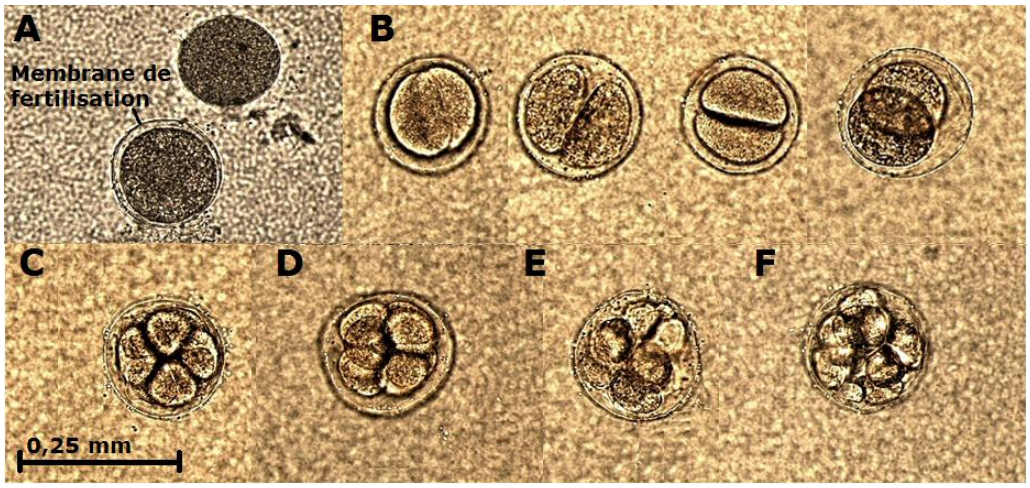



**Figure 10.** Développement embryonnaire de Paracentroutus lividus à pH et température control. A. Œufs non fertilisé (au-dessous) et fertilisé avec sa membrane (en-dessus) ; B. Différents type d'œufs à 2 blastomères ; C. Œufs à 4 blastomères ; D. Œufs à 8 blastomères ; E. Œufs à 16 blastomères ; F. Œufs à plus de 16 blastomères.

### 4.1.3 Morphométrie larvaire

L'influence de la température et du pH est significative sur les trois longueurs mesurées (p-perm = 0,001). Le test de contraste deux à deux signale des différences significatives entre les traitements de température et entre ces de pH

(Annexe 2 – Tableau 5 et 6). Encore une fois, l'effet de ces deux facteurs est opposé.

La PCoA pour la température indique que plus la température est élevée, plus la larve est grande. Lors du réchauffement de l'eau les trois longueurs mesurées tendent à augmenter. Par exemple, à 22,5 °C la longueur moyenne total (LMT) des larves augmente 11%. La dispersion des observations dénote une grande variabilité des tailles, notamment au sein des traitements 20,5 °C et 22,5 °C, ce qui contribue au chevauchement de ses observations (Fig. 11).

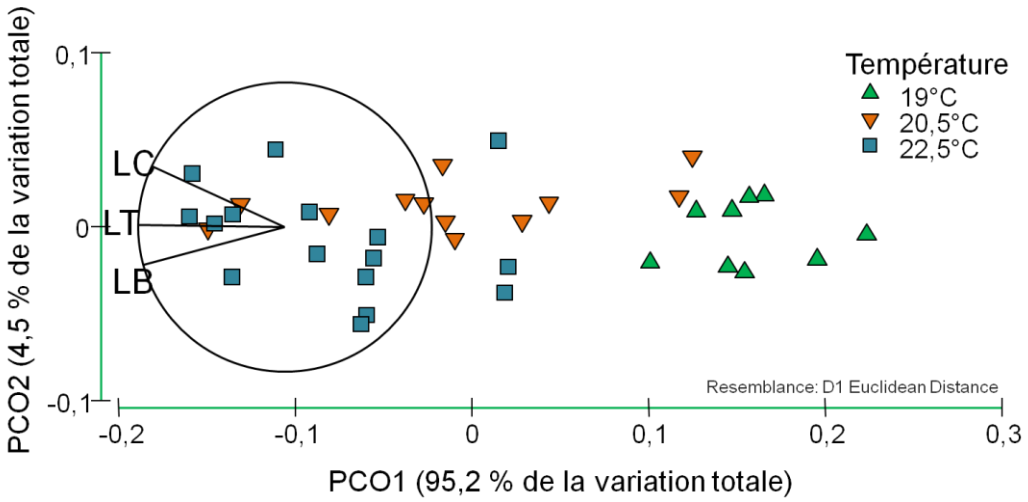



**Figure 11.** Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) indiquant le groupement de tailles larvaires en fonction de la température. LC : Longueur du corps ; LT : Longueur total ; LB : Longueur de bras post-oraux.

D'autre, la PCoA du pH montre des groupements plus évidents en fonction des traitements. Plus le pH est acide, plus la larve est petite. La plus faible dispersions des observations, notamment à pH 7,4 pourrait indiquer que l'effet du pH s'exerce sur une fraction plus grande de larves (Fig. 12). Par exemple, la LMT atteint son minimum à pH 7,4, avec un décrément de 56% par rapport au contrôle. Il convient de noter le non-développement des bras post-oraux à pH 7,4, ce qui en plus met en évidence un effet plus important du pH sur cette mesure que sur les autres. Pour cette raison, nous avons choisit la longueur de bras post-oraux pour évaluer l'effet du pH sur la larve planctonique dans l'expérience 2 (Annexe 1 – tableau 3).

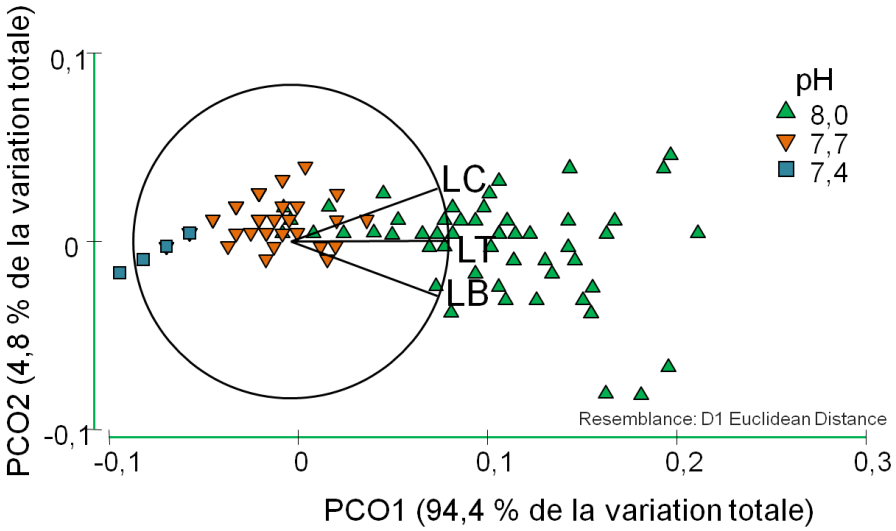



**Figure 12.** Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) indiquant le groupement de tailles larvaires en fonction du pH. LC : Longueur du corps ; LT : Longueur total ; LB : Longueur de bras post-oraux

La figure 13 montre quelques exemples sur le développement larvaire en fonction du pH. Etant donné que le microscope était en réparation, nous n'avons pas pu prendre de photos correspondantes au développement larvaire en fonction de la température.

**Figure 13.** Morphométrie larvaire en fonctions du pH après incubation de trois jours.

## 4.2 Expérience 2 : Effet de l'acidification de l'eau de mer sur le développement larvaire planctonique de *Paracentrotus lividus*

### 4.2.1 Physico-chimique de l'eau

Nous avons mesuré de façon journalière des paramètres physico-chimique de l'eau des réservoirs. Nous avons également pris de mesures journalières du pH de l'eau contenue dans les 45 béchers. Par rapport aux mesures des réservoirs, les trois paramètres mesurés se sont maintenu relativement constants. La salinité a été de ~38 et la température de ~19°C. Le pH des tanks et de béchers a maintenu les valeurs expérimentales pour les trois traitements avec des écart-types plutôt petits (Tableau 2).

D'après l'alcalinité totale nous avons calculé les niveaux de saturation de calcite et aragonite ($\Omega_C$ et $\Omega_A$) de l'eau de mer de chaque réservoir (Annexe 3 – 10.2.1). Ainsi, par rapport aux valeurs référentiel pour l'eau de mer océanique, nous avons obtenu des $\Omega_C$ et $\Omega_A$ très similaires: 5.6 ± 0,2 et 3.6 ± 0,2, respectivement (Santana-Casiano et al. 2001).

**Tableau 2.** Valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques de l'eau des réservoirs et pH des béchers. $\Omega_C$ niveaux de saturation de calcite ; $\Omega_A$ niveaux de saturation d'aragonite.

| | Salinité | Tempé-rature | pH tanks | pH béchers | Alcalinité totale | $\Omega_C$ | $\Omega_A$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Réservoir A | 37,82 ± 0,22 | 18,90 ± 0,34 °C | 8,06 ± 0,05 | 8,11 ± 0,02 | 2932 ± 79,20 µmol $kg^{-1}$ | 6,10 ± 0,42 | 3,96 ± 0,28 |
| Réservoir B | 37,87 ± 0,26 | 18,72 ± 0,61 °C | 7,71 ± 0,04 | 7,73 ± 0,03 | 2535 ± 272,94 µmol $kg^{-1}$ | 2,41 ± 0,26 | 1,56 ± 0,17 |
| Réservoir C | 37,97 ± 0,24 | 19,01 ± 0,72 °C | 7,44 ± 0,05 | 7,45 ± 0,03 | 3152 ± 0,00 µmol $kg^{-1}$ | 1,80 ± 0,21 | 1,17 ± 0,01 |

### 4.2.2 Morphométrie larvaire

La combinaison des facteurs ne semble pas affecter la longueur moyenne de bras post-oraux (LMB) (p-perm = 0,11), mais si l'effet de facteurs indépendamment. Le test de contraste deux à deux indique que la LMB au cours de temps est différente entre les temps et entre tous les traitements de pH, étant la différence à pH 7,4 la plus significative (Annexe 2 – tableau 8).

De façon générale, les larves augmentent leur taille (Fig. 15) et sa complexité morphologique (Annexe 1 – figure 1) au cours de temps quoi qui ce soit le traitement de pH. Cependant cette augmentation est plus lente à pH le plus acide. Contrairement à ce que nous attendons, la LMB à été relativement plus importante à pH 7,7 qu'au pH control. Il convient de noter qu'à pH 7,4 nous avons observé une variété de malformations qui incluent des bras manquants, épaissies, tordue, des corps non définies et asymétriques… qui sont illustrées dans l'annexe 1 – figure 2).

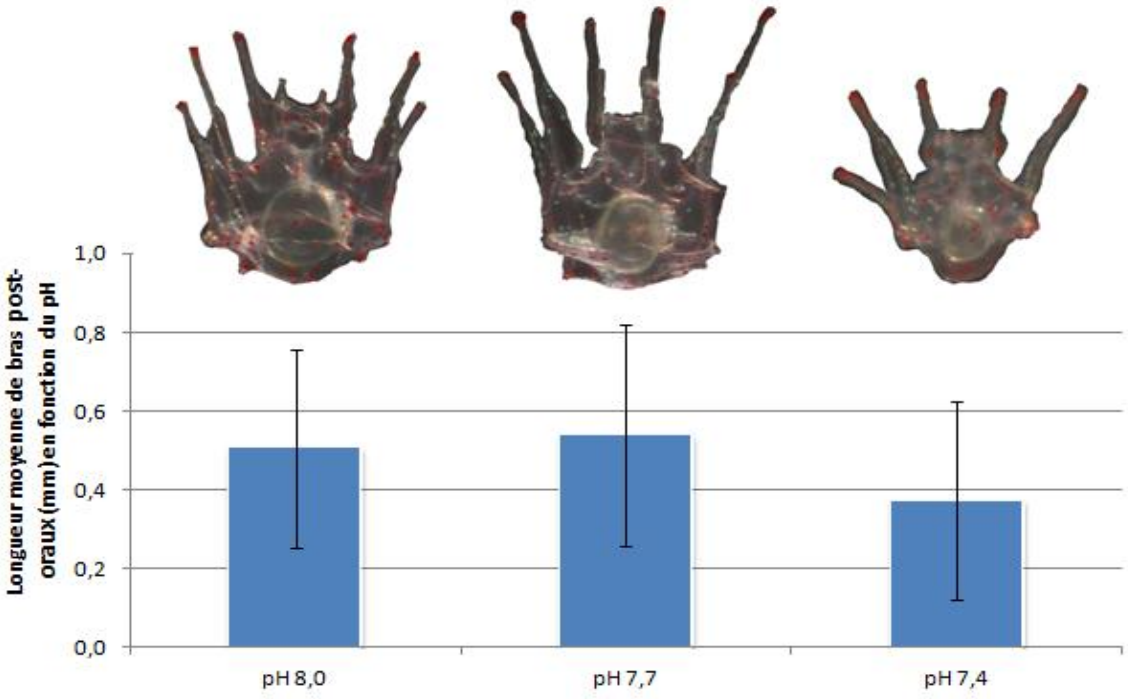



**Figure 15.** Evolution de la longueur moyenne de bras post-oral en fonctions du pH.

Au $t_1$, la larve Pluteus à 4 bras (deux préorales et deux post-orales) et elle présente une LMB de 0,142 mm. Environ aux deux semaines suivantes ($t_5$) la LBM est de 0,618 mm et les larves plus développées présentent 6 bras (deux bras en plus post-dorsales, en plus). Cinq jours après ($t_7$) la LBM est de 0,715 mm et la larve a 8 bras (deux bras antérolatérales, en plus). Au $t_9$ la taille moyenne diminué de 0,770 à 0,703 mm dû à une réabsorption de bras. Le corps devient plus aplati et le rudiment apparaît à deux côté de l'estomac (Fig. 16 et Annexe 1 – figure 1).

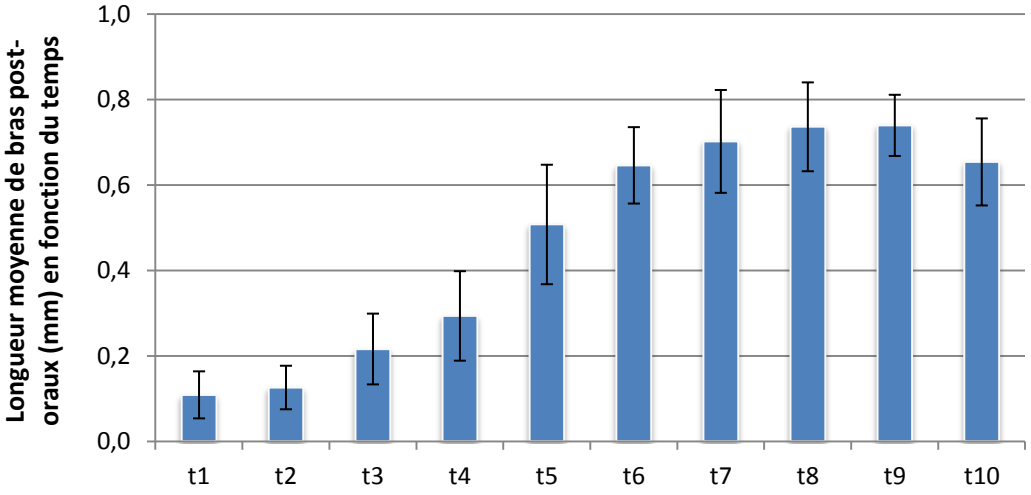



**Figure 16.** Evolution temporel de la longueur moyenne de bras post-oral. $t_1$-$t_{10}$ : 10 temps de mesures.

### 4.2.3 Survie et mortalité larvaire

Le moment où nous avons semé les 5 larves $ml^{-1}$ dans les béchers a été considéré comme le temps initial ($t_0$). Le lendemain à l'ensemencement, nous avons réalisé le premier recomptage de densité larvaire correspondant au $t_1$ et ainsi de suite. Au cours de 23 jours d'expérience nous avons réalisé un total de 10 mesures ($t_1$-$t_{10}$). L'interaction entre le pH et le TAI influence significativement la densité larvaire (p-perm = 0,001). Le test de contraste révèle des différences significatives entre tous les traitements de pH, plutôt à pH 7,4 (Annexe 2 – tableau 7).

La tendance générale est à la diminution de la densité au cours de temps, même au pH control (Fig.4). Nous avons observé qu'au $t_1$ il y a une première et dramatique baisse de la densité, avec des taux de mortalité de 19%, 41% et 73% à pH 8,0, 7,7 et 7,4, respectivement (Annexe 1 - tableau 4). Ensuite, nous avons identifié pour les trois traitements de pH l'existence d'une période de temps dans laquelle la densité larvaire n'a pas significativement varié. Cette période est entre $t_6$-$t_{10}$ à pH 8,0, entre $t_5$-$t_{10}$ à pH 7,7 et entre $t_1$-$t_7$ à pH 7,4. (Fig. 14 et Annexe 1 - tableau 4). A la fin de l'expérience ($t_{10}$) la densité a été considérablement faible avec des taux de survie de 4%, 1% et 3% à pH 8,0, 7,7 et 7,4, respectivement. Contrairement à ce que nous attendons, la survie au dernier moment n'a pas beaucoup varie entre les traitements de pH.

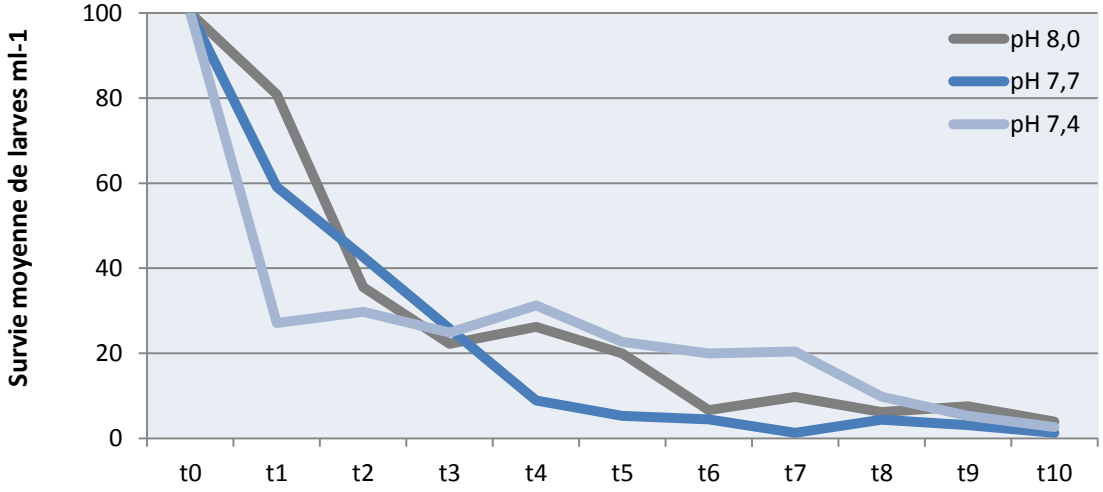



**Figure 14.** Densité moyenne de larves (larves $ml^{-1}$) au cours de temps en fonction du pH. t1-t10 : 10 temps de mesures.

# 5 DISCUSSION

## 5.1 Fécondation et embryogenèse de *Paracentrotus lividus* dans l'océan du future proche

Lors de la reproduction sexuelle de différents invertébrés marins, dont les échinides, les gamètes mâles et les gamètes femelles libérés doivent se rencontrer dans la colonne d'eau afin d'entreprendre un processus clé pour le développement de la vie et la persistance d'espèces: la fécondation. Avec les actuels et futurs changements des conditions physico-chimiques de l'océan, les gamètes seront dorénavant déchargés dans une eau plus chaude et plus acidifiée (Caldeira & Wicket, 2003, IPCC 2007), que celle connue auparavant. Les gamètes de *P. lividus* sont donc exposés à une diversité de facteurs de stress, naturels et anthropogéniques, qui peuvent compromettre la fécondation et l'embryogenèse.

Nous avons mis en évidence une réponse de type antagonique, de la température et le pH, sur la fécondation et l'embryogenèse, ce qui confirme nos hypothèses de départ. Ensuite, sont détaillés l'effet des facteurs de stress étudié sur la fécondation et l'embryogenèse de *P. lividus,* ainsi que l'implication au niveau écologique.

### 5.1.1 Effets du réchauffement

D'après nos expériences, le réchauffement de l'eau favorise sensiblement le succès de la fécondation chez *P. lividus* ; 1% pour l'année 2050 et 3% pour l'année 2100.

*P. lividus* est une espèce largement répandue. Elle a dû faire face aux changements de températures lors du passage à travers les différentes latitudes où elle est distribuée. Ces changements se manifestent également dans son habitat intertidal/eaux peu profondes, où elle est constamment exposée au régime tidal. Ainsi, les fluctuations naturelles auxquelles cet oursin a été soumis historiquement, peuvent être un indicateur de son important potentiel d'adaptation (Moulin et al. 2010). La sensibilité à la température est déterminée par l'œuf, et non par le spermatozoïde ; elle est héritée par le lignage materne lors de l'expression génomique dans les embryons (Fujisawa 1995). De ce fait, l'influence materne à la thermo-tolérance, détermine, lors de la fécondation, la plasticité adaptative des échinides, face aux températures changeantes (Fujisawa 1993, Bingham et al. 1997, Beckerman et al. 2002, Evans & Marshall 2005).

Parallèlement, Yamada & Mihashi (1998) ont découvert qu'immédiatement après la fécondation, il existe une période indépendante de la température. C'est-à-dire que pendant cette période (~10 minutes), la température n'exercerait aucun

effet sur le succès de la fécondation. Si c'est le cas, comment expliquer la légère intensification de la fécondation aux eaux plus chaudes? La réponse est physique : des températures croissantes diminuent la viscosité des fluides. Ceci implique qu'avant la rencontre des gamètes, le sperme est capable de nager plus facilement (augmentation de la vitesse de nage), et subséquemment la collision entre œufs et sperme (Hagström & Hagström, 1959, Kupriyanova & Havenhand 2005), ainsi que la réussite de la réaction de l'acrosome (Greenwood & Bennett, 1981, Mita et al. 1984) serait garantie. Toutefois, d'après les faibles chiffres d'augmentation du taux de fécondation, nous pouvons dire qu'elle n'est pas dramatiquement concernée par la température haute.

En revanche, l'embryogenèse, de qui dépend le subséquent développement larvaire, est plus sensible aux perturbations environnementales. La température, dicte le rythme de la division cellulaire et la génération du nombre approprié des blastomères requis pour une gastrulation normal (Byrne 2010). Au laboratoire la tendance était claire : plus la température augmente, plus le développement embryonnaire s'accélère (définit par le taux d'œufs aux différents stades de clivage au cours de temps). Au traitement contrôle à 200 minutes après l'insémination (MAI), 80% d'œufs étaient dans le stade de clivage à ≥ 8 blastomères. Pour une variation de +1,5°C et de +2,5°C, cette proportion augmente respectivement de 10% et 18%. Ainsi nous avons constaté l'effet plus notoire que la température exerce sur le développement embryonnaire, par rapport à celui sur la fécondation.

Cependant, une étude révèle que le développement embryonnaire de l'oursin *Heliocidaris erythrogramma* est fortement affaiblit à 24 °C et 26°C (Byrne et al. 2009). Cela pourrait indiquer que, lors de la reproduction, si les températures augmentent au-delà de la capacité d'adaptation thermique d'une espèce donnée, les embryons ne seraient pas capables d'atteindre le stade larvaire.

D'après Girard et ses collaborateurs, à Ténérife, *P. lividus* est capable d'avoir plusieurs pontes durant toute l'année, ce qui est contradictoire avec les populations les plus hautes latitudes (Girard et al. 2008). Cette caractéristique reproductive montre que la ponte, la fécondation et le développement (comm. pers. JC Hernández, Université de la Laguna) ont même lieu pendant les périodes les plus chaudes (température de surface de la mer en été : 23 et 25°C (Hernández et al. 2009). Le comportement de la fécondation et du clivage de cet oursin n'a pas seulement présenté une tolérance à l'augmentation de température, mais il a été légèrement meilleur aux traitements plus chauds. Ceci est dû au fait que le rang, de la valeur maximale de température de *P. lividus* aux Canaries, est supérieur à notre traitement le plus extrêmes (25 °C vs. 22,5°C). Il semble donc que les gamètes, produits dans des températures plus importantes, seraient légèrement plus performantes.

Ainsi nous voyons que la hausse des températures, prévues pour 2050 et 2100, permettrait la persistance de la population canarienne de *P. lividus*. En plus, la fécondation et le développement larvaire seraient légèrement favorisés. Jusqu'à

ce stade de vie, l'effet positif de se développer dans des eaux plus chaudes, faciliterait conséquemment le passage ultérieur à la phase larvaire planctonique.

### 5.1.2 Effets de l'acidification

Nos résultats indiquent que pour l'année 2100 (pH 7,7), le succès de la fécondation est affaibli 7%. A pH 7,4 (prédiction pour le 2300) cette réduction est beaucoup plus considérable, de l'ordre de 30% par rapport au contrôle.

L'histoire de vie précoce de beaucoup d'invertébrés intertidaux et d'eaux peu profondes, comme *Heliocidaris erythrogramma* (Byrne et al. 2009), est adaptée à une large gamme de pH (7,4 - 8,9) caractéristique de ce type d'habitats, dû à l'activité photosynthétique (Wooton et al. 2010, Moulin et al. 2010). D'après Hernandez-Diaz, il a été constaté dans la baie d'Abades à Tenerife une oscillation journalière du pH de ~0,2 unités. Les valeurs minimales sont observées pendant le matin (~3h-9h) en réponse au dégagement de $CO_2$ lors de la respiration. Les valeurs maximales sont observées le soir (14h-17h), suite au prélèvement du $CO_2$ lors de la photosynthèse (comm. pers. Hernandez-Diaz, Université de la Laguna). A Boca Cangrejo (point d'échantillonnage) La notable charge en matière organique pourrait déchaîner des oscillations similaires que celles reportées pour Abades. Dans ce cas-là, la communauté intertidale et d'eau peu profonde, dont *P. lividus*, serait adaptée aux fortes variations journalières de pH.

La tolérance au stress acide observée durant la fécondation, peut-être dû au fait qu'un bas pH est associé de façon naturelle à la reproduction des échinodermes (ex. : pH bas dans les gonades, la couverture d'œufs, la sécrétion acide d'œufs). En général, les gonades des invertébrés marins exhibent un pH bas qui sert à maintenir le sperme en repos avant sa mise en libération dans l'eau. L'hypercapnie (l'élévation de la pression partielle du $CO_2$) exerce un effet narcotique sur le sperme en réduisant son métabolisme et sa motilité (Mita et al. 1984). Mais comment le sperme est-il quand même capable de féconder l'œuf ? La membrane cellulaire du sperme est riche en guanylyl cyclase (mGC), un nucléotide qui sert à localiser et nager vers l'œuf. En autre, l'œuf garde dans sa couverture des peptides activateurs de sperme (SAP), qui une fois détecté par le sperme déclenche le mouvement du flagelle et favorise la motilité (Darszon et al. 2008). Le pH interne du sperme activé est au départ de 7,6 (Paucellier & Doree 1981), ce qui peut explique la tolérance au stress au traitement de pH 7,7, où le succès de fécondation est encore >90%. Cependant, l'hypercapnie que les gamètes rencontrèrent dans l'océan du 2300 (pH 7,4) restreindrait surement la chance de la rencontre sperme-œuf (Havenhand et al. 2008, Morita et al. 2010), en réduisant le taux de fécondation de 30%.

Malgré que l'acidification de l'eau implique un impact négatif sur la fécondation aux premiers moments, au bout de 100 MAI quasiment la totalité des œufs avait démarré le clivage (taux de fécondation>98%) (Fig.7). Cela indique que bien qu'il existe un délai de fécondation, les gamètes sont capables de se rejoindre et

encore plus d'initier le clivage même au pH le plus extrême (pH 7,4). Il semble donc que ce retard dû à l'hypercapnie n'aurait finalement pas une répercussion considérable sur la fécondation vu que de toute façon elle s'effectue. Cependant, au milieu naturel, les gamètes retrouvent des conditions telles que la dilution et la prédation, qui pourraient être ajoutées aux effets négatifs de l'acidification, en augmentant les probabilités que le sperme ne trouve pas un œuf et portant atteint la fécondation. En plus, en milieu naturel, la ponte de beaucoup d'animaux marins, dont *P. lividus,* a lieu dans des eaux peu profondes et très éclairées. A 30 et 60 m de profondeur, le rayonnement UVB et UVA, respectivement, altèrent naturellement le succès de la fécondation chez *Anthocidaris crassispina*. Plus le rayonnement est intense, plus importante est la formation d'espèces réactives d'oxygène (ROS) et donc plus lente est la motilité du sperme (Au et al. 2002, Lu & Wu 2005).

Byrne et ses collaborateurs ont réalisé une étude prenant compte l'action de la température, de l'acidification de la densité du sperme sur la fécondation de *Heliocidaris erythrogramma*. Ils ont observé que ni la température augmente le taux de fécondation, ni le pH le diminue, même pas dans la concentration de sperme la plus diluée .C'est seulement la concentration de sperme qui détermine la fécondation (Byrne et al. 2010). Ces résultats suggèrent que même si nous avons trouvé un effet séparé, de la température et du pH, sur le succès de la fécondation, il est possible que la combinaison de ces facteurs pourrait avoir un effet buffer sur la fécondation de *P. lividus*. En autre, la rencontre des gamètes, qui conduit à la réussite de la fécondation, serait donc limitée par la faible concentration de sperme que l'on repère dans la nature.

En ce qui concerne le développement embryonnaire, la réponse face à l'acidification océanique est plus évidente. La proportion d'œufs aux stades normaux de clivage varie en fonction du pH. Au traitement contrôle à 200 MAI, le plus commun c'est de trouver d'œufs clivés à ≥8 blastomères (82,1%). Mais, à pH 7,7 et 7,4, la quantité d'œufs au stade normal de clivage s'est réduite à 49% et 66%, respectivement. Ceci pourrait indiquer qu'à ce stade de développement, le rang de tolérance à la température est plus étroit. En plus, cela indique que même dans un future proche, l'effet retardant de l'acidification sur la fécondation se traduirait par des répercutions plus importantes sur le développement embryonnaire. Les conséquences d'un tel effet moduleraient : (1) l'assortiment des embryons aptes à atteindre le développement subséquent, avec des répercussions sur la taille de chaque stade; et (2) l'élargissement du temps que l'œuf doit dépenser dans la phase planctonique. Ce dernier sera traité plus en détails dans la section suivante.

De telle sorte, dans des conditions de laboratoire contrôlées, le faible effet que l'acidification semble avoir sur la fécondation et son effet notoire sur l'embryogenèse peuvent varier en milieu naturel, en agissant de façon synergique avec d'autres facteurs de stress (soit naturel ou anthropiques). Un exemple pourrait être l'interaction entre l'intensité lumineuse plus élevée (dû a la

rupture de la couche d'ozone), le réchauffement de la planète et l'acidification de l'océan ; trois facteurs de poids dans un scénario de changement climatique.

## 5.2 Développement larvaire de *Paracentrotus lividus* dans le plancton de l'océan future

### 5.2.1 Effets du réchauffement

La température a été identifiée comme l'un des principaux facteurs déterminant plusieurs processus biologiques, dont le développement larvaire (Fujisawa 1993, O'Connor et al. 2007, Byrne et al. 2011). La réponse de *P. lividus* face à l'augmentation de la température a été similaire à d'autres échinides et invertébrés, tels que *Tripneustes gratilla* (Sheppard-Brennand et al. 2010), *Echinometra lucunter* (Sewell & Young 1999), *Hemicentrotus pulcherrimus, H. depressus* et *Anthocidaris crassispina* (Fujisawa 1989). Nous avons remarqué que les larves ont des bras plus longs dans des eaux plus chaudes, ce qui indique que l'augmentation de +1,5 °C et +2,5 °C accélère le développement larvaire.

Dans la section 5.1.1 nous avons discuté de la tolérance des œufs et des embryons à l'augmentation de la température. Cette tolérance, pourrait également être exprimée dans les larves à travers des effets différés sur les traits d'histoire de vie. Ceci est appelé un « effet de cohorte », qui a lieu quand les conditions communes expérimentées par un groupe d'individus à un temps donné, crée des différences dans sa future performance (Beckerman et al. 2002). De cette façon, l'accélération du développement larvaire observée peut être la conséquence de la tolérance à l'augmentation de la température des stades de vie précédents.

Cependant, une étude a révélé que même si à 22 °C les larves de *P. lividus* accélèrent leur développement, les larves compétentes meurent en moins de 24 heures avec un taux de survie <5% (Privitera et al. 2011). L'accélération du développement observée a eu lieu dans une population de larves de 3 jours de vie. Il aurait été intéressant de pouvoir mesurer la survie sur des larves plus tardives, car même si les larves se développement plus rapidement, la survie serait déterminante pour le passage au prochain stade de vie : le recrutement.

De même, il a été observé que l'augmentation de la température réduit le temps dépensé par les larves dans le plancton, impliquant d'un côté une exposition moins longue aux prédateurs, et de l'autre, une limitation sur la dispersion (O'Connor et al. 2007). La réduction de la distance de dispersion peut être aggravée par d'autres effets de la température tels que la mortalité d'adultes (Girard-Berard et al. 2010) et les changements des courants océaniques (O'Connor et al. 2007), ce qui suggère que les populations déjà fragmentées deviendront plus disjointes, à cause de la faible connectivité génétique entre populations (Duarte 2007).

Ce n'est pas étrange que la population de cet oursin située la plus au sud soit bien plus adaptée aux conditions plus sévères de température de la mer que la population du nord. D'après nos résultats et les conditions de réchauffement globales prévues pour la fin du 21ème siècle, nous croyons que l'augmentation de la température de +2,5 °C, exercerait un effet positif *P. lividus* car il serait capable de ne pas seulement de résister mais aussi de se mieux développer. Cependant, le réchauffement aurait un effet indirect sur la dispersion et connectivité entre populations.

### 5.2.2 Effets de l'acidification

Nous avons vu que malgré que l'acidification soit responsable du délai du développement embryonnaire de *P. lividus*, les stades précoces de vie de cet oursin semblent être robustes à la diminution prévue pour la fin du 21ème siècle (pH 7,7) et même pour celle prévue fin du 23ème siècle (pH 7,4). Dans cette section, nous allons discuter l'effet de l'acidification sur le stade larvaire planctonique de *P. lividus*, qui a eu une durée de 23 jours en laboratoire.

Les embryons, qui ont été capables d'atteindre le stade larvaire planctonique sous des conditions acides et que nous allons rencontrer dans l'océan future, peuvent présenter de réponses adverses (Byrne 2010). Concernant notre 2ème hypothèse, nous avons ainsi mis en évidence que l'acidification agit sur la morphologie larvaire, notamment sur la réduction de la longueur moyenne des bras post-oraux (LMB), ce qui entraine un délai sur le développement.

Plusieurs études soulignent des effets délétères de l'acidification sur la calcification, à travers de la maigre disponibilité d'ions carbonate requise lors de la squelettogenèse (Kurihara & Shirayama 2004, Kurihara 2008, Dupont et al. 2008, Clark et al. 2009, O'Donnell et al. 2010, Sheppard-Brennand 2010). Nos valeurs des $\Omega_C$ et $\Omega_A$ ont été décroissantes avec le pH, indiquant que plus le $CO_2$ se dissout dans l'eau de mer, moins la concentration d'ions carbonates est importante. Etant donné l'excès d'ion $H^+$ et afin de maintenir la balance chimique, le carbonate est converti en bicarbonate en réduisant les $\Omega_C$ et $\Omega_A$ (Clark et al. 2009). De cette façon, l'injection de $CO_2$ dans les réservoirs a restreint la disponibilité de calcite et d'aragonite nécessaire à prélever lors de la formation des squelettes larvaires.

En fait, le squelette larvaire de *P. lividus* est formé dans une première phase par des cristaux de $CaCO_3$ ; dans une seconde phase ces cristaux sont transformés dans un précurseur de calcite appelée « $CaCO_3$ amorphe », qui, étant instable, devient finalement calcite cristallisée. La croissance et l'orientation des spicules ont lieu lors du passage $CaCO_3$ amorphe à calcite (Beniash et al. 1997). Considérant que le $CaCO_3$ amorphe se forme dans des solutions supersaturées en calcium et carbonate, l'exposition des larves dans des eaux sous saturée en carbonates, aurait probablement des répercutions sur la croissance et sur l'orientation des spicules. La conséquence d'un tel événement est corroborée sur

les larves du traitement le plus acide, où la réduction de 71% du $\Omega_C$ a conduit à la formation de larves remarquablement déformes (Annexe 1 – figure 2) avec un développement plus lent.

La réduction de la calcification conduit également aux variations de la survie et de la croissance larvaire (Clark et al. 2009). Nos résultats montrent que la phase larvaire planctonique de *P. lividus* entraine des taux de survie faibles. La mortalité larvaire a été importante plutôt au début ($t_1$), indiquant une réponse immédiate au choque acide, éliminant une quantité considérable d'effectifs. Ensuite, nous avons identifié une période où la densité larvaire, si bien faible (<10%), est resté relativement invariable dans tous les traitements de pH. Cela pourrait être lié au fait que dans cette période, la larve a déjà étendu la totalité de ses bras, en apportant de la complexité dans ses structures alimentaires. Ces dernières jouent un rôle déterminant pour la survie et l'habilité de nage (Strathmann 1971). Ainsi, pour une réduction de -0,7 unité de pH, le développement plus lent et les déformations sévères ne permettront sûrement pas que les larves se développent au-delà et les rendront plus susceptibles à mourir de famine.

Le retard du développement notamment à pH 7,4, signifie que la larve doit incrémenter le temps qu'elle dépense dans la colonne d'eau, en augmentant la probabilité de mortalité par prédation avant qu'elle soit capable de se fixer au substrat (O'Connor et al. 2007). En plus, la phase larvaire planctonique de plusieurs espèces est synchronisée avec le bloom de printemps (qui représente une source alimentaire) et donc, un délai du développement peut entrainer une inadéquation des rapports prédateur/proie ou nourriture/consommateur. Ceci peut conduire finalement à la métamorphose à un moment inappropriée (Reitzel 2004, Elkin & Marshall 2007, Dupont et al. 2010). De cette façon le rythme intrinsèque des processus biologiques est crucial pour maintenir la taille et la viabilité de la population.

Lors de la réduction de -0,3 unité de pH, la croissance larvaire a été même meilleure qu'au traitement contrôle ($LMB_{pH8,0}$ = 0,538 ± 0,282 ; $LMB_{pH7,7}$ 0,506 ± 0,251). Il n'existe pas de littérature avec des effets similaires, ce qui veut dire que nos résultats sont une nouveauté. Nous avons trouvé une seule publication où des effets positifs à pH 7,7 sont observées chez *P. lividus* et *Strongylocentrotus droebachiensis* mais au niveau du taux de recrutement (Dupont & Thorndyke 2008), et non sur la croissance larvaire. Nous voulons remarquer qu'il convient de noter que même si la prise de mesures a été arrêtée au 23$^{ème}$ jour, la culture de larves a continué plusieurs semaines. Au bout du 54$^{ème}$ jour, le nombre de recrues a été considérablement plus important à pH 7,7 avec 317 recrues contre 16 au contrôle. Si les larves ont pu se fixer au substrat à pH 7,7, il se pourrait que, en raison de la fluctuation quotidienne du pH dont/que nous n'avons pas encore mesuré, dans les eaux canariennes, il y ait des valeurs plus faibles que la moyenne (8,0). Il a été enregistré des valeurs de pH différentes à divers endroits des iles canaries (7,8 pour la Palma ; comm.

pers. Hernandez-Diaz, ULL), ce qui indiquerait une variation spatiale. Devant l'hétérogénéité des habitats et des écosystèmes existants aux Iles Canaries (Hernández et al 2009), il ne serait pas inhabituel de trouver des variations importantes du pH, au niveau spatio-temporel, qui étaient en train de moduler le développement des larves de *P. lividus*, même à des valeurs plus basses de ce qui a été reporté auparavant.

Les variations sur la survie et la croissance des larves peuvent entrainer des changements sur la structuration et le fonctionnement des écosystèmes. Des changements à cette échelle peuvent se déplacer, à travers des effets cascades, tout au long des réseaux trophiques et écosystèmes (Clark et al. 2009). C'est le cas de l'ophiuride *Ophiothrix fragilis*, un ingénieur d'écosystèmes, amplement distribuée dans l'Atlantique nord-est. Elle forme des lits très denses où elle représente plus de la moitié de la biomasse et qui héberge plus de 78 espèces (Lefebvre & Davoult 1997, Dupont et al. 2008). Après 8 jours d'exposition à un décrément du pH seulement de 0,2 unités, la mortalité de *O. fragilis* a été de 100%. Ceci implique la disparition pour l'année 2050 de l'écosystème de lit d'*O. fragailis* et des possibles changements majeurs dans les écosystèmes clés benthique et pélagique de l'Atlantique (Dupont et al. 2008).

D'autre part, dans un instant de temps concret, la même population in vitro de *P. lividus* a montré une structuration par tailles très variée. Par exemple au t10, correspondant au 23$^{ème}$ jour, nous avons trouvé des recrus et même des larves n'ayant pas développé 4 bras. Ceci nous indique des réponses individuelles face au stress acide que l'on peut interpréter comme une variation interspécifique. Des études ultérieures sur l'influence de la génétique parentale sont fondamentales pour comprendre la plasticité observée.

# 6 CONCLUSIONS

1. Dans l'océan du 21$^{ème}$ siècle, le réchauffement de l'eau en surface de la mer aurait un effet légèrement positif sur la phase de vie précoce de *Paracentrotus lividus*. Notre première hypothèse à été vérifié : l'augmentation de la température favorise le succès de la fécondation et accélère le développement embryonnaire et larvaire précoce de *P. lividus*. Il exhibe une notable tolérance thermique dû à un potentiel d'adaptation important qui a pris empreinte sur son ample distribution géographique le long de différentes latitudes. La fécondation, le clivage et le développement larvaire sont donc robuste à l'augmentation de +2,5 °C prévue. Cependant la réduction du temps dépensé par la larve dans le

pelagos est un effet négatif indirect, cela réduit la distance de dispersion et porte atteinte à la connectivité entre populations.

2. Concernant notre deuxième hypothèse, nos résultats expérimentaux ont été étonnants. L'effet de l'acidification prévu pour la fin du 23ème siècle (pH 7,4 pour les îles Canaries) a été clairement négatif, mettant en évidence un délai sur la fécondation et le développement embryonnaire et larvaire. Ce délai aurait dans la nature un effet indirect dans la mesure que l'augmentation du temps dans la vie planctonique entraine notamment un risque plus important de mortalité par prédation. De plus, les faibles niveaux de saturation mesurés, de calcite et d'aragonite, limitent la formation des squelettes calcaires, ce qui se traduit par des larves plus petites et avec de sévères déformations. Cependant la réponse à l'acidification du 2100 a été positive, sur le développement larvaire. Les larves exposées au pH 7,7 ont accéléré leur développement, étant même meilleur qu'au traitement contrôle.

3. La population de *P. lividus* plus méridionale serait capable de supporter les changements de température et de pH prévus pour la fin du 21ème siècle. Mais l'acidification du 23ème siècle aurait des répercutions dramatiques au niveau de la population. Puis, dû aux effets cascade dans le réseau trophique, nous nous attendons aux changements majeures au sein de communautés et d'écosystèmes.

4. Finalement, il y a un besoin urgent de développer des stratégies visant à fournir des solutions maniables et durables, dirigées à la conservation. A ce propos, les scientifiques jouent un rôle très important qui vise à élucider de nouvelles perspectives de recherche sur l'impact du changement climatique global prévu de se produire à la fin du 21ème siècle. Ces nouvelles perspectifs devraient considérer : (a) l'interaction de multiples facteurs de stress afin de répliquer de la meilleure façon les conditions naturelles ; (b) des espèces cibles provenant d'habitat diverses, afin de comparer avec les espèces intertidales adaptées aux fluctuations journalières de pH et température ; (c) des espèces non calcifiants pour déterminer des possibles gagnants et prédire la structuration future d'écosystèmes ; (d) la détermination du potentiel à l'adaptation des espèces, ainsi qu'à la résistance et à la résilience des populations ; (e) des études plus longues prenant en compte tout le cycle de vie et plusieurs générations afin de déterminer les effets transférés (Carryover Effects).

# 7 BIBLIOGRAPHIE


Anderson M, Gorley R, Clarke K (2008) PERMANOVA + for PRIMER: guide to software and statistical methods. PRIMER-E, Plymouth.

Au D, Chiang M, Tang J, Yuen B, Wang Y, Wu R (2002) Impairment of sea urchin sperm quality by UV-B radiation: predicting fertilization success from sperm motility. Mar Poll Bull 44: 583-589.

Baltar F, Aristegui J, Montero M, Espino M, Gasol J, Herndl G (2009) Mesoscale variability modulates seasonal changes in the trophic structure of nano and picoplankton communities across the NW Africa-Canary islands transition zone. Prog Ocean 83: 180-188.

Bartona E, Arístegui J, Tett P, Canton M, García-Braune J, Hernández-León S, Nykjaerf L, Almeida C, Almunia J, Ballesteros S, Basterretxea G, Escánez J, García-Weill L, Hernández-Guerra A, López-Laatzen F, Molina R, Montero MF, Navarro-Pérez E, Rodríguez JM, van Lenning K, Vélez A, Wilda K (1998). The transition zone of the Canary current upwelling region. Prog Ocean 41: 455-504.

Beckerman A, Benton T, Ranta E, Kaitala V, Lundberg P (2002) Population dynamics consequences of delayed life-history effects. Trend Ecol Evol 17(6): 263-269.

Beniash E, Aizenberg J, Addadi L, Weiner S (1997) Amorphous calcium carbonate transforms into calcite during sea urchin larval spicule growth. Proc R Soc Lond B 264: 461-465.

Bingham B, Bacigalupi M, Johnson L (1997) Temperature adaptations of embryos from intertidal and subtidal sand dollars (*Dendraster excentricus*, Eschscholtz). Northwest Sci 71: 108-114.

Boudouresque CF, Verlaque M (2007) Ecology of *Paracentrotus lividus*. In Lawrence JM (ed) Edible Sea Urchins: Biology and Ecology. Elsevier, Florida: 243-285.

Brook E (2009) Atmospheric carbon footprints? Nat Geosci new views 170-172.

Bulleri F, Benedetti-Cecchi L, Cinelli F (1999) Grazing by the sea urchins Arbacia lixula L. and *Paracentrotus lividus* Lam. in the northwest Mediterranean. Jour Exp Mar Biol Ecol 241: 81-95.

Byrne M (2010) Impact of climate change stressors on marine invertebrates life histories with a focus on the mollusca and echinodermata. In Henderson-Sellers Y (Ed) Climate alert: climate change monitoring and strategy. University of Sydney Press, Sydney: 142-185

Byrne M, Ho M, Selvakumaraswamy P, Hguyen H, Dworjanyn S, Davis A (2009) Temperature, but not pH, compromises sea urchin fertilization and early developement under near-future climate change scenarios. Proc R Soc B 279: 1883-1888.

Byrne M, Selvakumaraswamy P, Ho M, Woosley E, Nguyen H (2011) Sea urchin development in a global change hotspot, potential for southerly migration of thermotolerant propagules. Deep See Res II 712-719.

Byrne M, Soars N, Selvakumaraswamy P, Dworjanyn S, Davis A (2010) Sea urchin fertilization in a warm, acidified and high pCO2 ocean across a range of sperm densities. Mar Environm Res 69: 234-239.

Caldeira K, Wicket M (2003) Anthropogenic carbon and ocean pH. Nature 425: 365.

Cellario C, Fenaux L (1990) *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in culture (larval and benthic phases): parameters of growth observed two years following metamorphosis. Aquaculture 84: 173 -188.

Clark D, Lamare M, Barker M (2009) Response of sea urchin pluteus larvae (Echinodermata: Echinoidea) to reduced seawater pH: a comparison among a tropical, temperate, and a polar species. Mar Biol 156: 1125-1137.

Comeau S, Gorsky G, Jeffre R, Teyssie J, Gattuso J (2009) Impact of ocean acidification on a key Arctic pelagic mollusc (*Limacina helicina*). Biogeosciences 6: 1877-1882.

Crutzen PJ (2002) Geology of mankind. Nature 415-423.

Darszon A, Guerrero A, Galindo B, Nishigaki T, Wood C (2008) Sperm-activating peptides in the regulation of ion fluxes, signal transduction and motility. Int J Dev Biol 52: 595-606.

Dickson A (2010) Seawater carbonate chemistry. In Riebesell U, Fabry V,Hanson L, Gattuso J (eds) Guide to best practices for ocean acidification and data reporting. Publications Office of the European Union, Luxembourg: 17-40

Dickson A, Sabine C, Christian J (2007) SOP 3b: Determination of total alkalinity in sea water using an open-cell titration. In Dickson A, Sabine C, Christian J (eds) Guide to best practices for ocean $CO_2$ measurements (p. 191). PICES Special Publication 3:1-16.

Doney S, Fabry V, Feely R, Kleypas J (2009) Ocean acidification: the other $CO_2$ problem. Annu Rev Mar Sci 1: 169-192.

Duarte C (2007) Marine ecology warms up to theory. Trends Ecol Evol 22(7): 331-333.

Dupont S, Thorndyke M (2008) Ocean acidification and its impact on the early life-history stages of marine animals. In CIESM Workshop monographs n°36. Impact of acidification on biological, chemical and physical systems in the Mediterranean and Black Seas. CIESM, Monaco: (pp. 89-97).

Dupont S, Thorndyke M (2009) Impact of CO2-driven ocean acidification on invertebrates early life-history - What we know, what we need to know and what we can do. Biogeosci Discuss 6: 3109-3131.

Dupont S, Havenhand J, Thorndyke W, Peck L (2008) Near-future level of CO2-driven ocean acidification radically affects larval survival and development in the brittlestar *Ophiothrix fragilis*. Mar Ecol Prog Ser 373: 285-294.

Dupont S, Lundve B, Thorndyke M (2010) Near future ocean acidification increases growth rate of the lecithotrophic larvae and juveniles of the seastar *Crossaster papposus*. J Exp Zool 1-8.

Elkin C, Marshall S (2007) Desperate larvae: influence of deferred costs and habitat requirements on habitat selection. Mar Ecol Prog Ser 335:142–153.

Evans J, Marshall D (2005). Male-by-female interactions influence fertilization success and mediate the benefits of polyandry in the sea urchin *Heliocidaris erythrogramma*. Evolution 59: 106-112.

Feely R, Sabine C, Lee K, Berelson W, Kleypas J, Fabry V, Millero FJ (2004) Impact of anthropogenic $CO_2$ on the $CaCO_3$ system in the oceans. Science 305: 362-366.

Fujisawa H (1989) Differences in temperature dependence of early development of sea urchins with different growing seasons. Biol Bull 176: 96-102.

Fujisawa H (1993) Temperature sensitivity of a hybrid between two species of sea urchin differing in thermotolerance. Develop Growth Differ 35(4): 395-401.

Fujisawa H (1995) Variation in embryonic temperatures sensitivity among groups of sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrinus*, which differ in their habitats. Zool Sci 12: 583-589.

Girard D, Herrero A, Mora J, Hernández J, Brito A, González, N, Catoire JL (2008) Reproductive Cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) in its southern population limit (Canary Islands – eastern Atlantic). Gulf Mex Scien 26(2): 149.

Girard-Berard D, Piñeiro-Corbeira C, Hernández J, Brito A, Gonzalez N (2010) Talla de primera madurez y fecundidad del erizo de mar *Paracentrotus lividus* en Canarias. In XVI Simposio Ibérico de Estudios de Biología Marina. Universidad de Alicante, Alicante: 68.

Gosselin L, Qian P (1997) Juvenile mortality in benthic marine invertebrates. Mar Ecol Prod Ser 146: 265-282.

Greenwood P, Bennett T (1981) Some effects of temperature-salinity combinations on the early development of the sea urchin *Parachinus angulosus* (Leske) fertilization. J Exp Mar Biol Ecol, 51: 119-131.

Grosjean P, Spirlet C, Gosselin P, Vaïtilingon D, Jangoux M (1998) Land-based, closed-cycle echiniculture of *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinoidea: Echinodermata): a long-term experiment at a pilot scale. J Shellfish Res 17(5): 1523-1531.

Hagström B, Hagström B (1959) The effect of increases and decreased temperatures on fertilization. Exp Cell Res 16:174-183.

Harley CD, Randall Hughes A, Hultgren KM, Miner BG, Sorte CJ, Thornber CS, Rodriguez LF, Tomanek L, Williams SL (2006) The impact of climate change in coastal marine systems. Ecol Let 9: 228-241.

Havenhand J, Buttler F, Thorndyke M, Williamson J (2008) Near-future levels of ocean acidification reduces fertilization success in a sea urchin. Curr Biol 18: 651-652.

Hernández J, Clemente S, Sangil C, Brito A (2009) La degradación de los fondos marinos en Canarias. El Indiferente 29: 63-71.

Hoegh-Guldberg O, Mumby P, Hooten A, Steneck R, Greenfield P, Gomez E, Harvell CD, Sale PF, Edwards AJ, Caldeira K, Knowlton N, Eakin CM, Iglesias-Prieto R, Muthiga N, Bradbury RH, Dubi A, Hatziolos ME (2007) Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. Science 318: 1737-1742.

Hughes T, Baird A, Bellwood D (2003) Climate change, human impacts and the resilience of coral reef. Science 301: 929-933.

IPCC (2007) The fourth assessment report of the IPCC. Cambridge University Press, Cambridge.

Ishimatsu A, Dissanayake A (2010) Life threatened in acidic coastal waters. Coastal environmental and ecosystem issues of the East China Sea 283-303.

Kupriyanova E, Havenhand J (2005) Effects of temperature on sperm swimming behaviour, respirations and fertilization success in the serpulid polychaete, *Galeolaria casepitosa* (Annelida: Serpulidae). Invertebr Reprod Dev 48: 7-17.

Kurihara H (2008) Effects of $CO_2$-driven ocean acidification on the early developmental stage of invertebrates. Mar Ecol Prog Ser 373: 275-284.

Kurihara H, Shirayama Y (2004). Effects of increased atmospheric $CO_2$ on sea urchin early development. Mar Ecol Prog Ser 274: 161-169.

Lefebvre A, Davoult D (1997) Recrutement d'*Ophiothrix fragilis* (Echinoderme: ophiuride) en Manche orientale: Etude biométrique. J Res Oceanogr 22: 109-116.

Lewis E, Wallace D (1998) Program developed for $CO_2$ system calculations. ORNL/CDIAC-105. Oak Ridge, Tennessee: Carbon Dioxide Information Analysis Center. Last update: 15/12/2011 http://cdiac.ornl.gov/oceans/co2rprt.html

López C, García E, Clemente S, Mendoza J, Girard D, Hernández J (2011). Valoración de los efectos predecibles del cambio climático para las islas Canarias en el desarrollo larvario del erizo de mar *Paracentrotus lividus*. In Avaro M, Lo Russo V (eds) 1er Congreso Latinoamericano de Equinodermos Red Latinoaméricana de Equinodermos, Puerto Madryn: 63.

Lu X, Wu R (2005) UV induces reactive oxygen species, damages sperm, and impairs fertilization in the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. Mar Biol 148: 51-57.

McEdward L, Miner B (2007) Echinoid larval ecology. In Lawrence JM (ed) Edible sea urchins: Biology and ecology. Elsevier, Florida: 71-93.

Mita M, Hino A, Yasumasu I (1984) Effects of temperature on interactions between eggs and spermatozoa of sea urchin. Biol Bull 166: 68-77.

Morita M, Suwa R, Iguchi A, Nakamura M, Shimada K, Sakai K, Suzuki A (2010) Ocean acidification reduces sperm flagellar motility in broadcast spawning reef invertebrates. Zygote 18: 103-107.

Moulin L, Catarino A, Claessens T, Dubois P (2010) Effects of seawater acidification on early development of the intertidal sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816). Mar Poll Bull 62(1): 48-54.

O'Connor M, Bruno J, Gaines S, Halpern B, Lester S, Kinlan B, Weiss JM (2007). Temperature control of larval dispersal and the implications for marine ecology, evolution and conservation. Proc Natl Acad Sci USA 229: 493-506.

O'Donnell M, Todgham A, Sewel M, Hammond L, Ruggiero K, Fangue N, Zippay ML, Hofmann GE (2010) Ocean acidification alters skeletogenesis and gene expression in larval sea urchins. Mar Ecol Prog Ser 398: 157-171.

Orr J, Fabry V, Aumont O, Bopp L, Doney S, Feely R, Gnanadesikan A, Gruber N, Ishida A, Joos F, Key RM, Lindsay K, Maier-Reimer E, Matear R, Monfray P, Mouchet A, Najjar RG, Plattner GP, Rodgers KB, Sabine CL, Sarmiento JL, Schlitzer R, Slater RD, Totterdell IJ, Weirig MF, Yamanaka Y, Yool A (2005) Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. Nature 437: 681-686.

Paucellier G, Doree M (1981) Acid release at activation and fertilization of starfishes oocytes. Develop Growth Differ 23(3): 287-296.

Privitera D, Noli M, Falugi C, Chiantore M (2011) Benthic assemblages and temperature effects on *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* larvae and settlement. J Exp Mar Biol Ecol 407: 6-11.

Reitzel A, Miner B, McEdwar L (2004) Relationships between spawning and larval time for benthic marine invertebrates. Mar Ecol Prog Ser 280: 13-23.

Royal Society (2005) Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. The Royal Society, London.

Sabine C, Feely N, Gruber R, Key K, Bullister J, Wanninkho R, Wong CS, Wallace D, Tilbrook B, Millero FJ, Peng TH, Kozyr A, Ono T, Rios AF (2004) The oceanic sink for anthropogenic $CO_2$. Science 305: 367-371.

Salas-Garza A, Carpizo-Ituarte E, Parés-Sierra G, Martinez-Lopez R (2005) Producción de juveniles de erizo rojo *Strongylocentrotus franciscanus* (Echinodermata: Echinoidea) en Baja California, México. Rev Biol Trop 53(3): 345-355.

Santana-Casiano J, Gonzalez-Davila M, Lagler-Baquer L, Rodríguez-Somoza M (2001) Carbon dioxide system in the Canary regions during october 1995. Sci Mar 65(1): 41-49.

Sewell M, Young C (1999) Temperature limits to fertilization and early development in the tropical sea urchin *Echinometra lucunter*. J Exp Mar Biol Ecol 236: 291-305.

Sheppard-Brennand H, Soars N, Dworjanyn S, Davis A, Byrne M (2010) Impact of ocean warming and ocean acidification on larval development and calcification in the sea urchin *Tripneustes gratilla*. PLoS ONE 5(6): e11372.

Strathmann R (1971) The feeding behavior of planktotrophic echinoderm larvae: Mechanisms, regulation, and rates of suspension feeding. J Exp Mar Biol Ecol 6(2): 109-160.

Uthicke S, Schaffelke B, Byrne M (2009) A boom-bust phylum? Ecological and evolutionary consequences of density variations in echinoderms. Ecological Monographs 79(1): 3-24.

Wooton T, Pfister C, Forester J (2008) Dynamic patterns and ecological impacts of declining ocean pH in a high-resolution multi-year dataset. Proc R Soc 105(48): 18848-18853.

Yamada K, Mihashi K (1998) Temperature-independent period immediately after fertilization in sea urchin eggs. Biol Bull 195: 107-111.

Zalasiewicz J, Williams M, Haywood A, Michael E (2011) The Antropocene: a new epoch of geological time. Phil Trans R Soc A, 369, 835–841.

# 8 ANNEXE 1 : Résultats moyens et photos

### 8.1.1 Expérience 1

**Tableau 1.** Taux moyen de fécondation et son écart-type au trois temps après l'insémination (TAI) en fonction de la température et du pH.

| Traitement | 15 MAI | 100 MAI | 200 MAI |
|---|---|---|---|
| 19 °C | 97,9% ± 0,46 | 99,6% ± 0,49 | 99,5% ± 0,34 |
| 20,5 °C | 98,9% ± 0,40 | 99,6% ± 0,14 | 100,0% ± 0,14 |
| 22,5 °C | 99,4% ± 0,25 | 99,5% ± 0,41 | 99,8% ± 0,27 |
| pH 8,0 | 97,4% ± 0,89 | 99,6% ± 0,39 | 99,9% ± 0,17 |
| pH 7,7 | 90,6% ± 1,39 | 99,7% ± 0,21 | 99,8% ± 0,27 |
| pH 7,4 | 67,1% ±6,52 | 98,2% ± 0,35 | 99,8% ± 0,28 |

**Tableau 2.** Taux moyen d'œufs aux différents stades de clivage au deux temps après l'insémination (TAI) et taux de clivage en fonction de la température et du pH et ses écarts-type.

| | Traite-ment | Œuf non fertilisés | Œuf avec membrane | Œuf à 2 blastomères | Œuf à 4 blastomères | Œuf à ≥8 blastomères | Taux de clivage |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 100 MAI | 19°C | 0,4% ± 0,49 | 3,9% ± 0,81 | 95,3% ± 0,83 | 0,4% ± 0,46 | 0,0% ± 0,00 | 95,7% ± 0,77 |
| | 20,5°C | 0,4% ± 0,14 | 1,9% ± 0,66 | 97,1% ± 0,39 | 0,6% ± 0,39 | 0,1% ± 0,14 | 97,7% ± 0,61 |
| | 22,5°C | 0,5% ± 0,41 | 2,4% ± 1,05 | 58,2% ± 4,27 | 38,8% ± 3,22 | 0,1% ± 0,27 | 97,1% ± 1,12 |
| | pH 8,0 | 0,4% ± 0,39 | 23,4% ± 4,70 | 67,1% ± 2,60 | 8,5% ± 2,29 | 0,7% ± 0,49 | 76,3% ± 4,56 |
| | pH 7,7 | 0,3% ± 0,21 | 71,7% ± 2,45 | 27,2% ± 2,34 | 0,0% ± 0,00 | 0,8% ± 0,27 | 27,9% ± 2,33 |
| | pH 7,4 | 1,8% ± 0,35 | 90,7% ± 2,50 | 7,5% ± 2,66 | 0,0% ± 0,00 | 0,0% ± 0,00 | 7,5% ± 2,66 |
| 200 MAI | 19°C | 0,4% ± 0,34 | 1,3% ± 0,44 | 0,5% ± 0, 41 | 18,1% ± 1,56 | 79,7% ± 1,40 | 98,3% ± 0,44 |
| | 20,5°C | 0,1% ± 0,14 | 1,3% ± 0,47 | 0,1% ± 0,17 | 8,4% ± 1,76 | 90,1% ± 1,71 | 98,6% ± 0,57 |
| | 22,5°C | 0,2% ± 0,27 | 0,7% ± 0,37 | 0,0% ± 0,00 | 1,2% ± 0,35 | 97,9% ± 0,57 | 99,1% ± 0,58 |
| | pH 8,0 | 0,1% ± 0,17 | 12,8% ± 3,17 | 0,0% ± 0,00 | 5,0% ± 1,62 | 82,1% ± 3,15 | 87,1% ± 3,07 |
| | pH 7,7 | 0,2% ± 0,27 | 58,5% ± 3,43 | 1,3% ± 0,76 | 6,4% ± 2,10 | 33,6% ± 4,83 | 41,3% ± 3,49 |
| | pH 7,4 | 0,2% ± 0,28 | 74,6% ± 3,20 | 1,8% ± 0,81 | 7,2% ± 0,91 | 16,3% ± 3,17 | 25,3% ± 3,15 |

**Tableau 3.** Moyenne de trois longueurs mesurées en fonction de la température et du pH.

| Traitement | Longueur moyenne total | Longueur moyenne de bras post-oraux | Longueur moyenne du corps |
|---|---|---|---|
| 19°C | 0,185 ± 0,023 | 0,072 ± 0,016 | 0,144 ± 0,022 |
| 20,5°C | 0,206 ± 0,020 | 0,084 ± 0,013 | 0,147 ± 0,019 |
| 22,5°C | 0,224 ± 0,035 | 0,094 ± 0,020 | 0,155 ± 0,030 |
| pH 8,0 | 0,187 ± 0,042 | 0,073 ± 0,034 | 0,124 ± 0,026 |
| pH 7,7 | 0,092 ± 0,020 | 0,008 ± 0,009 | 0,080 ± 0,014 |
| pH 7,4 | 0,040 ± 0,009 | 0,000 ± 0,000 | 0,040 ± 0,009 |

### 8.1.2 Expérience 2

**Tableau 4.** Densité moyenne (larves $ml^{-1}$) de au cours du temps ($t_0$-$t_{10}$) et son écart-type en fonction du pH. s : taux de survie ; m : taux de mortalité par rapport à la densité au temps initial.

| | pH 8,0 | pH 7,7 | pH 7,4 |
|---|---|---|---|
| $t_0$ | 5,00 ± 0,00<br>(s = 100% ; m = 0%) | 5,00 ± 0,00<br>(s = 100% ; m = 0%) | 5,00 ± 0,00<br>(s = 100% ; m = 0%) |
| $t_1$ | 4,04 ± 1,46<br>(s= 81% ; m =19%) | 2.96 ± 1.14<br>(s = 59% ; m = 41%) | 1.6 ± 0.80<br>(s = 27% ; m = 73%) |
| $t_2$ | 1,78 ± 0,93<br>(s = 36% ; m = 64%) | 2.13 ± 1.01<br>(s = 43% ; m = 54%) | 1.49 ± 1.06<br>(s = 30% ; m = 70%) |
| $t_3$ | 1,11 ± 0,37<br>(s = 22% ; m = 78%) | 1.29 ± 0.83<br>(s = 26% ; m = 74%) | 1.24 ± 0.70<br>(s = 25% ; m = 75%) |
| $t_4$ | 1,31 ± 0,88<br>(s = 26% ; m =74%) | 0.44 ± 0.39<br>(s = 9% ; m = 91%) | 1.56 ± 1,01<br>(s = 31% ; m = 69%) |
| $t_5$ | 1,00 ± 0,46<br>(s = 20% ; m= 80%) | 0,27 ± 0,36<br>(s = 5% ; m = 95%) | 1.13 ± 0.81<br>(s = 23% ; m = 77%) |
| $t_6$ | 0,33 ± 0,28<br>(s = 7% ; m = 93%) | 0,22 ± 0,45<br>(s = 4% ; m = 96%) | 1,00 ± 1,08<br>(s = 20% ; m = 80%) |
| $t_7$ | 0,49 ± 0,35<br>(s = 10% ; m = 90%) | 0,07 ± 0,14<br>(s =1% ; m = 99%) | 1,02 ± 0,88<br>(s = 20% ; m = 80%) |
| $t_8$ | 0,31 ± 0,15<br>(s = 6% ; m = 94%) | 0,22 ± 0,27<br>(s =4% ; m = 96%) | 0,46 ± 0,59<br>(s = 10% ; m = +90%) |
| $t_9$ | 0,38 ± 0,15<br>(s = 8% ; m = 92%) | 0,15 ± 0,17<br>(s = 3% ; m = 97%) | 0,27 ± 0,31<br>(s = 5% ; m = 95%) |
| $t_{10}$ | 0,20 ± 0,21<br>(s = 4% ; m = 96%) | 0,07 ± 0,14<br>(s =1% ; m = 99%) | 0,13 ± 0,21<br>(s = 3% ; m = 97%) |

**Tableau 5.** Longueur moyenne de bras post-oraux et son écart-type au cours du temps (t1-$t_{10}$) en fonction du pH.

| | pH 8,0 | pH 7,7 | pH 7,4 | $\bar{X}$ |
|---|---|---|---|---|
| $t_1$ | 0,142 ± 0,031 | 0,139 ± 0,056 | 0,045 ± 0,034 | 0,109 ± 0,055 |
| $t_2$ | 0,159 ± 0,036 | 0,152 ± 0,061 | 0,067 ± 0,046 | 0,126 ± 0,051 |
| $t_3$ | 0,252 ± 0,085 | 0,274 ± 0,099 | 0,121 ± 0,068 | 0,216 ± 0,083 |
| $t_4$ | 0,348 ± 0,129 | 0,360 ± 0,103 | 0,173 ± 0,115 | 0,293 ± 0,105 |
| $t_5$ | 0,618 ± 0,095 | 0,554 ± 0,083 | 0,350 ± 0,190 | 0,507 ± 0,140 |
| $t_6$ | 0,691 ± 0,118 | 0,703 ± 0,117 | 0,543 ± 0,105 | 0,646 ± 0,089 |
| $t_7$ | 0,715 ± 0,061 | 0,815 ± 0,173 | 0,575 ± 0,127 | 0,702 ± 0,120 |
| $t_8$ | 0,770 ± 0,079 | 0,819 ± 0,097 | 0,619 ± 0,135 | 0,736 ± 0,104 |
| $t_9$ | 0,703 ± 0,209 | 0,822 ± 0,110 | 0,693 ± 0,110 | 0,739 ± 0,072 |
| $t_{10}$ | 0,666 ± 0,180 | 0,749 ± 0,111 | 0,546 ± 0,277 | 0,654 ± 0,102 |
| $\bar{X}$ | 0,506 ± 0,251 | 0,538 ± 0,282 | 0,373 ± 0,251 | |

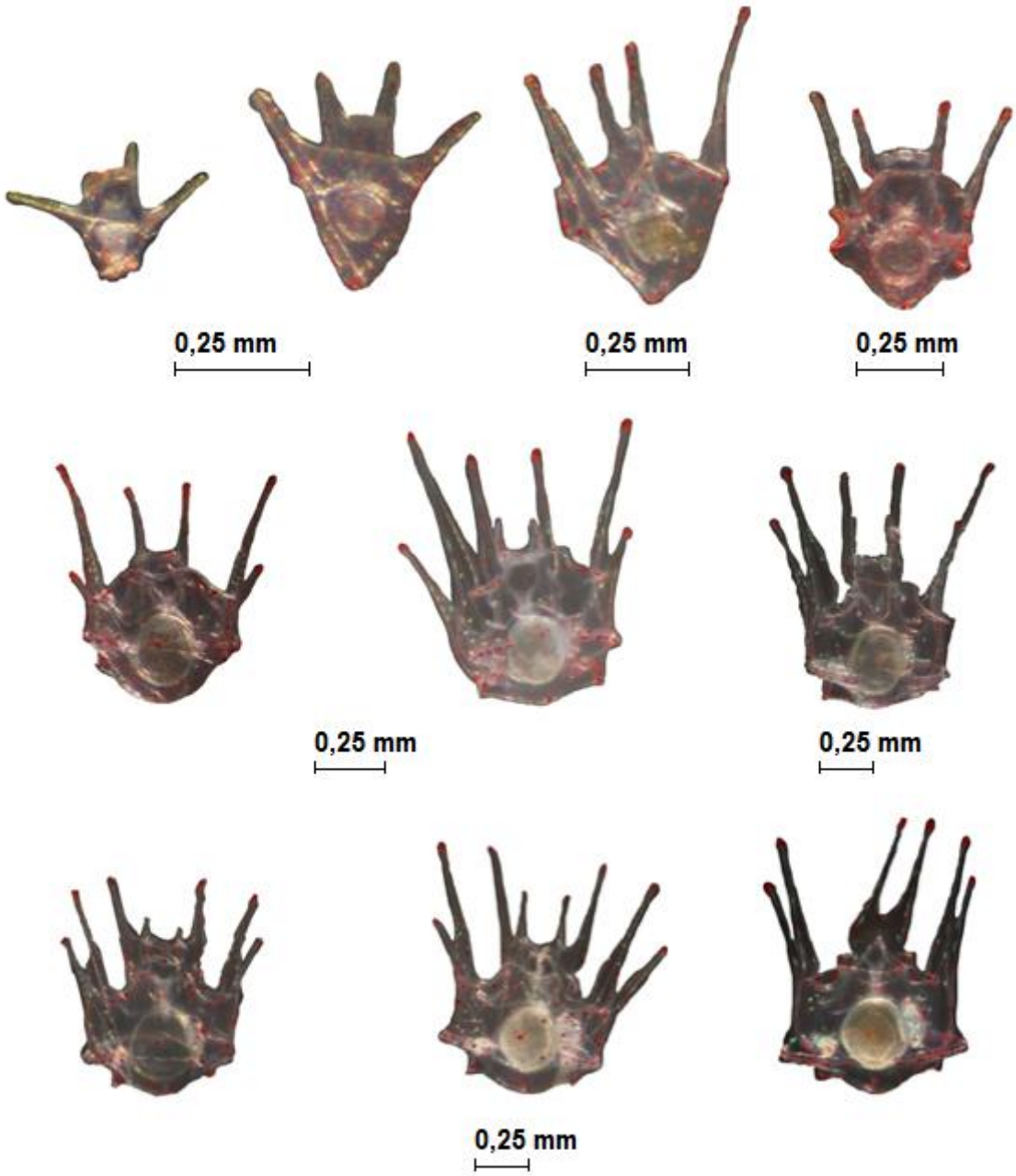



**Figure 1.** Evolution de la morphologie larvaire au cours de temps par traitement de pH.

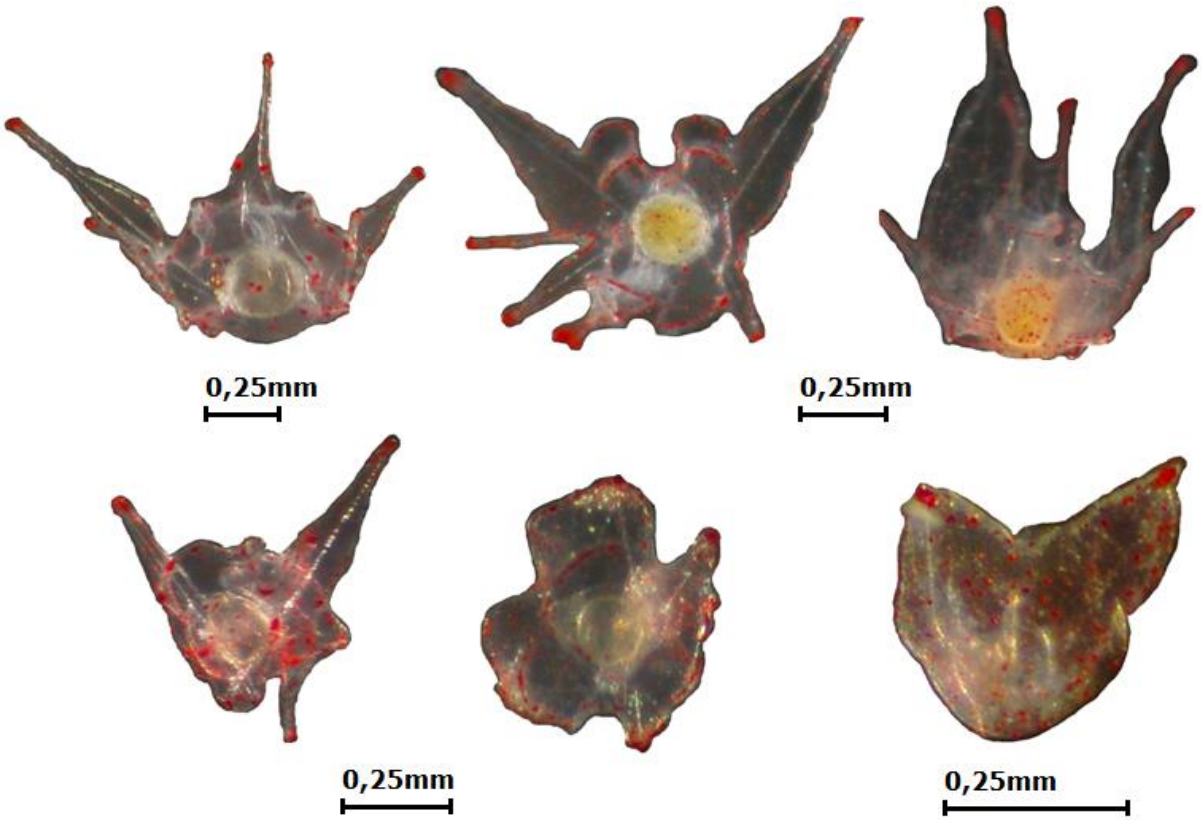



**Figure 2.** Quelques malformations des larves dues à l'exposition à pH 7,4.

# 9 ANNEXE 2 : Résultats statistiques

### 9.1.1 Expérience 1

Liste des abréviations :

dl : degrés de liberté
SQ : somme quadratique
MQ : moyenne quadratique
Pseudo-F : statistique pour analyser des hypothèses multivariées avec pas de différences entres groups
P(perm) : p-valeur avec des permutations
MC : correction de Monte Carlo
t : statistique de t de student
P(MC) : p-valeur corrigé par le test de Monte Carlo
T : Température
ti : temps après l'insémination
Res : erreur résiduel

**Tableau 1.** PERANOVA à deux voies et tests de contrastes deux à deux pour le taux de fécondation en prenant la température et le temps après l'insémination en tant que facteurs.

| PERANOVA à deux voies (univariée à deux facteurs) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Source** | **dl** | **SQ** | **MQ** | **Pseudo-F** | **P(perm)** | **Unique perms** |
| **T** | 2 | 3,3 | 1,6 | 13,4 | 0,002** | 999 |
| **ti** | 2 | 11,3 | 5,7 | 46,2 | 0,001*** | 999 |
| **pHxti** | 4 | 4,5 | 1,1 | 9,1 | 0,001*** | 999 |
| **Res** | 45 | 5,5 | 0,1 | | | |
| **Total** | 53 | 24,6 | | | | |

| Test de contrastes deux à deux -facteur: température | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Niveau: 15 minutes | | | | |
| **Groupes** | **t** | **P(perm)** | **Unique perms** | **P(MC)** |
| **19°C -20,5°C** | 4,1 | 0,006 | 21 | 0,002** |
| **19°C - 22,5°C** | 7,0 | 0,003 | 25 | 0,001*** |
| **20,5°C - 22,5°C** | 2,6 | 0,067 | 15 | 0,021* |
| Niveau: 100 minutes | | | | |
| **Groupes** | **t** | **P(perm)** | **Unique perms** | **P(MC)** |
| **19°C -20,5°C** | 7,9E-02 | 1 | 9 | 0,938 |
| **19°C - 22,5°C** | 3,8E-01 | 0,767 | 10 | 0,689 |
| **20,5°C - 22,5°C** | 6,4E-01 | 0,749 | 5 | 0,567 |
| Niveau: 200 minutes | | | | |
| **Groupes** | **t** | **P(perm)** | **Unique perms** | **P(MC)** |
| **19°C -20,5°C** | 2,7 | 0,065 | 5 | 0,026* |
| **19°C - 22,5°C** | 1,3 | 0,228 | 8 | 0,214 |
| **20,5°C - 22,5°C** | 1,3 | 0,412 | 4 | 0,214 |

**Tableau 2.** PERANOVA à deux voies et tests de contrastes deux à deux pour le taux de fécondation en prenant le pH et le temps après l'insémination en tant que facteurs.

| PERANOVA à deux voies (univariée à deux facteurs) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Source** | **dl** | **SQ** | **MQ** | **Pseudo-F** | **P(perm)** | **Unique perms** |
| **pH** | 2 | 1122,6 | 561,28 | 110,91 | 0,001*** | 998 |
| **ti** | 2 | 2506,9 | 1253,5 | 247,7 | 0,001*** | 998 |
| **Txti** | 4 | 1921,9 | 480,48 | 94,948 | 0,001*** | 998 |
| **Res** | 45 | 227,72 | 5,0605 | | | |
| **Total** | 53 | 5779,2 | | | | |

| Test de contrastes deux à deux -facteur: température | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Niveau: 15 minutes | | | | |
| **Groupes** | **t** | **P(perm)** | **Unique perms** | **P(MC)** |
| **8,0 -7,7** | 10,1 | 0,007 | 90 | 0,001*** |
| **8,0 -7,4** | 11,3 | 0,003 | 178 | 0,001*** |
| **7,4 -7,7** | 8,7 | 0,002 | 187 | 0,001*** |
| Niveau: 100 minutes | | | | |
| **Groupes** | **t** | **P(perm)** | **Unique perms** | **P(MC)** |
| **8,0 -7,7** | 0,4 | 0,871 | 9 | 0,71 |
| **8,0 -7,4** | 6,8 | 0,006 | 29 | 0,001*** |
| **7,4 -7,7** | 9,1 | 0,005 | 25 | 0,001*** |

| … continuation tableau 2<br>Niveau: 200 minutes | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Groupes** | **t** | **P(perm)** | **Unique perms** | **P(MC)** |
| **8,0 -7,7** | 0,9 | 0,64 | 5 | 0,412 |
| **8,0 -7,4** | 0,5 | 0,885 | 4 | 0,627 |
| **7,4 -7,7** | 0,3 | 1 | 6 | 0,764 |

**Tableau 3.** PERMAOVA à deux voies et tests de contrastes deux à deux pour le taux de clivage en prenant la température et le temps après l'insémination en tant que facteurs.

| PERMANOVA à deux voies (multivariée à cinq variables et deux facteurs) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Source** | **dl** | **SQ** | **MQ** | **Pseudo-F** | **P(perm)** | **Unique perms** |
| **T** | 2 | 4952,7 | 2476,3 | 334,17 | 0,001*** | 999 |
| **ti** | 1 | 134190,0 | 134190,0 | 18107 | 0,001*** | 971 |
| **Txti** | 2 | 8574,7 | 4287,4 | 578,55 | 0,001*** | 999 |
| **Res** | 30 | 222,3 | 7,4 | | | |
| **Total** | 35 | 147930,0 | | | | |

| Test de contrastes deux à deux -facteur: température | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Niveau: 100 minutes | | | | |
| **Groupes** | **t** | **P(perm)** | **Unique perms** | **P(MC)** |
| **19°C -20,5°C** | 4,1 | 0,004 | 278 | 0,003** |
| **19°C - 22,5°C** | 23,1 | 0,002 | 389 | 0,001*** |
| **20,5°C - 22,5°C** | 24,0 | 0,002 | 394 | 0,001*** |
| Niveau: 200 minutes | | | | |
| **Groupes** | **t** | **P(perm)** | **Unique perms** | **P(MC)** |
| **19°C -20,5°C** | 10,5 | 0,005 | 399 | 0,001*** |
| **19°C - 22,5°C** | 26,1 | 0,006 | 398 | 0,001*** |
| **20,5°C - 22,5°C** | 10,1 | 0,003 | 392 | 0,001*** |

**Tableau 4.** PERMANOVA à deux voies et tests de contrastes deux à deux pour le taux de clivage en prenant le pH et le temps après l'insémination en tant que facteurs.

| PERMANOVA à deux voies (multivariée à cinq variables et deux facteurs) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Source** | **dl** | **SQ** | **MQ** | **Pseudo-F** | **P(perm)** | **Unique perms** |
| **pH** | 2 | 39160,0 | 19580,0 | 811,5 | 0,001*** | 999 |
| **ti** | 1 | 28452,0 | 28452,0 | 1179,2 | 0,001*** | 999 |
| **pHxti** | 2 | 13021,0 | 6510,5 | 269,8 | 0,001*** | 999 |
| **Res** | 30 | 723,9 | 24,1 | | | |
| **Total** | 35 | 81357,0 | | | | |

| Test de contrastes deux à deux -facteur: température | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Niveau: 100 minutes | | | | |
| **Groupes** | **t** | **P(perm)** | **Unique perms** | **P(MC)** |
| **8,0 -7,7** | 22,8 | 0,002 | 407 | 0,001*** |
| **8,0 -7,4** | 31,9 | 0,002 | 407 | 0,001*** |
| **7,4 -7,7** | 13,3 | 0,003 | 406 | 0,001*** |
| Niveau: 200 minutes | | | | |
| **Groupes** | **t** | **P(perm)** | **Unique perms** | **P(MC)** |
| **8,0 -7,7** | 20,6 | 0,002 | 408 | 0,001*** |
| **8,0 -7,4** | 33,1 | 0,005 | 405 | 0,001*** |
| **7,4 -7,7** | 7,3 | 0,004 | 406 | 0,001*** |

**Tableau 5.** PERMANOVA à une voie et tests de contrastes deux à deux pour la morphométrie de larves en prenant la température et le temps après l'insémination en tant que facteurs.

| PERMANOVA à une voie (multivariée à trois variables et un facteur) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Source** | **dl** | **SQ** | **MQ** | **Pseudo-F** | **P(perm)** | **Unique perms** |
| **Temp** | 2 | 0,3 | 0,2 | 33,8 | 0,001*** | 999 |
| **Res** | 34 | 0,2 | 0,0 | | | |
| **Total** | 36 | 0,5 | | | | |

| Test de contrastes deux à deux -facteur temp | | | |
|---|---|---|---|
| **Groupes** | **t** | **P(perm)** | **Unique perms** |
| **19°C -20,5°C** | 5,5 | 0,001*** | 998 |
| **19°C - 22,5°C** | 9,4 | 0,001*** | 998 |
| **20,5°C - 22,5°C** | 2,4 | 0,014* | 997 |

**Tableau 6.** PERMANOVA à une voie et tests de contrastes deux à deux pour la morphométrie de larves en prenant le pH et le temps après l'insémination en tant que facteurs.

| PERMANOVA à une voie (multivariée à trois variables et un facteur) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Source** | **dl** | **SQ** | **MQ** | **Pseudo-F** | **P(perm)** | **Unique perms** |
| **pH** | 2 | 1,1 | 0,5 | 356,7 | 0,001*** | 936 |
| **Res** | 177 | 0,3 | 0,0 | | | |
| **Total** | 179 | 1,3 | | | | |

| Test de contrastes deux à deux -facteur pH | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Groupes** | **t** | **P(perm)** | **Unique perms** | **P(MC)** |
| **8,0 -7,7** | 14,6 | 0,001 | 812 | 0,001*** |
| **8,0 -7,4** | 23,1 | 0,001 | 877 | 0,001*** |
| **7,4 -7,7** | 17,2 | 0,001 | 498 | 0,001*** |

### 9.1.2 Expérience 2

**Tableau 7.** PERANOVA à une voie pour la densité de larves en prenant le pH et le temps après l'insémination en tant que facteurs.

| PERANOVA à une voie (univariéé à deux facteurs) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Source** | **dl** | **SQ** | **MQ** | **Pseudo-F** | **P(perm)** | **Unique perms** |
| **pH** | 2 | 21,8 | 10,9 | 10,4 | 0,001*** | 999 |
| **ti** | 9 | 825,9 | 91,8 | 87,5 | 0,001*** | 998 |
| **pHxti** | 18 | 243,54 | 13,5 | 12,9 | 0,001*** | 999 |
| **Res** | 1320 | 1384,0 | 1,0 | | | |
| **Total** | 1349 | 2475,3 | | | | |

**Tableau 8.** PERANOVA à une voie et tests de contrastes deux à deux pour la morphométrie de larves en prenant le pH et le temps après l'insémination en tant que facteurs.

| PERANOVA à une voie (univariéé à deux facteurs) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Source** | **dl** | **SQ** | **MQ** | **Pseudo-F** | **P(perm)** | **Unique perms** |
| **pH** | 2 | 3,1 | 1,5 | 66,0 | 0,001*** | 998 |
| **ti** | 9 | 36,448 | 4,0 | 174,2 | 0,001*** | 999 |
| **pHxti** | 18 | 0,59866 | 0,0 | 1,4 | 0,11 | 999 |
| **Res** | 570 | 13,3 | 0,0 | | | |
| **Total** | 599 | 53,4 | | | | |

| Test de contrastes deux à deux -facteur pH | | | |
|---|---|---|---|
| **Groupes** | **t** | **P(perm)** | **Unique perms** |
| **8,0 -7,7** | 2,3 | 0,021* | 997 |
| **8,0 -7,4** | 8,3 | 0,001*** | 996 |
| **7,4 -7,7** | 10,8 | 0,001*** | 998 |

# 10 ANNEXE 3 : Résultats originaux

## *10.1* Expérience 1

### 10.1.1 Taux de fécondation

**Tableau 1.** Nombre d'œufs non fertilisés et fertilisés à 15' après insémination en fonction des trois traitements de température et de pH.

| Aliquote (300 œufs) | Traitement | Œuf non fertilisés | Œuf avec membrane | Traitement | Œuf non fertilisés | Œuf avec membrane |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Réservoir A 19°C | 8 | 292 | Réservoir A pH 8,0 | 5 | 295 |
| 2 | | 6 | 294 | | 8 | 292 |
| 3 | | 6 | 294 | | 12 | 288 |
| 4 | | 5 | 295 | | 7 | 293 |
| 5 | | 5 | 295 | | 5 | 295 |
| 6 | | 8 | 292 | | 9 | 291 |
| 1 | Réservoir B 20,5°C | 3 | 297 | Réservoir B pH 7,7 | 28 | 272 |
| 2 | | 4 | 296 | | 35 | 265 |
| 3 | | 2 | 298 | | 27 | 273 |
| 4 | | 5 | 295 | | 22 | 278 |
| 5 | | 4 | 296 | | 29 | 271 |
| 6 | | 2 | 298 | | 28 | 272 |
| 1 | Réservoir C 22,5°C | 2 | 298 | Réservoir C pH 7,4 | 115 | 185 |
| 2 | | 1 | 299 | | 130 | 170 |
| 3 | | 1 | 299 | | 84 | 216 |
| 4 | | 2 | 298 | | 80 | 220 |
| 5 | | 3 | 297 | | 91 | 209 |
| 6 | | 2 | 298 | | 92 | 208 |

### 10.1.2 Taux de clivage

**Tableau 2.** Nombre d'œufs non fertilisés et aux différents stades de clivage 100' après l'insémination en fonction des trois traitements de température.

| Traitement | Aliquote (300 œufs) | Œuf non fertilisés | Œuf avec membrane | Œuf à 2 blastomères | Œuf à 4 blastomères | Œuf à ≥8 blastomères |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Réservoir A 19°C | 1 | 1 | 9 | 289 | 1 | 0 |
| | 2 | 0 | 11 | 288 | 1 | 0 |
| | 3 | 0 | 15 | 284 | 1 | 0 |
| | 4 | 3 | 9 | 287 | 1 | 0 |
| | 5 | 3 | 13 | 284 | 0 | 0 |
| | 6 | 0 | 13 | 283 | 4 | 0 |
| Réservoir B 20,5°C | 1 | 1 | 4 | 292 | 3 | 0 |
| | 2 | 1 | 5 | 291 | 3 | 0 |
| | 3 | 1 | 9 | 289 | 1 | 0 |
| | 4 | 1 | 5 | 292 | 2 | 0 |
| | 5 | 2 | 4 | 292 | 2 | 0 |
| | 6 | 1 | 7 | 291 | 0 | 1 |
| Réservoir C 22,5°C | 1 | 1 | 5 | 185 | 109 | 0 |
| | 2 | 3 | 9 | 157 | 131 | 0 |
| | 3 | 1 | 6 | 185 | 108 | 0 |
| | 4 | 1 | 13 | 161 | 125 | 0 |
| | 5 | 0 | 6 | 185 | 109 | 0 |
| | 6 | 3 | 5 | 174 | 116 | 2 |

**Tableau 3.** Nombre d'œufs non fertilisés et aux différents stades de clivage 200' après l'insémination en fonction des trois traitements de température.

| Traitement | Aliquote (300 œufs) | Œuf non fertilisés | Œuf avec membrane | Œuf à 2 blastomères | Œuf à 4 blastomères | Œuf à ≥8 blastomères |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Réservoir A 19°C | 1 | 2 | 3 | 3 | 58 | 234 |
| | 2 | 0 | 3 | 3 | 56 | 238 |
| | 3 | 2 | 3 | 0 | 57 | 238 |
| | 4 | 2 | 5 | 1 | 47 | 245 |
| | 5 | 2 | 3 | 1 | 58 | 236 |
| | 6 | 0 | 6 | 1 | 50 | 243 |
| Réservoir B 20,5°C | 1 | 0 | 3 | 0 | 28 | 269 |
| | 2 | 0 | 5 | 1 | 26 | 268 |
| | 3 | 0 | 4 | 1 | 15 | 280 |
| | 4 | 0 | 2 | 0 | 27 | 271 |
| | 5 | 1 | 6 | 0 | 26 | 267 |
| | 6 | 0 | 4 | 0 | 30 | 266 |

… continuation tableau 3

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Réservoir C 22,5°C | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 297 |
| | 2 | 1 | 2 | 0 | 4 | 293 |
| | 3 | 1 | 3 | 0 | 2 | 294 |
| | 4 | 0 | 2 | 0 | 5 | 293 |
| | 5 | 2 | 3 | 0 | 3 | 292 |
| | 6 | 0 | 2 | 0 | 4 | 294 |

**Tableau 4.** Nombre d'œufs non fertilisés et aux différents stades de clivage 100' après l'insémination en fonction des trois traitements de pH.

| Traitement | Aliquote (300 œufs) | Œuf non fertilisés | Œuf avec membrane | Œuf à 2 blastomères | Œuf à 4 blastomères | Œuf à ≥8 blastomères |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Réservoir A pH 8,0 | 1 | 3 | 56 | 207 | 30 | 4 |
| | 2 | 1 | 63 | 205 | 30 | 1 |
| | 3 | 2 | 65 | 206 | 25 | 2 |
| | 4 | 1 | 96 | 186 | 14 | 3 |
| | 5 | 0 | 75 | 201 | 21 | 3 |
| | 6 | 0 | 65 | 203 | 32 | 0 |
| Réservoir B pH 7,7 | 1 | 1 | 214 | 82 | 0 | 3 |
| | 2 | 1 | 223 | 73 | 0 | 3 |
| | 3 | 1 | 215 | 81 | 0 | 3 |
| | 4 | 1 | 205 | 92 | 0 | 2 |
| | 5 | 0 | 224 | 75 | 0 | 1 |
| | 6 | 2 | 210 | 86 | 0 | 2 |
| Réservoir C pH 7,4 | 1 | 6 | 262 | 32 | 0 | 0 |
| | 2 | 6 | 279 | 15 | 0 | 0 |
| | 3 | 4 | 270 | 26 | 0 | 0 |
| | 4 | 5 | 276 | 19 | 0 | 0 |
| | 5 | 7 | 280 | 13 | 0 | 0 |
| | 6 | 5 | 265 | 30 | 0 | 0 |

**Tableau 5.** Nombre d'œufs non fertilisés et aux différents stades de clivage 200' après l'insémination en fonction des trois traitements de pH.

| Traitement | Aliquote (300 œufs) | Œuf non fertilisés | Œuf avec membrane | Œuf à 2 blastomères | Œuf à 4 blastomères | Œuf à ≥8 blastomères |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Réservoir A pH 8,0 | 1 | 0 | 49 | 0 | 18 | 233 |
| | 2 | 0 | 36 | 0 | 15 | 249 |
| | 3 | 1 | 28 | 0 | 11 | 260 |
| | 4 | 0 | 51 | 0 | 10 | 239 |
| | 5 | 1 | 35 | 0 | 13 | 251 |
| | 6 | 0 | 31 | 0 | 23 | 246 |

… continuation tableau 5

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Réservoir B pH 7,7 | 1 | 2 | 176 | 0 | 25 | 97 |
| | 2 | 1 | 179 | 6 | 29 | 85 |
| | 3 | 0 | 182 | 5 | 17 | 96 |
| | 4 | 1 | 179 | 4 | 14 | 102 |
| | 5 | 0 | 155 | 3 | 14 | 128 |
| | 6 | 0 | 182 | 6 | 16 | 96 |
| Réservoir C pH 7,4 | 1 | 0 | 213 | 3 | 24 | 60 |
| | 2 | 0 | 222 | 3 | 25 | 50 |
| | 3 | 0 | 228 | 9 | 18 | 45 |
| | 4 | 0 | 240 | 4 | 22 | 34 |
| | 5 | 1 | 216 | 6 | 19 | 58 |
| | 6 | 2 | 223 | 7 | 22 | 46 |

### 10.1.3 Morphométrie larvaire

**Tableau 6.** Morphométrie de larves de *Paracentrotus lividus* 72 heures après l'insémination en fonction des trois traitements de température. A : Aliquote ; L : larve ; LT : Longueur totale ; LB : Longueur des bras post-oraux ; LC : Longueur du corps.

| | | 19,0°C | | | 20,5°C | | | 22,5°C | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | L | LT | LB | LC | LT | LB | LC | LT | LB | LC |
| 1 | 1 | 0,18 | 0,07 | 0,15 | 0,16 | 0,06 | 0,14 | 0,30 | 0,15 | 0,19 |
| 1 | 2 | 0,18 | 0,05 | 0,14 | 0,23 | 0,07 | 0,17 | 0,31 | 0,14 | 0,22 |
| 1 | 3 | 0,18 | 0,07 | 0,17 | 0,19 | 0,09 | 0,15 | 0,29 | 0,09 | 0,20 |
| 1 | 4 | 0,15 | 0,05 | 0,13 | 0,23 | 0,07 | 0,17 | 0,28 | 0,14 | 0,18 |
| 1 | 5 | 0,18 | 0,10 | 0,14 | 0,23 | 0,09 | 0,17 | 0,29 | 0,14 | 0,15 |
| 1 | 6 | 0,19 | 0,06 | 0,15 | 0,20 | 0,06 | 0,15 | 0,25 | 0,10 | 0,20 |
| 1 | 7 | 0,25 | 0,08 | 0,20 | 0,19 | 0,09 | 0,14 | 0,21 | 0,08 | 0,14 |
| 1 | 8 | 0,22 | 0,10 | 0,17 | 0,20 | 0,10 | 0,13 | 0,29 | 0,10 | 0,21 |
| 1 | 9 | 0,18 | 0,07 | 0,14 | 0,18 | 0,08 | 0,12 | 0,28 | 0,13 | 0,19 |
| 1 | 10 | 0,19 | 0,09 | 0,17 | 0,22 | 0,09 | 0,14 | 0,30 | 0,13 | 0,20 |
| 2 | 1 | 0,18 | 0,05 | 0,15 | 0,19 | 0,08 | 0,15 | 0,30 | 0,15 | 0,19 |
| 2 | 2 | 0,16 | 0,06 | 0,12 | 0,23 | 0,09 | 0,16 | 0,30 | 0,12 | 0,20 |
| 2 | 3 | 0,17 | 0,09 | 0,13 | 0,20 | 0,10 | 0,13 | 0,20 | 0,08 | 0,13 |
| 2 | 4 | 0,21 | 0,09 | 0,16 | 0,24 | 0,09 | 0,18 | 0,29 | 0,10 | 0,21 |
| 2 | 5 | 0,19 | 0,08 | 0,17 | 0,19 | 0,07 | 0,11 | 0,24 | 0,12 | 0,14 |
| 2 | 6 | 0,17 | 0,05 | 0,12 | 0,17 | 0,08 | 0,13 | 0,27 | 0,12 | 0,18 |
| 2 | 7 | 0,18 | 0,08 | 0,10 | 0,21 | 0,10 | 0,14 | 0,21 | 0,09 | 0,14 |
| 2 | 8 | 0,22 | 0,10 | 0,17 | 0,23 | 0,08 | 0,17 | 0,28 | 0,14 | 0,18 |
| 2 | 9 | 0,15 | 0,05 | 0,13 | 0,19 | 0,06 | 0,12 | 0,21 | 0,10 | 0,12 |
| 2 | 10 | 0,18 | 0,06 | 0,16 | 0,20 | 0,07 | 0,14 | 0,25 | 0,10 | 0,15 |

… continuation tableau 6

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3 | 1 | 0,23 | 0,08 | 0,15 | 0,21 | 0,08 | 0,16 | 0,30 | 0,12 | 0,20 |
| 3 | 2 | 0,17 | 0,07 | 0,15 | 0,20 | 0,08 | 0,14 | 0,25 | 0,12 | 0,18 |
| 3 | 3 | 0,19 | 0,06 | 0,14 | 0,19 | 0,09 | 0,13 | 0,25 | 0,10 | 0,17 |
| 3 | 4 | 0,18 | 0,08 | 0,10 | 0,20 | 0,06 | 0,15 | 0,31 | 0,12 | 0,21 |
| 3 | 5 | 0,16 | 0,05 | 0,15 | 0,19 | 0,08 | 0,12 | 0,25 | 0,10 | 0,15 |
| 3 | 6 | 0,17 | 0,07 | 0,13 | 0,21 | 0,10 | 0,15 | 0,20 | 0,08 | 0,13 |
| 3 | 7 | 0,20 | 0,07 | 0,13 | 0,19 | 0,06 | 0,13 | 0,24 | 0,10 | 0,15 |
| 3 | 8 | 0,18 | 0,08 | 0,14 | 0,20 | 0,07 | 0,15 | 0,25 | 0,11 | 0,13 |
| 3 | 9 | 0,17 | 0,06 | 0,13 | 0,20 | 0,10 | 0,14 | 0,21 | 0,10 | 0,15 |
| 3 | 10 | 0,20 | 0,08 | 0,13 | 0,24 | 0,10 | 0,19 | 0,24 | 0,11 | 0,15 |
| 4 | 1 | 0,23 | 0,08 | 0,15 | 0,24 | 0,10 | 0,19 | 0,30 | 0,15 | 0,19 |
| 4 | 2 | 0,17 | 0,07 | 0,15 | 0,20 | 0,07 | 0,15 | 0,30 | 0,12 | 0,20 |
| 4 | 3 | 0,19 | 0,06 | 0,14 | 0,21 | 0,10 | 0,15 | 0,20 | 0,08 | 0,13 |
| 4 | 4 | 0,18 | 0,08 | 0,10 | 0,19 | 0,08 | 0,12 | 0,29 | 0,10 | 0,21 |
| 4 | 5 | 0,16 | 0,05 | 0,15 | 0,19 | 0,09 | 0,13 | 0,24 | 0,12 | 0,14 |
| 4 | 6 | 0,17 | 0,07 | 0,13 | 0,21 | 0,08 | 0,16 | 0,27 | 0,12 | 0,18 |
| 4 | 7 | 0,20 | 0,07 | 0,13 | 0,18 | 0,08 | 0,12 | 0,21 | 0,09 | 0,14 |
| 4 | 8 | 0,18 | 0,08 | 0,14 | 0,19 | 0,09 | 0,14 | 0,28 | 0,14 | 0,18 |
| 4 | 9 | 0,17 | 0,06 | 0,13 | 0,23 | 0,09 | 0,17 | 0,21 | 0,10 | 0,12 |
| 4 | 10 | 0,20 | 0,08 | 0,13 | 0,19 | 0,09 | 0,15 | 0,25 | 0,10 | 0,15 |
| 5 | 1 | 0,18 | 0,05 | 0,15 | 0,22 | 0,09 | 0,14 | 0,30 | 0,12 | 0,20 |
| 5 | 2 | 0,16 | 0,06 | 0,12 | 0,24 | 0,10 | 0,19 | 0,25 | 0,12 | 0,18 |
| 5 | 3 | 0,17 | 0,09 | 0,13 | 0,20 | 0,07 | 0,14 | 0,25 | 0,10 | 0,17 |
| 5 | 4 | 0,21 | 0,09 | 0,16 | 0,18 | 0,08 | 0,12 | 0,31 | 0,12 | 0,21 |
| 5 | 5 | 0,19 | 0,08 | 0,17 | 0,20 | 0,10 | 0,14 | 0,25 | 0,10 | 0,15 |
| 5 | 6 | 0,17 | 0,05 | 0,12 | 0,19 | 0,06 | 0,12 | 0,20 | 0,08 | 0,13 |
| 5 | 7 | 0,18 | 0,08 | 0,10 | 0,20 | 0,10 | 0,13 | 0,24 | 0,10 | 0,15 |
| 5 | 8 | 0,22 | 0,10 | 0,17 | 0,20 | 0,07 | 0,15 | 0,25 | 0,11 | 0,13 |
| 5 | 9 | 0,15 | 0,05 | 0,13 | 0,23 | 0,08 | 0,17 | 0,21 | 0,10 | 0,15 |
| 5 | 10 | 0,18 | 0,06 | 0,16 | 0,19 | 0,09 | 0,14 | 0,24 | 0,11 | 0,15 |
| 6 | 1 | 0,18 | 0,07 | 0,15 | 0,16 | 0,05 | 0,14 | 0,30 | 0,15 | 0,19 |
| 6 | 2 | 0,18 | 0,05 | 0,14 | 0,20 | 0,08 | 0,16 | 0,31 | 0,14 | 0,22 |
| 6 | 3 | 0,18 | 0,07 | 0,17 | 0,19 | 0,08 | 0,14 | 0,29 | 0,09 | 0,20 |
| 6 | 4 | 0,15 | 0,05 | 0,13 | 0,23 | 0,07 | 0,17 | 0,28 | 0,14 | 0,18 |
| 6 | 5 | 0,18 | 0,10 | 0,14 | 0,20 | 0,08 | 0,14 | 0,29 | 0,14 | 0,15 |
| 6 | 6 | 0,19 | 0,06 | 0,15 | 0,23 | 0,09 | 0,16 | 0,25 | 0,10 | 0,20 |
| 6 | 7 | 0,25 | 0,08 | 0,20 | 0,20 | 0,10 | 0,13 | 0,21 | 0,08 | 0,14 |
| 6 | 8 | 0,22 | 0,10 | 0,17 | 0,19 | 0,09 | 0,13 | 0,29 | 0,10 | 0,21 |
| 6 | 9 | 0,18 | 0,07 | 0,14 | 0,19 | 0,09 | 0,15 | 0,28 | 0,13 | 0,19 |
| 6 | 10 | 0,19 | 0,09 | 0,17 | 0,23 | 0,08 | 0,17 | 0,30 | 0,13 | 0,20 |

**Tableau 7.** Morphométrie de larves de *Paracentrotus lividus* 72 heures après l'insémination en fonction des trois traitements de pH. A : Aliquote ; L : larve ; LT : Longueur totale ; LB : Longueur des bras post-oraux ; LC : Longueur du corps.

| | | pH 8,0 | | | pH 7,7 | | | pH 7,4 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | L | LT | LB | LC | LT | LB | LC | LT | LB | LC |
| 1 | 1 | 0,19 | 0,07 | 0,14 | 0,11 | 0,01 | 0,08 | 0,05 | 0,00 | 0,05 |
| 1 | 2 | 0,18 | 0,08 | 0,08 | 0,10 | 0,01 | 0,07 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |
| 1 | 3 | 0,24 | 0,10 | 0,21 | 0,09 | 0,01 | 0,08 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |
| 1 | 4 | 0,19 | 0,08 | 0,14 | 0,11 | 0,01 | 0,08 | 0,06 | 0,00 | 0,06 |
| 1 | 5 | 0,21 | 0,07 | 0,18 | 0,09 | 0,00 | 0,09 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |
| 1 | 6 | 0,25 | 0,09 | 0,21 | 0,09 | 0,00 | 0,09 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |
| 1 | 7 | 0,22 | 0,19 | 0,13 | 0,10 | 0,02 | 0,06 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |
| 1 | 8 | 0,26 | 0,16 | 0,12 | 0,08 | 0,01 | 0,06 | 0,05 | 0,00 | 0,05 |
| 1 | 9 | 0,24 | 0,15 | 0,09 | 0,11 | 0,01 | 0,09 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |
| 1 | 10 | 0,11 | 0,03 | 0,09 | 0,11 | 0,00 | 0,11 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |
| 2 | 1 | 0,15 | 0,06 | 0,12 | 0,10 | 0,00 | 0,10 | 0,05 | 0,00 | 0,05 |
| 2 | 2 | 0,24 | 0,09 | 0,16 | 0,09 | 0,00 | 0,09 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| 2 | 3 | 0,19 | 0,07 | 0,14 | 0,10 | 0,02 | 0,07 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |
| 2 | 4 | 0,20 | 0,09 | 0,10 | 0,10 | 0,02 | 0,08 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| 2 | 5 | 0,23 | 0,09 | 0,13 | 0,06 | 0,00 | 0,06 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| 2 | 6 | 0,23 | 0,12 | 0,12 | 0,06 | 0,00 | 0,06 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |
| 2 | 7 | 0,20 | 0,08 | 0,14 | 0,08 | 0,01 | 0,07 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |
| 2 | 8 | 0,19 | 0,07 | 0,13 | 0,09 | 0,00 | 0,09 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |
| 2 | 9 | 0,17 | 0,05 | 0,12 | 0,09 | 0,00 | 0,09 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| 2 | 10 | 0,17 | 0,06 | 0,11 | 0,08 | 0,00 | 0,08 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| 3 | 1 | 0,23 | 0,12 | 0,12 | 0,10 | 0,01 | 0,09 | 0,05 | 0,00 | 0,05 |
| 3 | 2 | 0,18 | 0,08 | 0,11 | 0,09 | 0,01 | 0,07 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |
| 3 | 3 | 0,16 | 0,06 | 0,12 | 0,12 | 0,03 | 0,10 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| 3 | 4 | 0,13 | 0,03 | 0,09 | 0,05 | 0,00 | 0,05 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| 3 | 5 | 0,17 | 0,05 | 0,13 | 0,09 | 0,01 | 0,08 | 0,05 | 0,00 | 0,05 |
| 3 | 6 | 0,18 | 0,06 | 0,14 | 0,10 | 0,01 | 0,08 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |
| 3 | 7 | 0,22 | 0,12 | 0,14 | 0,07 | 0,00 | 0,07 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |
| 3 | 8 | 0,16 | 0,06 | 0,11 | 0,08 | 0,00 | 0,08 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| 3 | 9 | 0,17 | 0,06 | 0,12 | 0,09 | 0,00 | 0,09 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| 3 | 10 | 0,19 | 0,07 | 0,12 | 0,10 | 0,01 | 0,09 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| 4 | 1 | 0,16 | 0,06 | 0,11 | 0,09 | 0,00 | 0,09 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| 4 | 2 | 0,19 | 0,07 | 0,13 | 0,08 | 0,00 | 0,08 | 0,05 | 0,00 | 0,05 |
| 4 | 3 | 0,22 | 0,08 | 0,15 | 0,10 | 0,01 | 0,08 | 0,05 | 0,00 | 0,05 |
| 4 | 4 | 0,21 | 0,09 | 0,13 | 0,12 | 0,02 | 0,11 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| 4 | 5 | 0,19 | 0,07 | 0,13 | 0,10 | 0,01 | 0,09 | 0,06 | 0,00 | 0,06 |
| 4 | 6 | 0,17 | 0,07 | 0,09 | 0,10 | 0,01 | 0,07 | 0,05 | 0,00 | 0,05 |
| 4 | 7 | 0,13 | 0,06 | 0,12 | 0,07 | 0,00 | 0,07 | 0,05 | 0,00 | 0,05 |
| 4 | 8 | 0,17 | 0,06 | 0,13 | 0,05 | 0,00 | 0,05 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| 4 | 9 | 0,18 | 0,06 | 0,13 | 0,09 | 0,01 | 0,08 | 0,06 | 0,00 | 0,06 |
| 4 | 10 | 0,12 | 0,02 | 0,10 | 0,06 | 0,00 | 0,06 | 0,05 | 0,00 | 0,05 |

… continuation tableau 7

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 | 1 | 0,09 | 0,02 | 0,10 | 0,05 | 0,00 | 0,05 | 0,05 | 0,00 | 0,05 |
| 5 | 2 | 0,15 | 0,04 | 0,11 | 0,07 | 0,00 | 0,07 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |
| 5 | 3 | 0,19 | 0,07 | 0,13 | 0,10 | 0,01 | 0,07 | 0,05 | 0,00 | 0,05 |
| 5 | 4 | 0,21 | 0,10 | 0,11 | 0,09 | 0,00 | 0,09 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| 5 | 5 | 0,10 | 0,02 | 0,09 | 0,07 | 0,00 | 0,07 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |
| 5 | 6 | 0,10 | 0,02 | 0,08 | 0,09 | 0,01 | 0,08 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |
| 5 | 7 | 0,15 | 0,03 | 0,09 | 0,10 | 0,01 | 0,08 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |
| 5 | 8 | 0,10 | 0,02 | 0,08 | 0,14 | 0,03 | 0,10 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |
| 5 | 9 | 0,19 | 0,07 | 0,13 | 0,08 | 0,00 | 0,08 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| 5 | 10 | 0,29 | 0,10 | 0,16 | 0,08 | 0,00 | 0,08 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| 6 | 1 | 0,20 | 0,08 | 0,12 | 0,05 | 0,00 | 0,05 | 0,05 | 0,00 | 0,05 |
| 6 | 2 | 0,22 | 0,09 | 0,12 | 0,10 | 0,01 | 0,08 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| 6 | 3 | 0,14 | 0,03 | 0,12 | 0,10 | 0,00 | 0,10 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| 6 | 4 | 0,23 | 0,11 | 0,12 | 0,09 | 0,00 | 0,09 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| 6 | 5 | 0,22 | 0,09 | 0,14 | 0,10 | 0,01 | 0,09 | 0,06 | 0,00 | 0,06 |
| 6 | 6 | 0,19 | 0,09 | 0,11 | 0,12 | 0,03 | 0,08 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |
| 6 | 7 | 0,20 | 0,08 | 0,12 | 0,11 | 0,02 | 0,08 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| 6 | 8 | 0,24 | 0,09 | 0,15 | 0,13 | 0,03 | 0,07 | 0,05 | 0,00 | 0,05 |
| 6 | 9 | 0,20 | 0,04 | 0,13 | 0,13 | 0,03 | 0,08 | 0,03 | 0,00 | 0,03 |
| 6 | 10 | 0,19 | 0,05 | 0,15 | 0,10 | 0,00 | 0,10 | 0,04 | 0,00 | 0,04 |

## 10.2 Expérience 2

### 10.2.1 Paramètres physico-chimique de l'eau

**Tableau 8**. Paramètres physico-chimique des réservoirs par date. T : température ; pH-1 : pH mesurés par le pH-mètre ; pH-2 : pH mesuré par l'ordinateur de pH.

| | Réservoir A | | | | Réservoir B | | | | Réservoir C | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Date | T °C | Salinité | pH-1 | pH-2 | T °C | Salinité | pH-1 | pH-2 | T °C | Salinité | pH-1 | pH-2 |
| 02-avr | 19,1 | 37,6 | 7,9 | 8,0 | 18,2 | 37,4 | 7,6 | 7,7 | 18,6 | 37,6 | 7,4 | 7,5 |
| 03-avr | 18,9 | 37,6 | 8,1 | 8,1 | 19,0 | 37,5 | 7,7 | 7,7 | 18,6 | 37,7 | 7,4 | 7,4 |
| 04-avr | 18,7 | 37,7 | 8,0 | 8,0 | 19,1 | 38,0 | 7,8 | 7,8 | 18,4 | 37,7 | 7,4 | 7,4 |
| 05-avr | 18,9 | 37,5 | 8,1 | 8,1 | 18,0 | 37,4 | 7,7 | 7,7 | 18,5 | 37,8 | 7,6 | 7,5 |
| 06-avr | 18,8 | 37,7 | 8,1 | 8,1 | 18,7 | 37,6 | 7,7 | 7,7 | 19,0 | 37,8 | 7,4 | 7,4 |
| 07-avr | 18,8 | 37,7 | 8,1 | 8,1 | 18,0 | 37,6 | 7,8 | 7,7 | 18,9 | 37,9 | 7,4 | 7,4 |
| 08-avr | 18,8 | 37,7 | 8,1 | 8,1 | 19,6 | 37,8 | 7,8 | 7,7 | 19,0 | 37,9 | 7,4 | 7,4 |
| 09-avr | 18,9 | 37,7 | 8,1 | 8,1, | 17,7 | 37,7 | 7,7 | 6,7 | 19,0 | 37,9 | 7,4 | 7,5 |
| 10-avr | 18,7 | 38,1 | 8,1 | 8,1 | 19,9 | 37,8 | 7,7 | 7,7 | 18,6 | 37,7 | 7,5 | 7,4 |
| 11-avr | 18,9 | 37,7 | 8,1 | 8,1 | 17,6 | 37,8 | 7,7 | 7,7 | 18,7 | 38,1 | 7,5 | 7,4 |
| 12-avr | 18,8 | 37,7 | 8,1 | 8,1 | 19,5 | 38,1 | 7,7 | 7,7 | 18,3 | 38,0 | 7,5 | 7,4 |
| 13-avr | 18,9 | 37,8 | 8,0 | 8,1 | 18,5 | 37,9 | 7,6 | 7,7 | 19,4 | 38,3 | 7,5 | 7,5 |
| 14-avr | 18,2 | 38,1 | 8,1 | 8,0 | 19,0 | 38,0 | 7,7 | 7,7 | 18,0 | 38,2 | 7,4 | 7,4 |
| 15-avr | 18,4 | 38,0 | 8,0 | 8,0 | 18,7 | 38,4 | 7,7 | 7,7 | 18,1 | 38,3 | 7,4 | 7,5 |

… continuation tableau 8

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 16-avr | 18,7 | 38,2 | 8,1 | 8,0 | 19,0 | 38,3 | 7,7 | 7,7 | 19,3 | 38,3 | 7,4 | 7,5 |
| 17-avr | 19,8 | 38,0 | 8,1 | 8,1 | 19,2 | 38,1 | 7,7 | 7,7 | 20,3 | 38,4 | 7,6 | 7,6 |
| 18-avr | 18,6 | 38,4 | 8,0 | 8,1 | 18,9 | 38,2 | 7,7 | 7,7 | 19,3 | 38,3 | 7,5 | 7,5 |
| 19-avr | 18,7 | 37,7 | 8,0 | 8,1 | 19,0 | 37,8 | 7,7 | 7,7 | 20,5 | 37,8 | 7,5 | 7,4 |
| 20-avr | 19,1 | 37,7 | 8,1 | 8,0 | 19,3 | 38,0 | 7,7 | 7,7 | 20,9 | 37,7 | 7,4 | 7,4 |
| 21-avr | 19,0 | 37,9 | 8,1 | 8,0 | 18,2 | 37,8 | 7,7 | 7,8 | 19,2 | 38,0 | 7,5 | 7,5 |
| 22-avr | 19,3 | 37,7 | 8,1 | 8,0 | 18,7 | 37,9 | 7,8 | 7,7 | 19,0 | 38,0 | 7,4 | 7,4 |
| 23-avr | 19,1 | 37,9 | 8,1 | 8,0 | 18,6 | 37,9 | 7,7 | 7,7 | 18,9 | 37,9 | 7,4 | 7,4 |
| 24-avr | 19,5 | 37,8 | 8,1 | 8,0 | 18,1 | 37,9 | 7,7 | 7,7 | 18,7 | 37,9 | 7,4 | 7,4 |

**Tableau 9**. Alcalinité totale et niveaux de saturation de calcite et d'aragonite mesurées deux fois par réservoir.

| | T (°C) | Salinité | Alcalinité totale (µmol kg-1) | pH | Ω Calcite | Ω Aragonite |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Réservoir A | 18,2 | 38 | 2988 | 8,085 | 6,4 | 4,16 |
| Réservoir A | 18,5 | 37,8 | 2876 | 8,047 | 5,8 | 3,76 |
| Réservoir B | 18,7 | 37,9 | 2728 | 7,661 | 2,59 | 1,68 |
| Réservoir B | 17,6 | 37 | 2342 | 7,685 | 2,22 | 1,44 |
| Réservoir C | 17,8 | 38,4 | 3152 | 7,439 | 1,81 | 1,18 |
| Réservoir C | 19,1 | 38 | 3152 | 7,41 | 1,78 | 1,16 |

### 10.2.2 Calculs de densité de *Rhodomonas lens* pour nourrir les larves

Etant donné qu'il s'agit d'une culture d'algues vivantes, leur densité au matras augmente avec le temps. Ainsi, tous les 5 jours nous avons calculé la densité de cellules de *R. lens* utilisée pour nourrir les larves de chaque verre. Ci dessous un exemple de calcul correspondant au 2 avril.

Les cellules ont été recomptées dans 6 aliquotes de 0,075 µl dans une chambre de New Bauer. La moyenne de 362,5 cellules par 0,075µl$^{-1}$ a été extrapolé à un microlitre

| Ali-quote | N° de cellules |
|---|---|
| 1 | 119 |
| 2 | 114 |
| 3 | 114 |
| 4 | 135 |
| 5 | 116 |
| 6 | 127 |

**Calculs :**

x̄ aliquotes = 362,5 cellules * 0,075µl$^{-1}$

$$x = \frac{(0{,}075\ \mu l * 362{,}5\ \text{cellules})}{1\ \mu l} = 4\ 833\ \text{cellules}\ \mu l^{-1}$$

$$x = \frac{(1000 \mu l * 4\ 833\ \text{cellules} * \mu l^{-1})}{1\ \text{ml}} = 4\ 833\ 333\ \text{cellules ml}^{-1}$$

Considérant que la densité optimale de *R. lens* pour nourrir les larves est de 2 000 cellules ml$^{-1}$. Nous avons calculé le volume d'eau de culture de R. lens à prélever pour nourrir les larves de chaque verre :

$$x = \frac{(2\ 000\ \text{ml} * 20\ 000\ \text{cellules} * \text{ml}^{-1})}{4\ 833\ 333\ \text{cellules} * \text{ml}^{-1}}$$ = 0,83 ml d'eau de culture de *R. lens*

### 10.2.3 Calculs de densité d'œufs et de larves à ensemencer

Pour obtenir une densité de 20 œufs $ml^{-1}$, nous avons d'abord recompté le nombre d'œufs fécondés (contenus dans un bécher de 1600 ml) dans 5 aliquotes de 0,2 ml. Puis nous avons moyenné le nombre d'œufs des aliquotes et finalement calculé combien d'œufs il y a dans le bécher de 1600 ml :

| Ali-quote | N° d'œufs fécondés |
|---|---|
| 1 | 268 |
| 2 | 318 |
| 3 | 68 |
| 4 | 281 |
| 5 | 103 |

**Calculs :**

x̄ aliquotes = 207,6 œufs fécondés * 0,2 $ml^{-1}$

$$x = \frac{(1\ \text{ml} * 207{,}6\ \text{oeufs} * \text{ml}^{-1})}{0{,}2\ \text{ml}}$$ = 1038 œufs fécondés $ml^{-1}$

$$x = \frac{(1600\ \text{ml} * 1038\ \text{oeufs} * \text{ml}^{-1})}{1\ \text{ml}}$$ = 1 660 800 œufs fécondés * 1600 $ml^{-1}$

Ensuite, si dans chaque cône il y a 25 000 ml d'eau de mer et que la densité requise est de 20 œufs*$ml^{-1}$, nous avons besoin de 500 000 œufs pour chaque cône et un totale de 1 500 000, alors la quantité du bécher est suffisante (1 660 800 œufs fécondés).

Ci-dessous, le volume d'eau à extraire du bécher de 1600 ml pour ensemencer chaque cône :

$$x = \frac{(25\ 000\ \text{ml} * 20\ \text{oeufs} * \text{ml}^{-1})}{1038\ \text{oeufs} * \text{ml}^{-1}}$$ = 481,7 ml d'eau à ensemencer par cône

Deux jours après, quand les œufs sont devenus des larves, nous les avons recomptés dans 5 aliquotes de 1 ml pour chaque cône. Pour avoir une densité de 5 larves $ml^{-1}$ nous en avons besoin de 10 000 par verre de 2000 ml et donc 150 000 pour les 15 verres de chaque traitement de pH. Ci-dessous, le volume d'eau à prendre de chaque cône pour ensemencer chaque verre :

| Ali-quote | N° d'œufs fécondés |
|---|---|
| 1 | 13 |
| 2 | 14 |
| 3 | 14 |
| 4 | 12 |
| 5 | 12 |

**Calculs Cône pH 8,0:**

x̄ aliquotes = 13 larves $ml^{-1}$

$$x = \frac{(25\ 000\ \text{ml} * 13\text{larves})}{1\ \text{ml}}$$ = 325 000 larves

$$x = \frac{(2000\ \text{ml} * 5\ \text{larves}\text{ml}^{-1})}{13\ \text{larves ml}^{-1}}$$ = 769,2 ml d'eau à ensemencer par verre

| Ali-quote | N° d'œufs fécondés |
|---|---|
| 1 | 9 |
| 2 | 10 |
| 3 | 11 |
| 4 | 13 |
| 5 | 19 |

**Calculs Cône pH 7,7:**

x̄ aliquotes = 12,4 larves $ml^{-1}$

$$x = \frac{(25\,000 * 12{,}4 \text{larves})}{1\ \text{ml}} = 310\ 000 \text{ larves}$$

$$x = \frac{(2000\ \text{ml} * 5\ \text{larves} * \text{ml}^{-1})}{12{,}4\ \text{larves ml}^{-1}} = 806{,}5 \text{ ml d'eau à ensemencer par verre}$$

| Ali-quote | N° d'œufs fécondés |
|---|---|
| 1 | 10 |
| 2 | 15 |
| 3 | 10 |
| 4 | 17 |
| 5 | 11 |

**Calculs Cône pH 7,4:**

x̄ aliquotes = 12,6 larves $ml^{-1}$

$$x = \frac{(25\,000 * 12{,}6 \text{larves})}{1\ \text{ml}} = 315\ 000 \text{ larves}$$

$$x = \frac{(2000\ \text{ml} * 5\ \text{larves} * \text{ml}^{-1})}{12{,}6\ \text{larves ml}^{-1}} = 793{,}7 \text{ ml d'eau à ensemencer par verre}$$

### 10.2.4 Densité larvaire

**Tableau 10.** Densité (larves $ml^{-1}$) larvaire de au cours du temps ($t_0$-$t_{10}$) en fonction du pH.

| | Bécher | t0 | t1 | t2 | t3 | t4 | t5 | t6 | t7 | t8 | t9 | t10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pH 8,0 | 1 | 5,00 | 2,67 | 1,33 | 1,00 | 1,00 | 1,33 | 0,33 | 0,67 | 0,33 | 0,67 | 0,00 |
| | 2 | 5,00 | 6,00 | 0,67 | 1,00 | 2,67 | 1,33 | 0,33 | 0,33 | 0,33 | 0,00 | 0,00 |
| | 3 | 5,00 | 1,67 | 1,00 | 1,33 | 0,33 | 0,67 | 1,00 | 1,00 | 0,00 | 0,33 | 0,00 |
| | 4 | 5,00 | 4,33 | 1,00 | 0,67 | 0,33 | 1,00 | 0,33 | 0,67 | 0,33 | 0,33 | 0,33 |
| | 5 | 5,00 | 4,00 | 1,00 | 0,67 | 0,33 | 0,33 | 0,00 | 0,33 | 0,33 | 0,67 | 0,00 |
| | 6 | 5,00 | 3,33 | 2,33 | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 0,33 | 0,33 | 0,33 | 0,00 | 0,33 |
| | 7 | 5,00 | 5,00 | 2,00 | 1,00 | 0,67 | 0,33 | 0,00 | 0,67 | 0,00 | 0,00 | 0,33 |
| | 8 | 5,00 | 4,33 | 1,33 | 1,00 | 2,00 | 1,33 | 0,33 | 0,00 | 0,67 | 1,33 | 0,33 |
| | 9 | 5,00 | 7,00 | 2,33 | 1,00 | 1,67 | 1,33 | 0,67 | 0,67 | 0,33 | 0,33 | 0,00 |
| | 10 | 5,00 | 2,67 | 0,33 | 1,00 | 2,33 | 1,00 | 0,33 | 0,00 | 0,33 | 0,33 | 0,33 |
| | 11 | 5,00 | 3,67 | 3,00 | 1,67 | 0,33 | 0,67 | 0,67 | 0,33 | 0,33 | 0,00 | 0,00 |
| | 12 | 5,00 | 2,33 | 3,67 | 1,00 | 1,00 | 0,67 | 0,33 | 0,33 | 0,33 | 0,00 | 0,33 |
| | 13 | 5,00 | 5,00 | 2,67 | 1,33 | 0,67 | 0,33 | 0,00 | 0,33 | 0,33 | 1,67 | 0,67 |
| | 14 | 5,00 | 5,33 | 2,00 | 0,67 | 1,67 | 1,33 | 0,33 | 0,33 | 0,33 | 0,00 | 0,33 |
| | 15 | 5,00 | 3,33 | 2,00 | 1,33 | 2,67 | 1,33 | 0,00 | 1,33 | 0,33 | 0,00 | 0,00 |

… continuation tableau 10

| | Bécher | t0 | t1 | t2 | t3 | t4 | t5 | t6 | t7 | t8 | t9 | t10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| pH 7,7 | 1 | 5,00 | 4,00 | 2,67 | 2,00 | 0,67 | 1,33 | 0,00 | 0,00 | 1,00 | 0,33 | 0,00 |
| | 2 | 5,00 | 2,00 | 2,00 | 1,33 | 1,00 | 0,33 | 1,67 | 0,33 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 3 | 5,00 | 2,00 | 2,33 | 0,33 | 0,33 | 0,33 | 0,00 | 0,00 | 0,33 | 0,33 | 0,00 |
| | 4 | 5,00 | 4,00 | 2,67 | 0,33 | 0,67 | 0,33 | 0,00 | 0,00 | 0,33 | 0,00 | 0,00 |
| | 5 | 5,00 | 3,00 | 1,00 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,33 | 0,00 | 0,00 | 0,33 | 0,00 |
| | 6 | 5,00 | 3,67 | 3,00 | 0,67 | 0,33 | 0,00 | 0,33 | 0,33 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 7 | 5,00 | 2,00 | 3,67 | 1,00 | 0,33 | 0,00 | 0,67 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 8 | 5,00 | 2,67 | 0,33 | 0,67 | 0,00 | 0,33 | 0,33 | 0,00 | 0,33 | 0,33 | 0,00 |
| | 9 | 5,00 | 5,67 | 2,33 | 1,00 | 0,67 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,33 |
| | 10 | 5,00 | 3,67 | 1,67 | 1,67 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,33 | 0,33 | 0,33 |
| | 11 | 5,00 | 2,33 | 1,00 | 0,33 | 0,33 | 0,33 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 12 | 5,00 | 1,33 | 3,00 | 2,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,33 | 0,00 | 0,33 |
| | 13 | 5,00 | 3,67 | 1,33 | 1,33 | 1,33 | 0,67 | 0,00 | 0,00 | 0,33 | 0,33 | 0,00 |
| | 14 | 5,00 | 2,00 | 1,33 | 2,67 | 0,33 | 0,33 | 0,00 | 0,00 | 0,33 | 0,33 | 0,00 |
| | 15 | 5,00 | 2,33 | 3,67 | 3,00 | 0,67 | 0,00 | 0,00 | 0,33 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | Bécher | t0 | t1 | t2 | t3 | t4 | t5 | t6 | t7 | t8 | t9 | t10 |
| pH 7,4 | 1 | 5,00 | 1,67 | 1,67 | 0,00 | 1,00 | 0,33 | 0,33 | 1,00 | 2,00 | 0,67 | 0,00 |
| | 2 | 5,00 | 1,67 | 0,67 | 1,00 | 0,67 | 0,00 | 0,00 | 1,00 | 1,33 | 0,33 | 0,00 |
| | 3 | 5,00 | 2,00 | 1,33 | 0,67 | 2,67 | 1,00 | 1,00 | 1,67 | 1,00 | 1,00 | 0,00 |
| | 4 | 5,00 | 2,33 | 3,00 | 1,00 | 2,67 | 1,00 | 0,00 | 1,00 | 0,33 | 0,33 | 0,00 |
| | 5 | 5,00 | 1,00 | 1,33 | 2,33 | 3,00 | 1,33 | 1,00 | 2,33 | 0,33 | 0,00 | 0,67 |
| | 6 | 5,00 | 1,67 | 1,00 | 1,67 | 0,00 | 1,67 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,33 |
| | 7 | 5,00 | 0,33 | 1,00 | 1,00 | 0,67 | 1,67 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,33 |
| | 8 | 5,00 | 0,67 | 1,00 | 1,67 | 1,00 | 2,00 | 1,00 | 2,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 9 | 5,00 | 1,33 | 3,00 | 1,67 | 2,33 | 0,33 | 1,67 | 1,67 | 0,67 | 0,00 | 0,00 |
| | 10 | 5,00 | 0,00 | 1,33 | 0,67 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 2,00 | 0,00 | 0,33 | 0,00 |
| | 11 | 5,00 | 1,67 | 1,67 | 2,33 | 3,33 | 1,00 | 3,00 | 0,00 | 0,33 | 0,33 | 0,33 |
| | 12 | 5,00 | 3,00 | 4,00 | 2,00 | 1,67 | 2,33 | 1,00 | 2,00 | 0,67 | 0,33 | 0,33 |
| | 13 | 5,00 | 0,33 | 0,67 | 0,33 | 1,00 | 1,67 | 3,67 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 14 | 5,00 | 1,33 | 0,33 | 1,33 | 1,67 | 2,33 | 1,00 | 0,67 | 0,00 | 0,67 | 0,00 |
| | 15 | 5,00 | 1,33 | 0,33 | 1,00 | 0,80 | 0,33 | 0,33 | 0,00 | 0,67 | 0,00 | 0,00 |

### 10.2.5 Morphométrie larvaire

**Tableau 10.** Longueur de bras post-oraux au cours du temps (t1-$t_{10}$) en fonction du pH. A

| Date | | Al | pH 8,0 | pH 7,7 | pH 7,4 | Date | | AL | pH 8,0 | pH 7,7 | pH 7,4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 03-avr | t1 | 1 | 0,16 | 0,14 | 0,11 | 15-avr | t6 | 1 | 0,66 | 0,75 | 0,55 |
| | | 2 | 0,15 | 0,19 | 0,04 | | | 2 | 0,82 | 0,64 | 0,58 |
| | | 3 | 0,11 | 0,21 | 0 | | | 3 | 0,82 | 0,8 | 0,44 |
| | | 4 | 0,08 | 0,14 | 0,05 | | | 4 | 0,66 | 0,87 | 0,61 |
| | | 5 | 0,15 | 0,2 | 0,07 | | | 5 | 0,66 | 0,46 | 0,56 |
| | | 6 | 0,16 | 0,1 | 0,05 | | | 6 | 0,5 | 0,6 | 0,33 |
| | | 7 | 0,16 | 0,16 | 0,03 | | | 7 | 0,57 | 0,8 | 0,49 |
| | | 8 | 0,13 | 0,15 | 0,04 | | | 8 | 0,77 | 0,7 | 0,71 |
| | | 9 | 0,15 | 0,1 | 0 | | | 9 | 0,85 | 0,71 | 0,55 |
| | | 10 | 0,19 | 0,03 | 0,08 | | | 10 | 0,63 | 0,73 | 0,64 |

… continuation tableau 10

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 05-avr | t2 | 1 | 0,14 | 0,08 | 0,07 | 17-avr | t7 | 1 | 0,73 | 0,64 | 0,71 |
| | | 2 | 0,11 | 0,19 | 0 | | | 2 | 0,78 | 0,82 | 0,56 |
| | | 3 | 0,14 | 0,2 | 0,09 | | | 3 | 0,72 | 0,98 | 0,4 |
| | | 4 | 0,21 | 0,12 | 0,14 | | | 4 | 0,65 | 0,71 | 0,45 |
| | | 5 | 0,23 | 0,09 | 0,05 | | | 5 | 0,65 | 0,88 | 0,38 |
| | | 6 | 0,15 | 0,12 | 0,08 | | | 6 | 0,73 | 0,98 | 0,62 |
| | | 7 | 0,17 | 0,21 | 0 | | | 7 | 0,82 | 1,12 | 0,61 |
| | | 8 | 0,16 | 0,25 | 0,07 | | | 8 | 0,66 | 0,76 | 0,6 |
| | | 9 | 0,13 | 0,19 | 0,06 | | | 9 | 0,66 | 0,57 | 0,71 |
| | | 10 | 0,18 | 0,09 | 0,13 | | | 10 | 0,77 | 0,71 | 0,72 |
| 08-avr | t3 | 1 | 0,18 | 0,36 | 0,22 | 19-avr | t8 | 1 | 0,71 | 0,85 | 0,69 |
| | | 2 | 0,42 | 0,32 | 0,2 | | | 2 | 0,94 | 0,95 | 0,65 |
| | | 3 | 0,26 | 0,14 | 0,04 | | | 3 | 0,7 | 0,76 | 0,42 |
| | | 4 | 0,28 | 0,33 | 0,11 | | | 4 | 0,81 | 0,88 | 0,81 |
| | | 5 | 0,22 | 0,47 | 0 | | | 5 | 0,68 | 0,91 | 0,43 |
| | | 6 | 0,31 | 0,21 | 0,15 | | | 6 | 0,69 | 0,59 | 0,5 |
| | | 7 | 0,2 | 0,25 | 0,15 | | | 7 | 0,79 | 0,79 | 0,7 |
| | | 8 | 0,33 | 0,27 | 0,09 | | | 8 | 0,82 | 0,83 | 0,56 |
| | | 9 | 0,11 | 0,16 | 0,15 | | | 9 | 0,81 | 0,83 | 0,68 |
| | | 10 | 0,23 | 0,25 | 0,12 | | | 10 | 0,78 | 0,82 | 0,76 |
| 10-avr | t4 | 1 | 0,33 | 0,43 | 0,28 | 22-avr | t9 | 1 | 0,85 | 0,7 | 0,57 |
| | | 2 | 0,38 | 0,18 | 0,33 | | | 2 | 0,56 | 0,85 | 0,68 |
| | | 3 | 0,36 | 0,4 | 0,09 | | | 3 | 0,97 | 0,79 | 0,56 |
| | | 4 | 0,17 | 0,53 | 0,29 | | | 4 | 0,64 | 0,75 | 0,65 |
| | | 5 | 0,47 | 0,38 | 0,16 | | | 5 | 0,49 | 0,94 | 0,72 |
| | | 6 | 0,22 | 0,47 | 0,2 | | | 6 | 0,44 | 1 | 0,83 |
| | | 7 | 0,49 | 0,35 | 0,15 | | | 7 | 0,75 | 0,64 | 0,78 |
| | | 8 | 0,36 | 0,34 | 0,24 | | | 8 | 0,49 | 0,83 | 0,78 |
| | | 9 | 0,18 | 0,28 | 0 | | | 9 | 1 | 0,84 | 0,83 |
| | | 10 | 0,54 | 0,27 | 0 | | | 10 | 0,85 | 0,9 | 0,56 |
| 13-avr | t5 | 1 | 0,61 | 0,51 | 0,42 | 24-avr | t10 | 1 | 0,84 | 0,81 | 0,84 |
| | | 2 | 0,7 | 0,51 | 0,71 | | | 2 | 0,7 | 0,87 | 0,68 |
| | | 3 | 0,55 | 0,55 | 0,1 | | | 3 | 0,91 | 0,72 | 0 |
| | | 4 | 0,7 | 0,53 | 0,51 | | | 4 | 0,9 | 0,76 | 0,34 |
| | | 5 | 0,45 | 0,67 | 0,05 | | | 5 | 0,32 | 0,91 | 0,82 |
| | | 6 | 0,58 | 0,58 | 0,35 | | | 6 | 0,58 | 0,65 | 0,74 |
| | | 7 | 0,64 | 0,69 | 0,28 | | | 7 | 0,64 | 0,81 | 0,64 |
| | | 8 | 0,54 | 0,4 | 0,42 | | | 8 | 0,63 | 0,72 | 0,53 |
| | | 9 | 0,77 | 0,56 | 0,35 | | | 9 | 0,52 | 0,52 | 0,68 |
| | | 10 | 0,66 | 0,56 | 0,35 | | | 10 | 0,64 | 0,75 | 0,22 |