



Université du Québec
à Rimouski

**Effet de l'exposition au son des bateaux cargos sur la structure
de la coquille dissoconque des post-larves de moule bleue
(*Mytilus edulis*)**

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en océanographie
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Par

© **Annabelle Blanchet**

Décembre 2024

Composition du Jury

Gesche Winkler, présidente du jury, Université du Québec à Rimouski
Réjean Tremblay, directeur de recherche, Université du Québec à Rimouski
Jean-François Bardeau, codirecteur de recherche, Université du Mans
Remi Sonier, examinateur externe, Pêches et Océans Canada

Dépôt initial : 8 août 2024

Dépôt final : 18 décembre 2024

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

Remerciement

Ce projet n'aurait pas été possible sans toutes les personnes et organismes présentes durant ces deux dernières années!

Je voudrais premièrement remercier mon directeur de recherche Réjean Tremblay, pour l'opportunité, le soutien et la confiance durant ce projet. Je veux aussi remercier mon co-directeur Jean-François Bardeau pour son accueil lors de mes trois mois en France et toutes son aide lors de mon apprentissage de la spectrométrie Raman. Je voudrais aussi remercier Delphine Veillard pour son aide au laboratoire et pour avoir répondu à toutes mes questions durant ce parcours. Merci à Nathalie, qui m'a montré l'élevage larvaire de moule à la station aquicole. Je voudrais aussi remercier Serena qui m'a beaucoup aidé au laboratoire. De plus, je voudrais remercier Natalie Reznikov pour son aide avec les analyses de microscopie, qui ont grandement aidé à cette recherche. Et pour terminer je voudrais remercier tous les co-auteurs participant à mon article de maîtrise, ainsi que les membres de mon jury.

Je voudrais aussi remercier tous les organismes ayant participer au projet : FRQNT, ANR, CRSNG, l'Université du Québec à Rimouski (UQAR), l'ISMER, Ressources Aquatiques Québec (RAQ), MITACS, l'Université du Mans et le projet auditif

Je voudrais aussi remercier ma famille qui m'ont soutenue malgré mon parcours scolaire chargé de rebondissement. Et, je veux aussi remercier mon amoureux ainsi que mes amies pour leur soutien et encouragement.

Résumé

La pollution sonore est un domaine de recherche de plus en plus étudié à cause de l'impact potentiellement dévastateur que celle-ci pourrait avoir sur la vie marine. Dans cette étude, nous avons étudié l'impact du son d'un bateau cargo sur la structure de la coquille dissoconque des post-larves de moule bleue (*Mytilus edulis*). Les larves pédivéligères ont été exposées durant 3 semaines dans les mésocosmes larvosonics, un outil pour l'étude de l'exposition sonore sur les larves invertébrées. Trois niveaux sonores ont été utilisés : bas (121 dB), moyen (127 dB) et élevé (151 dB), ainsi qu'un contrôle sans exposition sonore représentant l'environnement ambiant (116 dB). Les post-larves obtenus ont été placées dans de la résine époxy sur des lames de microscope (48 coquilles / niveau sonore, 196 coquilles totales) pour être examinées par spectrométrie Raman puis par microscopie électronique à balayage et diffraction d'électrons rétrodiffusés.

Les résultats démontrent que la coquille est surtout affectée entre le contrôle et le son bas (121 dB). Cela se traduit notamment en spectroscopie Raman par des changements de positions des modes de vibration associés aux pigments inclus dans les coquilles. Les coquilles semblent présentées moins de trous et de fibres cassées au son faible qu'avec les autres expositions sonores. Le son faible pourrait représenter le niveau sonore présent dans l'environnement naturel des moules en milieu côtier, qui est un niveau sonore plus élevé que le niveau sonore de l'océan en milieu profond. Un son de bateau faible peut donc agir comme un indice positif de sélection de l'habitat lors de la métamorphose des moules. Ce son permet donc à celle-ci de mettre plus d'énergie dans la construction de la coquille et de perdre moins d'énergie lors du choix de son habitat. Le contrôle et le son élevé pourrait créer un délai de métamorphose, engendrant ainsi des moules avec un niveau d'énergie plus faible, ayant une coquille avec plus de trous et des fibres de calcites plus cassantes. Un changement dans l'amplitude de l'ouverture des valves avec un nombre plus élevé de fermetures pourrait être responsable de la création d'un environnement plus acide. La plus faible disponibilité en énergie et l'environnement acide pourrait être les facteurs responsables des différences observées dans la coquille

Abstract

Noise pollution is gaining more attention in research due to the potential damaging impact that it could have on marine fauna. In this present work, we studied the impact of cargo ship noise on the dissoconch shell structure of blue mussel (*Mytilus edulis*) post-larvae. The pediveliger larvae were exposed for 3 weeks in larvosonic mesocosms, a tool for sound exposure on invertebrate larvae. Three sound levels were used: low (121 dB), medium (127 dB) and high (151 dB), as well as a control without sound representing the ambient environment (116 dB). The post-larvae obtained were placed in epoxy resin on a microscopy slide (48 shells / sound level, 196 shells in total) to be examined with Raman spectrometry, scanning electron microscopy and electron backscatter diffraction.

The results showed that the shell was mostly affected between the control and the low sound level by a change in the vibrational mode of the pigment found in the shell. The resulting shell seems more robust at low sound level than at the other sound exposure with less holes and breaking calcite fibres. This result suggests that the low sound level could be close to their natural environment which is noisier than the ambient noise in the deeper ocean. The mussel used that sound as a positive cue to select their habitat for metamorphosis. The mussel can then invest more energy in building a robust shell and less when finding a habitat. The control and higher sound level could create a metamorphosis delay, resulting in mussel with a lower energy level, creating a shell with more holes and with breaking of calcite fibres. Also, a change in valve opening amplitude with more closure could create a more acidic environment. This, in addition to the lower energy availability, could create the differences seen in the shell studied.

Table des matières

Remerciement	vii
Résumé	ix
Abstract	x
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures	xiv
Introduction générale	1
Les sons anthropiques dans le milieu marin.....	2
Cycle larvaire de la moule bleue	5
L’audition chez les bivalves	10
Impact du son sur la moule	12
Processus de formation de la coquille	14
Étude de la coquille de la moule bleue par spectrométrie Raman.....	19
Objectifs et hypothèse	23
Article 1: EFFECT OF CARGO SHIP NOISE ON THE DISSOCONCH SHELL STRUCTURE OF BLUE MUSSEL POST-LARVAE.....	24
Abstract	25
1.1 Introduction.....	26
1.2 Material and Methods	28
1.2.1 Larval culture and sound exposure.....	28
1.2.2 Behaviour analysis	30
1.2.3 Mussel shell’s slides production.....	31
1.2.4 Raman analysis.....	32
1.2.5 Scanning electron microscopy (SEM).....	33
1.2.6 X-ray microscopy	34
1.3 Results.....	35
1.3.1 Behaviour analysis.....	35
1.3.2 Raman spectrometry.....	36
1.3.3 Microscopy	40

1.3.3.1	Scanning electron microscopy (SEM).....	40
1.3.3.2	Electron backscatter diffraction (EBSD).....	41
1.4	Discussion.....	43
1.4.1	Mineral peak position.	44
1.4.2	Intensity ratio and EBSD microscopy	45
1.4.3	Pigments	46
1.5	Conclusion	48
	Discussion / conclusion générale	49
	Bibliographie.....	53

Liste des tableaux

Tableau 1: ANOVA results for each of the mineral peaks in aragonite and calcite shell.....	38
Tableau 2: ANOVA results for the intensity ratio measured in the aragonite and in the calcite shell.....	38

Liste des figures

Figure 1: Image tirée de Bonnel et al. (2022). Comparaison des gammes fréquentielles des bruits anthropiques perçus sous l'eau avec la gamme d'audition et de production sonore des animaux marins.	3
Figure 2: Carte représentant les principales routes des bateaux circulant dans la région du golfe du Saint-Laurent. La carte a été créée sur Maritime Traffic – Global Tracking Intelligence (https://www.marinetraffic.com/fr/ais).	4
Figure 3: Cycle de vie de la moule bleue (<i>Mytilus Edulis</i>). Image tirée de Toupoint, 2012. M signifie métamorphose et F est pour fécondation.	6
Figure 4: Coquille de post-larve de moule bleue. B : Coquille de post-larve de moule bleu avec les différentes coquilles représentées. En bleu, on retrouve la coquille prodissoconque I (PI). En rose, on retrouve la coquille prodissoconque II (PII). La partie non colorée représente la coquille dissoconque (D).	7
Figure 5: image tirée de Helm & Bourne, 2006 représentant l'évolution des larves de moule à partir de l'embryon (A) vers le stade de trochophore (B), l'apparition de la première coquille prodissoconque I (C) et finalement le stade D-véligère (D).	7
Figure 6: Image tirée de Carl et al., 2011 représentant une moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> au stade pédivéligère (A) et plantigrade (B)	9
Figure 7: Groupe de larves de moules compétentes formant des cheminées.	9
Figure 8: Image tirée de Bonnel et al., 2022. Anatomie d'une larve pédivéligère de coquille Saint-Jacques (<i>Pecten maximus</i>) avec le positionnement des statocystes à la base du pied.	11
Figure 9: figure tirée de Louis et al., 2022. L'espace extrapallial est situé dans un espace fermé formé du manteau, du périostracum. La formation de cristaux d'aragonite et de calcite se produit dans cette espace.	16
Figure 10: Figure tirée de Marin et al., 2007. Cette figure représente la physiologie de la calcification de la coquille. On peut donc voir que différentes cellules vont être responsables de la	

formation de la coquille dissoconque (couche prismatique) et une autre couche de coquille va former la coquille d'aragonite nacré (couche nacré). Cette disposition successive de cellule permet de créer des couches de coquilles différentes..... 16

Figure 11: Figure tirée de Feng et al., 2000 de microscopie électronique représentant les couches de la coquille de *Mytilus Edulis*. À partir du haut de l'image, on retrouve le périostracum (A), la couche oblique prismatique de calcite (coquille dissoconque) (B), une couche de transition de calcite prismatique perpendiculaire à la surface de la coquille (C) et la couche d'aragonite nacré composée de plaquette disposée sous forme de brique (D)..... 18

Figure 12: Figure tirée de Soldati & Jacob, 2016. Cette image illustre la différence entre la calcite et l'aragonite sur l'organisation cristalline. Les deux ont la même formule chimique CaCO_3 , cependant leur arrangement sous forme de cristal est différent. La calcite possède une forme trigonale alors que l'aragonite est plutôt orthorhombique. 18

Figure 13: Figure tirée de Pirutin et al., 2023. Lors d'une analyse par spectrométrie Raman, les molécules vont gagner en énergie et changer de niveau vibrationnel. La majorité des photons diffusés se feront sans changement de longueur d'onde : diffusion Rayleigh. Les diffusions inélastiques stokes et anti-stokes permettront de donner des informations sur la structure et la composition chimique du matériau étudié. 20

Figure 14: Cartographie d'intensité Raman effectué sur la zone de transition entre la coquille PII et D d'une moule bleue (*Mytilus edulis*). L'image A représente les zones contenant de l'aragonite alors que l'image B montre les zones contenant de la calcite. Il est aussi possible de faire des images avec les deux éléments combinés (C). Le rouge représente la calcite et le bleu, l'aragonite. 21

Figure 15: Exemple de spectres Raman obtenus sur les coquilles de ce projet. En A, on retrouve le spectre associé à l'aragonite et en B, celui de la calcite. Les bandes intenses observées à 1098 cm^{-1} et 1484 cm^{-1} sont attribuées à la présence de pigments dans la coquille. Leurs intensités vont dépendre de la présence accrue ou non du pigment dans la zone étudiée. 22

Figure 16: Example of movement recorded during the experiment by the Noldus Ethosvision software. We can see the swimming path and the static larvae (arrow head) 31

Figure 18: 3D rendering of several mussel shells, two of which are labelled to illustrate shell

thickness.....	34
----------------	----

Figure 19: Effect of sound exposure on the activity rate (mobile larvae (%)) of blue mussel pediveliger larvae after 8 days of exposition. The red dot shows the respective mean for each sound level.	35
--	----

Figure 20: Effect of sound exposure on the total distance travelled of pediveliger blue mussel larvae after 8 days of exposition. In this boxplot, the middle line represents the means, the square is the mean $\pm$ SE and the line is the mean+1.96*SE.....	36
---	----

Figure 21: Position variation of pigment peaks from Raman vibrational spectra. The red dot shows the respective mean for each sound level. In A (PII shell) and B (D shell), we have the first pigment peaks obtained for the peaks around 1098cm ⁻¹ from fitting with labspec6 software. In C (PII shell) and D (D shell), we have the first pigment peaks obtained for the peaks around 1484cm ⁻¹ from fitting with labspec6 software.	38
--	----

Figure 22: Difference in the Raman shift position of pigment peaks from Raman vibrational spectra in between the PII shell and the D shell (Δ =PII shell pigment position – D shell pigment position). The red dot shows the respective mean for each sound level. The position's difference for the first pigments peaks obtained around 1098cm ⁻¹ (A) and for the first pigment peaks obtained around 1484cm ⁻¹ (B) is the results of fitting with labspec6 software.....	39
--	----

Figure 23: Scanning electron microscopy of two shells of blue mussel post-larvae. In A, we have one of the larvae in the control group. In B, we have a mussel exposed to the low sound level.	40
--	----

Figure 24: Electron backscatter diffraction (EBSD) of a shell of blue mussel larvae from the control group treatment (116dB).	42
---	----

Figure 25: Electron backscatter diffraction (EBSD) of a shell of blue mussel larvae from the low sound treatment group (121dB).....	42
--	----

Figure 26: Amplitude de l'ouverture des valves (VOA (%)) obtenue par une exposition au son des bateaux cargos dans les larvosonics. Cette image est tirée de l'étude de Byrro-Gauthier (en préparation).	50
--	----

Introduction générale

Le milieu marin possède des caractéristiques particulières qui rendent l'étude de l'effet du son sur les organismes qui l'habitent différents des études en milieu terrestre. Le son est par définition une onde qui se propage dans un milieu compressible à une vitesse de $\sim 1500 \text{ m}\cdot\text{sec}^{-1}$ dans l'eau comparativement à $\sim 340 \text{ m}\cdot\text{sec}^{-1}$ dans l'air. Le son se propage sur de plus grandes distances et avec moins d'atténuation que dans l'air, ce qui entraînera une perturbation du milieu lors de son passage (Atema et al., 1988). L'eau salée de l'océan va aussi avoir pour effet d'accroître la vitesse de propagation du son de 3 % par rapport à l'eau douce (Atema et al., 1988). C'est aussi le cas pour la température et la profondeur qui vont avoir tendance à accroître la vitesse du son lorsque ceux-ci augmentent (Atema et al., 1988). Pour exprimer l'intensité acoustique, on utilise les décibels (dB). Dans le milieu marin, les décibels relatifs à $1 \mu\text{Pa}$ sont utilisés, alors que dans l'air ce sont plutôt $20 \mu\text{Pa}$ (Bonnell et al., 2022). Cette différence est basée sur le minimum d'audition de l'oreille humaine. Dans l'océan, ce seuil est diminué à seulement un $1 \mu\text{Pa}$ (Bonnell et al., 2022). Ainsi, les sons se comportent différemment dans l'air et dans l'eau, et il faut soustraire 26 dB pour obtenir un niveau similaire dans l'air par rapport à celui de l'eau (Bonnell et al., 2022). Le mot « bruit », contrairement au mot « son », a une connotation négative. Les deux se définissent par la propagation d'une onde dans le milieu, tel que vu précédemment. Pour le bruit, on parle donc des sons qui sont considéré comme nuisible ou désagréable (International standard - ISO, 2016). Dans les dernières années, certains bruits ont aussi été considéré comme étant de la pollution, dans ce cas-ci, on parle donc de pollution sonore. La pollution sonore va être particulièrement relié à l'augmentation du niveau de bruit ambiant par les activités humaines jusqu'à un niveau considéré comme nuisible aux animaux, incluant les humains (Slabbekoorn, 2019).

Les sons anthropiques dans le milieu marin

Il y a trois groupes de sources sonores retrouvés dans les océans : la géophonie, la biophonie et l'anthropophonie (Bonnell et al., 2022; Chahouri et al., 2022). La géophonie comprend les sons typiquement naturels qui sont produits par les éléments abiotiques, tels que les vagues, le vent, la pluie, la glace et les courants (Bonnell et al., 2022; Chahouri et al., 2022). La biophonie comprend les sons créés par les animaux (Bonnell et al., 2022; Chahouri et al., 2022). Cela peut par exemple inclure les baleines qui communiquent par écholocalisation, les bruits produits par les animaux lors de l'alimentation ou tout autres bruit produits lors de leur cycle de vie. L'anthropophonie comprend l'ensemble des bruits d'origine humaine que l'on retrouve dans l'eau, telles que l'imagerie sismique (De Soto et al., 2016), le forage, le battage de pieux, le trafic maritime, les activités en littoral, les activités portuaires et l'extraction pétrolière (Bonnell et al., 2022). Les bruits continus, tel que le trafic maritime, sont présents de manières plus importants que les sons ponctuels, tel que le forage ou le battage de pieux. Le trafic maritime est la source sonore qui a contribué le plus à l'augmentation du niveau de bruits dans l'océan (Di Franco et al., 2020; Hildebrand, 2009). L'augmentation est rapide avec un niveau de bruit sonore qui est prédit de doubler aux 11,5 ans en moyenne mondialement (Jalkanen et al., 2022). La Figure 1 compare les différents bruits d'origine anthropiques avec la gamme d'audition des principaux animaux marins ainsi que leur production sonore. La gamme fréquentielle des bruits anthropiques peuvent entrer en conflit avec l'audition et la production sonore des animaux et ainsi créer un stress ou encore un masquage de la communication (Chahouri et al., 2022).

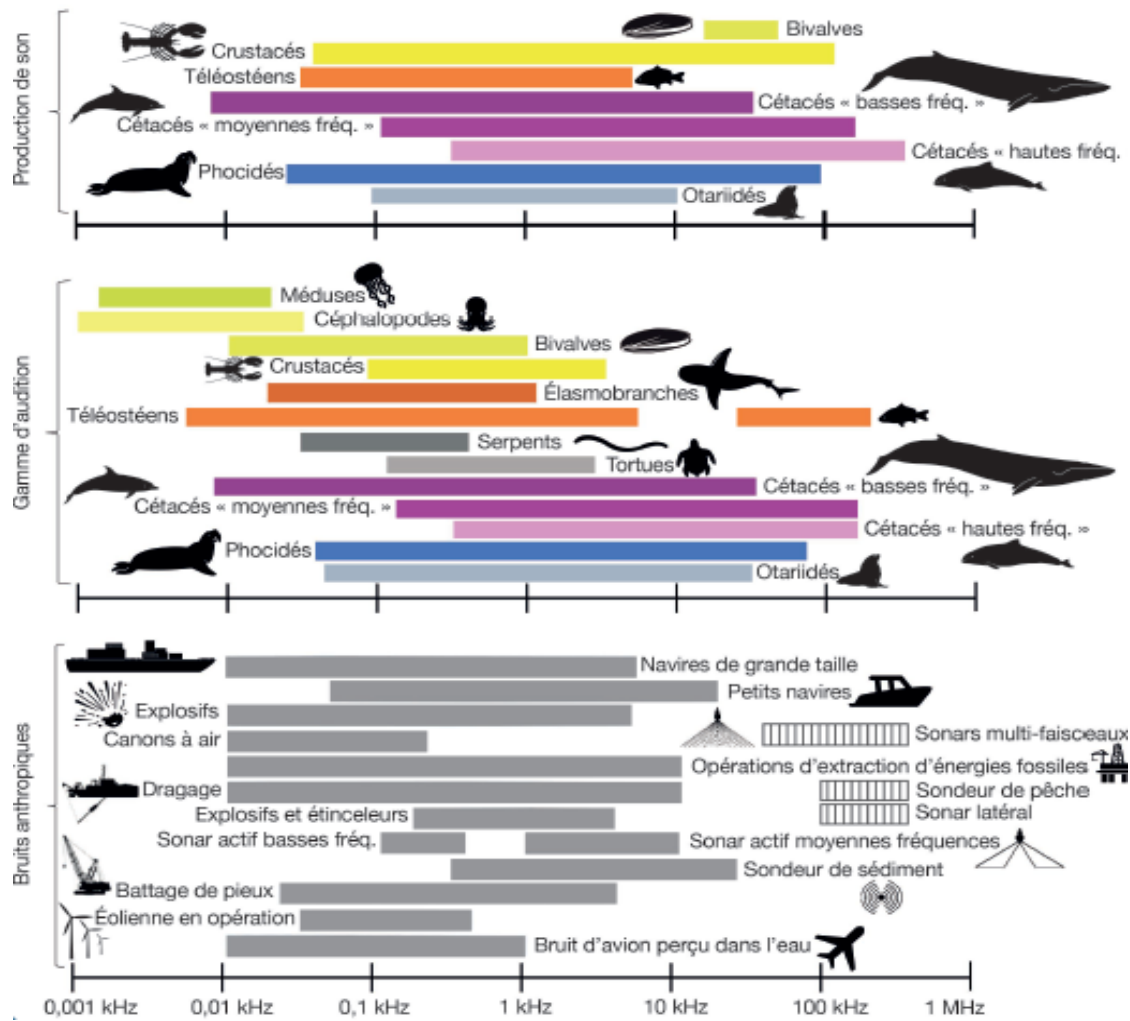


Figure 1: Image tirée de Bonnel et al. (2022). Comparaison des gammes fréquentielles des bruits anthropiques perçus sous l'eau avec la gamme d'audition et de production sonore des animaux marins.

Les bateaux utilisés pour le trafic maritime émettent surtout dans les basses fréquences (Arveson & Vendittis, 2000; Hildebrand, 2009; M. A. McDonald et al., 2006). Le niveau sonore et les caractéristiques du bruit des navires peut dépendre de plusieurs facteurs, dont la taille du navire, sa vitesse, les conditions météorologiques (Bonnel et al., 2022; McKenna et al., 2012) et la machinerie utilisée (Arveson & Vendittis, 2000; Solan & Whiteley, 2016). Les niveaux sonores vont varier autour de 140 dB rel. 1µPa pour les plus

petits bateaux jusqu'à 190 dB rel. $1\mu\text{Pa}$ pour les plus gros bateaux (Bonnell et al., 2022; Hildebrand, 2009). Ces niveaux représentent le son émis mesuré directement à côté du bateau. Le son va par la suite se propager dans l'environnement en traversant de grandes distances (des dizaines à centaines de kilomètres (Solan & Whiteley, 2016) et s'estomper. Le trafic maritime est présent en grande majorité dans les régions côtières (Charifi et al., 2018), où vivent plusieurs espèces exploitées commercialement, telles que la moule bleue. La Figure 2 présente à la fois la localisation des routes maritimes et la fréquence de passages des bateaux dans le golfe du Saint-Laurent et les alentours. Les zones les plus affectées de cette région se trouvent sur les côtes du fleuve Saint-Laurent, autour de la péninsule gaspésienne et autour de la Nouvelle-Écosse. De plus, si l'on regarde de plus près l'émission sonore des navires de grandes tailles avec la gamme d'audition des bivalves sur la Figure 1, les deux se situent dans les mêmes fréquences. Les bateaux sont donc susceptibles de perturber l'audition des bivalves.

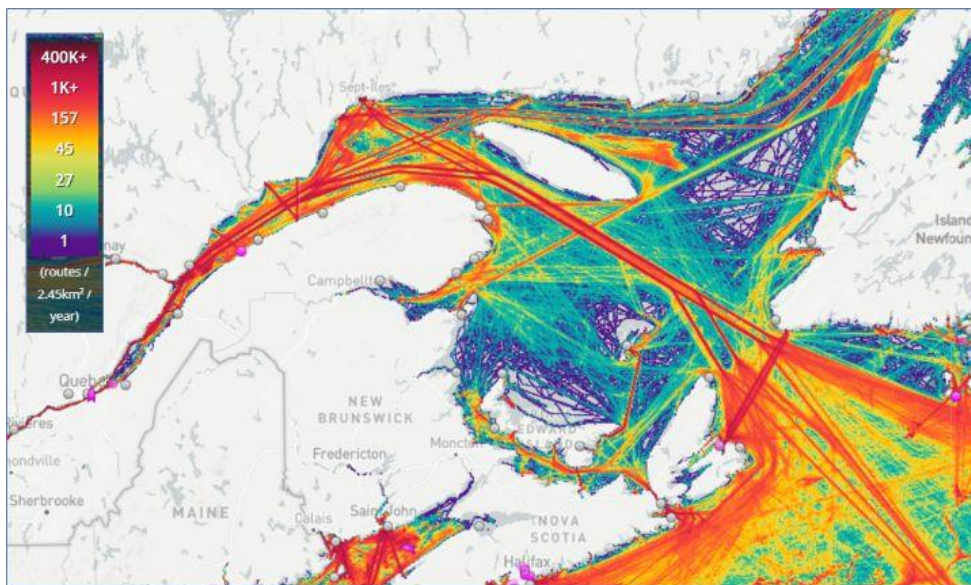


Figure 2: Carte représentant les principales routes des bateaux circulant dans la région du golfe du Saint-Laurent. La carte a été créée sur Maritime Traffic – Global Tracking Intelligence (<https://www.marinetraffic.com/fr/ais>).

Ces sons provenant des bateaux peuvent avoir des impacts sur les organismes marins présents dans les environs. Les dommages les plus évidents pour les espèces avec des systèmes auditifs comme celui des mammifères marins sont les barotraumatismes (De Soto et al., 2013), qui sont des dommages reliés à l'audition. Cependant, les dommages peuvent aussi être indirects, tels que des changements de comportements ou une augmentation du stress tout en étant autant ou sinon plus dommageables (De Soto et al., 2013). De plus, chaque espèce et stade de vie peuvent réagir d'une manière différente suite à une exposition au son (De Soto et al., 2016), suggérant l'accroissement des travaux sur les invertébrés marins négligés dans ce domaine d'études (Solé et al., 2023). Pour ce faire nous avons sélectionné la moule bleue, considérée comme espèce ingénieure de son écosystème (Gosling, 2021) par sa capacité à modifier son environnement par, entre autres, sa grande capacité de filtration. Elles sont abondantes dans les habitats côtiers et leurs services écologiques sont importants grâce à leur stratégie d'alimentation par filtration réduisant l'eutrophisation, à leur capacité de construire des récifs augmentant la richesse et l'abondance des espèces et en agissant comme une proie pour plusieurs espèces d'invertébrés (ex. polychètes, étoiles de mer, buccins et crabes), d'oiseaux et de mammifères marins (Drapeau et al., 2006; Sea et al., 2022; Smaal et al., 2019; Varennes et al., 2015).

Cycle larvaire de la moule bleue

Le cycle de vie de la moule bleue, tel que schématisé par la Figure 3, débute par la fertilisation des œufs dans la colonne d'eau pour entreprendre le cycle de vie pélagique larvaire de l'embryon aux juvéniles (Bassim et al., 2014). La ponte des moules se produit dans l'est du Canada en milieu naturel à partir du printemps entre mai et août (ministère des Pêches et des océans, 2003). La division cellulaire permet à la larve de moule d'atteindre les stades suivants, suite à l'apparition de globules polaires sur l'ovule, confirmant la fécondation de l'œuf (Helm & Bourne, 2006).

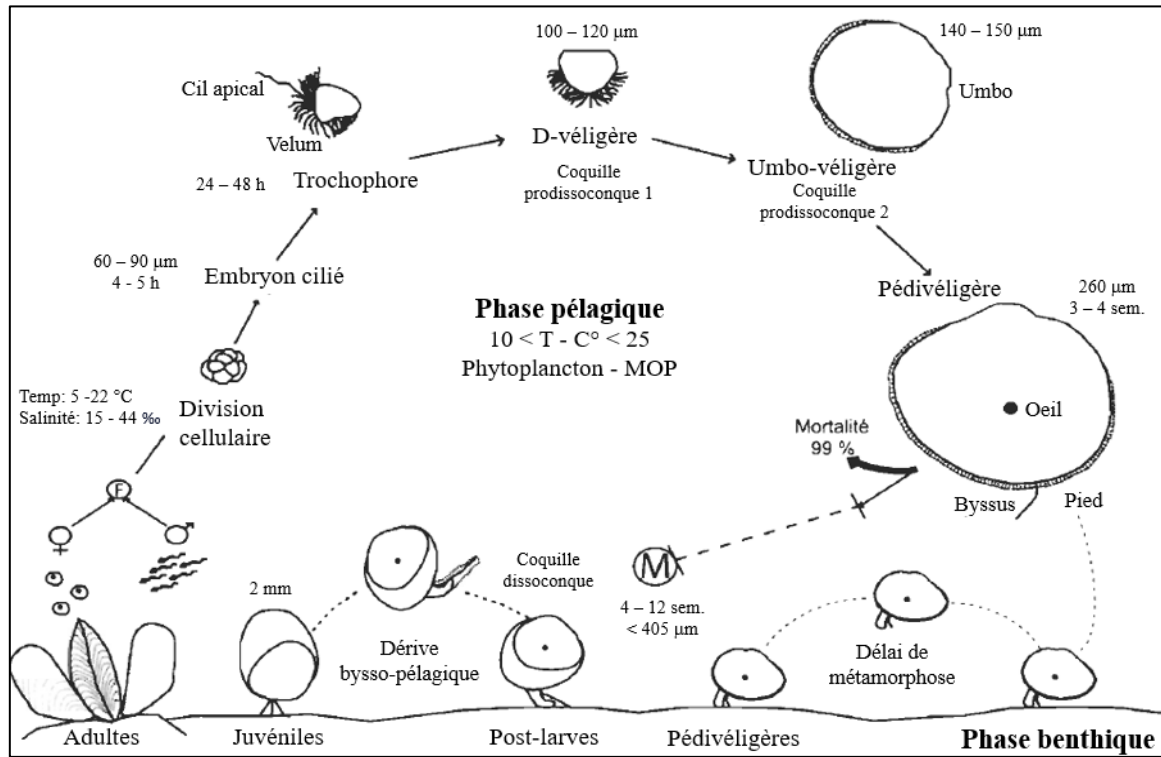


Figure 3: Cycle de vie de la moule bleue (*Mytilus Edulis*). Image tirée de Toupoint, 2012. M signifie métamorphose et F est pour fécondation

Le premier stade larvaire est le stade de trochophore où le velum se développe pour permettre à la moule de se nourrir de phytoplanctons retrouvés dans la colonne d'eau et aussi de se déplacer par les mouvements de ses cils (Helm & Bourne, 2006). Il y aura aussi l'apparition d'un cil apical (Toupoint, 2012). Le deuxième stade larvaire est le stade D-véliger. Son nom provient de sa forme en « D ». Elle est d'une taille d'environ 100 à 120 μm (Toupoint, 2012). Les larves de moules vont continuer de se déplacer dans la colonne d'eau et ainsi se nourrir des phytoplanctons présents dans l'environnement (Bassim et al., 2014) grâce à leur velum, développer au stade précédent, sur lequel les phytoplanctons vont venir s'accrocher lors du déplacement de la larve (Toupoint, 2012). Celle-ci possède à ce stade un système digestif complet (Helm & Bourne, 2006). La première coquille fabriquée jusqu'à ce stade se nomme la prodissocoque I (Helm & Bourne, 2006) (Figure 4) et est

formée après 24-48 h de croissance selon la température de l'eau principalement (Redfearn et al., 1986). Sur la Figure 5 est représentée l'évolution de la larve de moule à partir de l'embryon (A) vers le stade de trochophore (B) et finalement la larve D-véligère (D). (Toupoint, 2012)

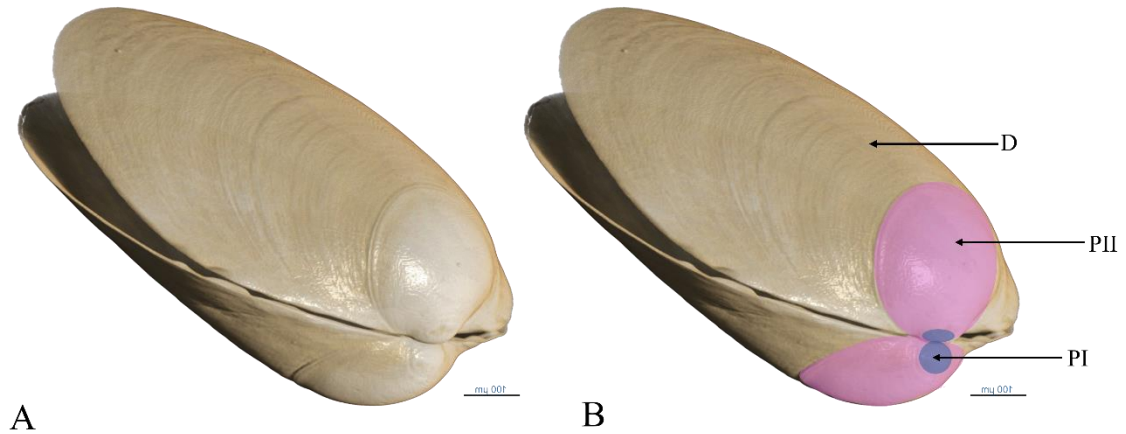


Figure 4: Coquille de post-larve de moule bleue. B : Coquille de post-larve de moule bleue avec les différentes coquilles représentées. En bleu, on retrouve la coquille prodissoconque I (PI). En rose, on retrouve la coquille prodissoconque II (PII). La partie non colorée représente la coquille dissoconque (D).

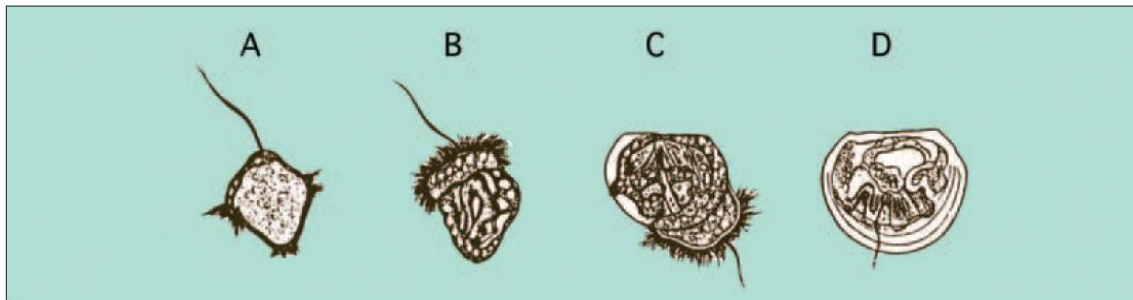


Figure 5: image tirée de Helm & Bourne, 2006 représentant l'évolution des larves de moule à partir de l'embryon (A) vers le stade de trochophore (B), l'apparition de la première coquille prodissoconque I (C) et finalement le stade D-véligère (D).

Le stade umbo-véligère est le troisième stade lors de la croissance des moules. La larve, précédemment en forme de « D », va continuer de croître et l'umbo, qui est une partie plus proéminente de la coquille située à la charnière va se former (Helm & Bourne, 2006). À partir de ce stade, la coquille formée va se nommer prodissoconque II (Helm & Bourne, 2006) (Figure 4). Le quatrième et dernier stade larvaire est celui de pédivéligère. Lors de ce stade, le pied va apparaître, ainsi que le début des branchies (Cannuel et al., 2009; Helm & Bourne, 2006). Un œil, photosensible va également apparaître au centre de chacune des valves (Helm & Bourne, 2006). Sur la Figure 6A, on peut observer la présence de l'œil au milieu de la valve, ainsi que le pied qui sort de la coquille. Une fois le stade de pédivéligère atteint, les larves vont devenir compétente et vont pouvoir s'établir sur les fonds benthiques après leur métamorphose. C'est l'apparition du pied et de l'œil qui démontrent l'atteinte de la compétence (Toupoint, 2012) et d'autres signes plus visibles à l'œil nu comme la formation de cheminé par un groupe de larves (Figure 7) (Helm & Bourne, 2006).

La compétence est la capacité d'un individu à pouvoir se fixer sur un support et se métamorphoser en juvéniles (Bishop et al., 2006). Avec son pied, la larve va explorer une surface convenable en rampant sur celle-ci (Helm & Bourne, 2006). C'est aussi grâce à ce pied que la moule peut sécréter les filaments de byssus par la glande byssogène située sur le haut de celui-ci (Helm & Bourne, 2006; Stanley, 1972) et ainsi se fixer avec les filaments de byssus sur la surface choisie (Carrington et al., 2008). De plus, les larves vont aussi rétrécir leur velum pour permettre la formation des branchies (Cannuel et al. 2009).

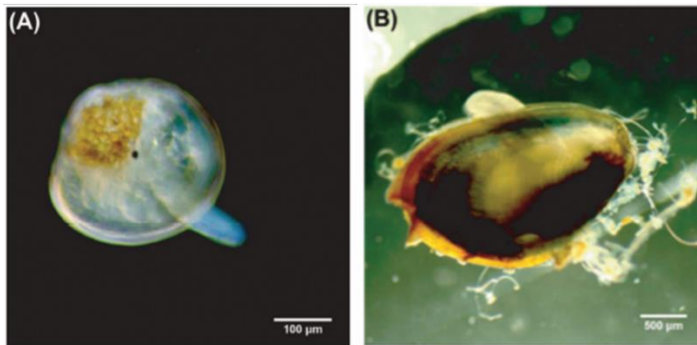


Figure 6: Image tirée de Carl et al., 2011 représentant une moule *Mytilus galloprovincialis* au stade pédiveligère (A) et veligère (B)



Figure 7: Groupe de larves de moules compétentes formant des cheminées.

Une fois la surface choisie et la larve fixée, la métamorphose peut être entamée (Helm & Bourne, 2006). Ce stade peut être atteint après environ 14 jours de croissance selon la température de l'eau (Redfearn et al., 1986). Contrairement à la fixation, la métamorphose est irréversible (Bishop et al., 2006; Helm & Bourne, 2006). Une larve peut donc se fixer plusieurs fois et changer de site de fixation si celui-ci n'est pas convenable (Carl et al., 2011) en rampant grâce à leur pied ou encore en retournant dans la colonne d'eau pour profiter des courants et se déplacer avec son velum (Pernet et al., 2003). Cependant, une fois la

métamorphose effectuée, la moule ne peut plus utiliser son velum, mais elle peut se déplacer via son pied ou retourner dans la colonne d'eau en format de longs parachutes de byssus pour lui permettre d'utiliser les courants sur une plus grande distance, phénomène appelé migration secondaire (Forêt et al., 2018; Lane et al., 1985; Newell et al., 2010). La métamorphose est un processus qui va être fortement influencé par l'environnement. En effet, plusieurs signaux stimulent les larves à se fixer, dont des signaux chimiques produits par un biofilm bactérien (Toupoint et al., 2012), un changement de composition d'espèces phytoplanctonique (Androuin et al., 2022; Jolivet et al., 2016; Leal et al., 2018; Toupoint et al., 2012b), ou encore des signaux physiques tels que les vagues, les courants (Hunt & Scheibling, 1996) et la turbulence (Pernet et al., 2003). La compétition par la présence d'un trop grand nombre d'individus à un endroit peut diminuer le taux de fixation (Carl et al., 2011). Une fois la métamorphose atteinte, la moule va perdre l'innervation et les muscles reliés au velum et va développer son système respiratoire avec les branchies (Bassim et al., 2014; Cannuel et al., 2009).

Le stade de post-larve ou plantigrade est le suivant. À partir de ce stade, les moules vont produire une coquille appelée dissoconque (Figure 4). Cette coquille se distinguera de la prodissoconque I et II par une ligne de croissance prononcée sur la coquille (Martel et al., 2014). Par la suite, la moule va grandir jusqu'à atteindre une taille adulte en passant par le stade de juvénile. Sur la Figure 6, on peut voir sur l'image B, une moule au stade plantigrade. Selon la température et la disponibilité de nourriture, celles-ci vont prendre entre 12 et 24 mois pour atteindre une grandeur d'environ 30 mm (ministère des Pêches et des océans, 2003).

L'audition chez les bivalves

L'audition chez les bivalves reste encore quelque chose d'assez mystérieux. Les connaissances varient d'une espèce à l'autre. Cependant, si l'on prend l'ensemble des bivalves, on réussit à avoir une idée plus précise de leur méthode de détection du son. Les

bivalves percevraient le son, non par l'audition comme on la connaît chez les humains, mais plus par une détection des vibrations engendrées par le déplacement de l'onde sonore provoquant le mouvement des particules (Hubert et al., 2022). En effet, les bivalves ne possèdent pas de système auditif constitué d'une cavité remplie de gaz qui permet de détecter les variations de pression reliée aux ondes sonores (Hubert et al., 2022). D'autres structures leur permettent de percevoir les changements dans leur environnement, comme statocystes, situés à la base du pied (Cragg & Nott, 1977). Les vibrations de l'environnement traversent le corps des bivalves et sont détectées par les statocystes (Roberts et al., 2015; Solé et al., 2023). Cette structure apparaît chez les bivalves dès le stade de pédivéligère et consiste en deux sphères de chaque côté du ganglion pédieux (Figure 8) relié à la cavité du manteau par un canal cylindrique couvert d'un réseau circulaire de cils rayonnants donnant naissance à de minces nerfs (Cragg & Nott, 1977). De plus, certaines espèces posséderaient un organe sensoriel abdominal (ASO) qui serait capable de détecter les mouvements des particules d'eau autour de l'animal grâce à des cellules sensorielles (jusqu'à 4 millions) situées sur des petits tentacules sur le rebord du manteau (Moir, 1977; Zhadan et al., 2004). La moule bleue est une des espèces possédant cet organe (Hubert et al., 2022).

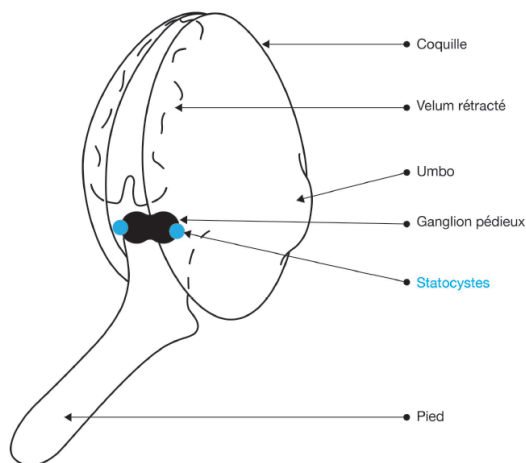


Figure 8: Image tirée de Bonnel et al., 2022. Anatomie d'une larve pédivéligère de coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus*) avec le positionnement des statocystes à la base du pied.

Les bivalves détecteraient les basses fréquences, telles que les sons générés par les vagues (Bonnell et al., 2022) ou encore le son des bateaux cargos. Cette gamme de sons aiderait les moules à choisir leur habitat pour se fixer et se métamorphoser (Jolivet et al., 2016). La gamme d'audition pour la moule bleue se situerait entre 5 à 410 Hz (Bonnell et al., 2022; Roberts et al., 2015) par une détection des vibrations de la surface sur lesquelles elles se trouvent. Cependant, chez les larves et post-larves, les capacités auditives et fréquences de perception ne sont pas encore très bien comprises et décrites dans la littérature (Bonnell et al., 2022).

Impact du son sur la moule

Chez les vertébrés tels que les mammifères marins, l'exposition à des sons intensifs provoque des dommages qui sont évidents, tels que les barotraumatismes ou autres atteintes directes au système auditif (De Soto et al., 2016). Chez la moule, les dommages semblent plus indirects par la nature différente du système auditif comparativement aux vertébrés. De plus, cette espèce étant sessile, elle ne peut pas échapper aux expositions sonores potentiellement stressantes et dommageables. Chez les moules adultes, comme pour d'autres espèces de bivalves, quelques études ont noté des impacts de l'exposition à différents types de son. Wale et al. (2019) ont remarqué que l'exposition au son des bateaux cargos provoquait une augmentation du stress oxydatif et des changements dans l'intégrité de l'ADN. Vazzana et al. (2016; 2020) observait une augmentation d'autres paramètres biochimiques reliés au stress, comme le glucose, les concentrations en protéines totales, le nombre total d'hémocytes (THC), l'activité des protéines du choc thermique (Hsp70) et l'activité de l'acétylcholinestérase (AchE) dans l'hémolymph et dans les tissus, dont la glande digestive des moules. Il a été démontré également que l'exposition au son de bateau créait une diminution de l'ouverture des valves atténuant la capacité d'alimentation par filtration des moules (Roberts et al., 2015; Wale et al., 2019). Cette diminution peut avoir des

conséquences sur le reste de l'organisme, tel que sur le niveau d'énergie, la disponibilité en oxygène et le rythme cardiaque (Roberts et al., 2015). Une diminution allant jusqu'à 44 % de la production des filaments de byssus associé à une force d'attachement plus faible fut également observé (Zhao et al., 2021). Les moules semblent plus sensibles au son impulsif régulier, mais le stress mesuré s'atténue lors d'exposition prolongé (Hubert et al., 2022). Des résultats contraires ont été également notés dans la littérature. Par exemple, Spiga et al. (2016) ont observé une augmentation du rythme de filtration et de l'ouverture des valves à la suite d'une exposition aux sons de battages de pieux. On a donc une réponse différente selon le type d'exposition, mais qui pourrait être également attribuée à d'autres paramètres environnementaux liés à la réalisation d'études en milieu naturel. Chez l'huître, les travaux de Charifi et al. (2018) démontrent que leur comportement journalier d'ouverture des valves était atténué suivant une exposition au son de bateau cargo, diminuant leur croissance et l'accumulation de lipides. Cette baisse d'activité était associée à une plus faible accumulation de métaux lourds, tels que le cadmium. Lors d'exposition au bruit de battage de pieux, les huîtres vont jusqu'à se fermer complètement (Ledoux et al., 2023).

Chez les stades larvaires, moins d'études se sont intéressées à l'impact de bruit. Cependant, nous avons quand même certaines. Jolivet et al. (2016) et Cervello et al. (2023) ont observé que le son des bateaux stimulait la fixation des larves de moules bleues, *M. edulis*, alors que Wilkens et al. (2012) observait la même chose chez la moule *P. canaliculus*. Les larves d'ascidie, *C. intestinalis*, ont démontré le même comportement d'accroissement de la fixation avec le bruit anthropique, mais en plus associé avec une augmentation de la survie et de la croissance (McDonald et al., 2014). Dans l'étude d'Aspirault et al., (2023), les larves de moules bleues ne variaient pas leur comportement alimentaire lorsqu'ils étaient exposés à des sons de navire de l'ordre de 122 dB à 129 dB. Chez le pétoncle, *Pecten novaezelandiae*, l'exposition au son des explorations sismique entraînait des malformations sur la coquille sur 46 % des larves au stade de D-véligère (De Soto et al., 2013). Chez *Pecten maximum*, le son

de battage de pieux stimulait la métamorphose et la croissance alors que le bruit de forage avait l'effet inverse (Gigot et al., 2023).

Processus de formation de la coquille

La coquille est souvent la première chose qu'on remarque chez les bivalves. Elle offre une protection contre les facteurs abiotiques, tel que l'exposition à l'air et les prédateurs. Dans le cadre de ce projet, la compréhension de la formation de cette coquille peut nous aider à comprendre comment celle-ci pourrait se retrouver affectée par une exposition au son de bateaux cargos. Tout ce processus de formation provient de l'animal lui-même et les mécanismes internes de formation peuvent donc être perturbés par des facteurs stressants pour l'animal. Bien que le processus exact de formation de la coquille et de contrôle de la calcification est encore un processus mal documenté (Auzoux-Bordenave et al., 2015), les outils pour l'étudier deviennent de plus en plus précis. La coquille est principalement composée de carbonate de calcium (CaCO_3) sous deux différentes formes : l'aragonite et la calcite (Engel, 2017). La formation de cristaux est contrôlée par plus de 500 gènes et protéines pour arriver à former les cristaux de forme complexe avec une orientation et une organisation définie retrouver chez les mollusques (Engel, 2017). Pour commencer le processus de formation, les ions doivent être transportés de leur source, constituée de l'eau de mer, jusqu'au site de biominéralisation. Les ions seront absorbés lors de la filtration des bivalves permettant l'ingestion de la nourriture par les branchies (Louis et al., 2022). Ils sont par la suite transportés par l'hémolymphe grâce à des protéines qui vont venir lier ces ions et ainsi empêcher la précipitation (Engel, 2017). Le calcium peut aussi être entreposé sous forme de granule pour un usage futur de façon intra ou extra-cellulaire (Marin et al., 2007). Le manteau est la structure responsable de sécréter la coquille chez les mollusques (Engel, 2017; Yarra et al., 2021) (Figure 9). C'est d'ailleurs le manteau qui va donner la forme spécifique de la coquille caractéristique de chaque espèce (Furuhashi et al., 2009; Louis et

al., 2022). Cette structure possède des cellules épithéliales calcifiantes permettant la sécrétion du carbonate de calcium grâce à des transporteurs d'ions transmembranaires pour le bicarbonate (CO_3^-) (Yarra et al., 2021). Ces cellules épithéliales calcifiantes sont organisées de manière que les cellules spécifiques à chaque type de coquille sécrétée soient à la bonne place lors de la croissance. Ce ne seraient donc pas les mêmes cellules qui sécrèteraient les différents types de coquilles, mais plutôt une succession de cellules avec différentes fonctions (Marin et al., 2007) (Figure 10). La calcification va se produire dans un espace isolé formé par la coquille, le manteau, le périostracum (Engel, 2017; Furuhashi et al., 2009) et une membrane de surface interne (Checa et al., 2014) (Figure 9). Cet espace nommé espace extrapallial permet de sursaturer les ions pour pouvoir contrôler la formation de cristaux (Engel, 2017). La déposition des cristaux et de carbonate de calcium amorphe est contrôlée par des enzymes et des protéines de la matrice de la coquille (SMP : shell matrix protein) (Yarra et al., 2021). La membrane de surface interne est aussi responsable du haut degré d'organisation entre autres dans la coquille interne faite de calcite (Checa et al., 2014). De plus, la disposition des composés organiques entre les couches de minéraux va aider à déterminer la grosseur et l'orientation des cristaux (Louis et al., 2022). La coquille est composée d'au minimum 95 % de carbonate de calcium et le restant consiste en un mélange de composés organiques majoritairement formé de protéines (Engel, 2017; Louis et al., 2022). Les protéines vont aider à déterminer la forme de cristaux retrouvée, telle que la nacre ou encore les prismes (Yarra et al., 2021). On peut aussi retrouver des composés organiques comme les polysaccharides acidiques ou encore de la chitine (Yarra et al., 2021). Les composés organiques vont être déposés entre les cristaux de carbonate de calcium (Furuhashi et al., 2009). Le dépôt de carbonate de calcium sur la couche organique va d'abord se faire sous forme appelée ACC (amorphous calcium carbonate). Cette forme va ensuite se transformer dans la forme cristallisée désirée (Marin et al., 2012).

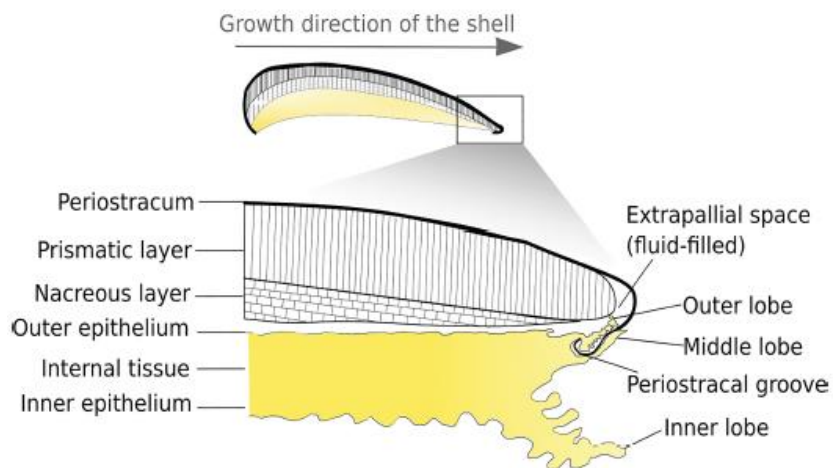


Figure 9: figure tirée de Louis et al., 2022. L'espace extrapallial est situé dans un espace fermé formé du manteau, du périostacum. La formation de cristaux d'aragonite et de calcite se produit dans cette espace.

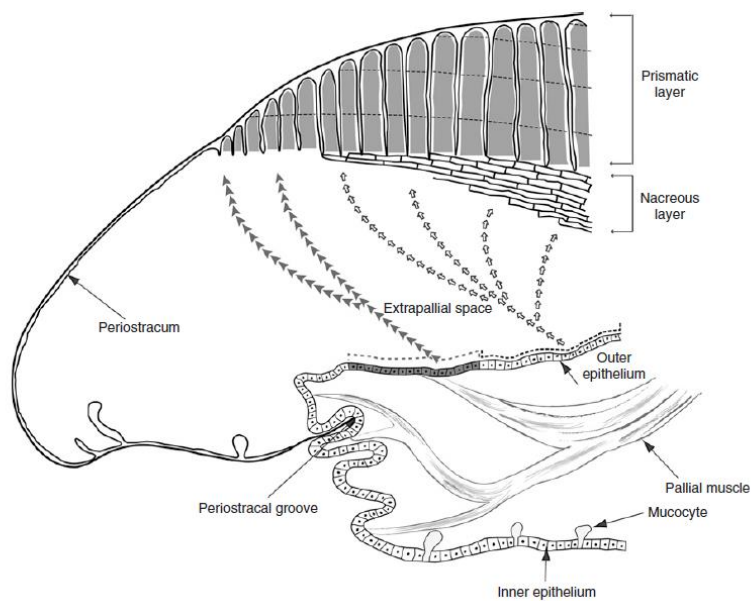


Figure 10: Figure tirée de Marin et al., 2007. Cette figure représente la physiologie de la calcification de la coquille. On peut donc voir que différentes cellules vont être responsables de la formation de la coquille dissoconque (couche prismatique) et une autre couche de coquille va former la coquille d'aragonite nacrée (couche nacrée). Cette disposition successive de cellule permet de créer des couches de coquilles différentes.

Selon l'emplacement sur la coquille, la forme de carbonate de calcium retrouvé ne sera pas la même. À l'intérieur de la coquille, on va retrouver une forme d'aragonite appelée nacre (Engel, 2017; Yarra et al., 2021). La nacre est formée avec des tablettes d'aragonites en feuillet (Chateigner et al., 2000; Engel, 2017) disposé à la manière de brique (Ren et al., 2009) (Figure 11). Les coquilles prodissoconque I et II, qui sont formées à partir du stade de trochophore jusqu'au stade de pédivéligère sont formées d'aragonite (Marin et al., 2007; Toupont, 2012). Les cristaux d'aragonite possèdent une structure orthorhombique (Alves et al., 2023) (Figure 12). La coquille dissoconque, formé après la métamorphose (Marin et al., 2007; Toupont, 2012) est constituée de calcite prismatique (Checa et al., 2014; Yarra et al., 2021). C'est à partir de ce moment que les valves peuvent se fermer hermétiquement chez la moule (Marin et al., 2007). Les fibres de calcite formées sont d'environ 1 - 2 μm de large et des centaines de micromètres de long (Checa et al., 2014). Cette calcite est arrangée en colonne (Engel, 2017) et arrive à la surface de la coquille avec un angle (Checa et al., 2014) d'environ 45° (Feng et al., 2000) (Figure 11). La calcite possède également des cristaux de structure rhomboédrique (Alves et al., 2023; Checa et al., 2014) (Figure 12). À l'extérieur de la coquille, on retrouve le périostracum composé de matériaux organiques (Engel, 2017). Les deux types de coquilles, soient la dissoconque formée de prismes de calcite et la nacre formée de plaquettes d'aragonite, disposée dans des orientations différentes, permettent de solidifier la coquille en cas de fracture (Marin et al., 2012).

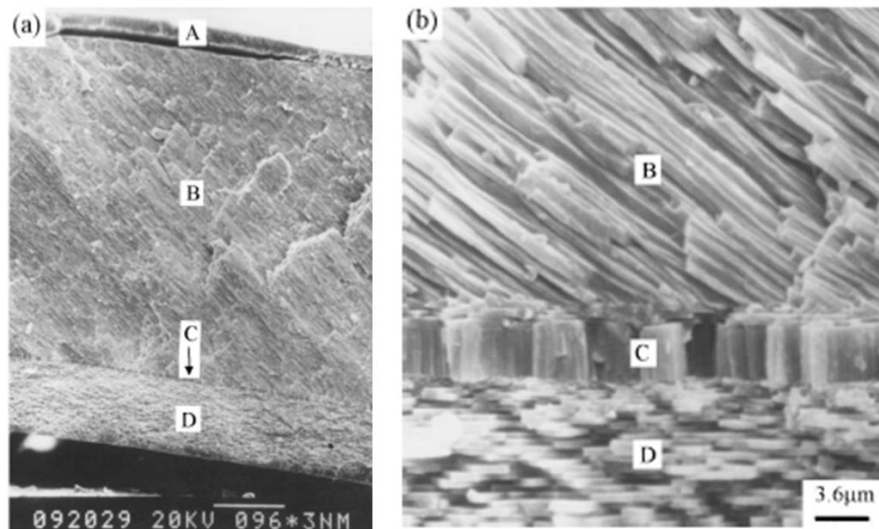


Figure 11: Figure tirée de Feng et al., 2000 de microscopie électronique représentant les couches de la coquille de *Mytilus Edulis*. À partir du haut de l'image, on retrouve le périostacum (A), la couche oblique prismatique de calcite (coquille dissoconque) (B), une couche de transition de calcite prismatique perpendiculaire à la surface de la coquille (C) et la couche d'aragonite nacrée composée de plaquette disposée sous forme de brique (D).

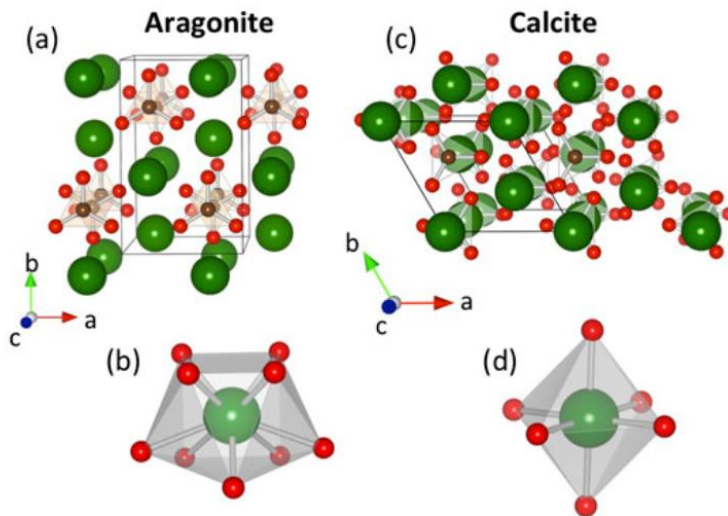


Figure 12: Figure tirée de Soldati & Jacob, 2016. Cette image illustre la différence entre la calcite et l'aragonite sur l'organisation cristalline. Les deux ont la même formule chimique CaCO_3 , cependant leur arrangement sous forme de cristal est différent. La calcite possède une forme trigonale alors que l'aragonite est plutôt orthorhombique.

Étude de la coquille de la moule bleue par spectrométrie Raman

La spectrométrie Raman est une technique optique non destructive qui permet d'analyser les matériaux organiques et inorganiques par la composition chimique et la structure cristalline, en étudiant les vibrations moléculaires. La spectrométrie Raman expose un échantillon à une illumination monochromatique (provenant d'un laser par exemple) afin d'étudier le spectre de la lumière diffusée. La présence de nouvelles longueurs d'onde diffusées (phénomène inélastique) permet donc de détecter, identifier et caractériser les propriétés structurales et chimiques d'un composé qui peut être sous la forme gazeux, liquide ou solide. La polarisabilité d'une molécule, c'est-à-dire sa capacité à déformer son nuage électronique sous l'influence d'un champ électrique, joue un rôle crucial car elle détermine l'intensité des nouvelles longueurs d'onde observées dans le spectre Raman (Jones et al., 2019; Pirutin et al., 2023). Si les molécules ne sont pas polarisables sous l'action d'un champ électrique incident, elles ne génèrent pas de nouvelles longueurs d'onde : elles ne peuvent donc pas être détectées par spectrométrie Raman. La Figure 13 présente les différents cas qui peuvent se produire lors de l'interaction rayonnement-matière (Pirutin et al., 2023). La spectrométrie Raman est une technique de diffusion c'est-à-dire qu'elle mesure la différence entre l'énergie du faisceau incident envoyé sur l'échantillon et l'énergie diffusée renvoyée à la caméra CCD (Charge Coupled Device). Les résultats sont affichés avec l'unité Raman shift, signifiant la différence d'énergie par rapport au laser initialement envoyé (He & Bismayer, 2019; Jones et al., 2019) et exprimé en cm^{-1} (Pirutin et al., 2023) pour une visualisation en nombre d'onde. Un spectre Raman sera ainsi produit, présentant différents pics qui varient en fonction de la composition chimique, de la structure, de l'orientation et de la symétrie du minéral ou molécules organiques étudiés (He & Bismayer, 2019). Ces variations fournissent des informations précieuses pour caractériser les caractéristiques intrinsèques des matériaux.

Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser un laser ayant une longueur d'onde monochromatique de 532 nm, pour diminuer la photoluminescence des matériaux organiques (Jones et al., 2019). Les analyses ont été effectuées sous microscope optique et les analyses de cartographie Raman ont permis d'étudier les modifications structurales et de compositions chimiques sur une section de la coquille (Figure 14).

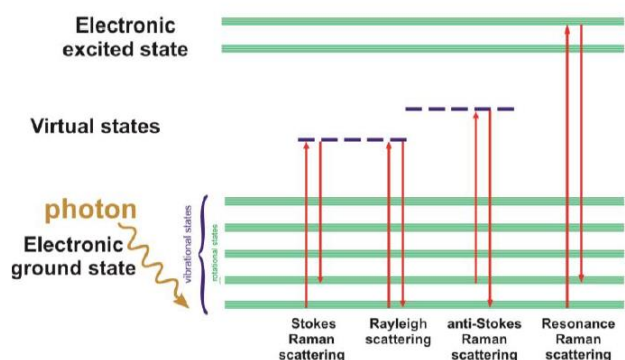


Figure 13: Figure tirée de Pirutin et al., 2023. Lors d'une analyse par spectrométrie Raman, les molécules vont gagner en énergie et changer de niveau vibrationnel. La majorité des photons diffusés se feront sans changement de longueur d'onde : diffusion Rayleigh. Les diffusions inélastiques stokes et anti-stokes permettront de donner des informations sur la structure et la composition chimique du matériau étudié.

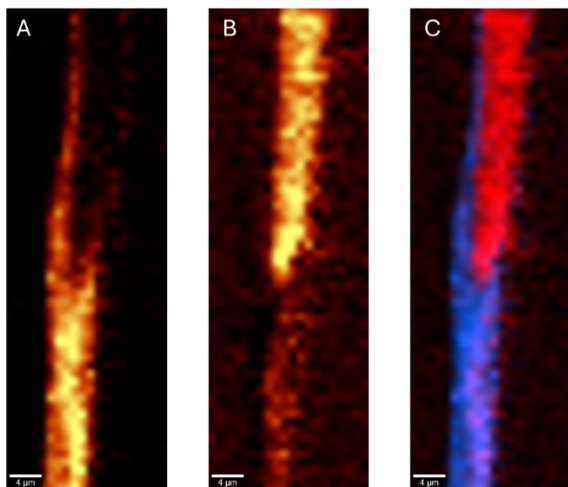


Figure 14: Cartographie d'intensité Raman effectué sur la zone de transition entre la coquille PII et D d'une moule bleue (*Mytilus edulis*). L'image A représente les zones contenant de l'aragonite alors que l'image B montre les zones contenant de la calcite. Il est aussi possible de faire des images avec les deux éléments combinés (C). Le rouge représente la calcite et le bleu, l'aragonite.

Cette technique étant non destructive, elle permet de caractériser à la fois la structure cristalline des coquilles des larves de moules bleues et la présence de pigments. Deux types de polymorphe de carbonate de calcium ont été observés (Badou et al., 2022) : l'aragonite et la calcite sont caractérisés par des spectres Raman différents (Badou et al., 2022) (Figure 15). Comme vu précédemment à la Figure 12, les structures cristallines de l'aragonite et de la calcite ne sont pas identiques, les spectres Raman permettent donc de les identifier. L'aragonite possède des pics intenses à 152 cm^{-1} , 206 cm^{-1} , 704 cm^{-1} pour les modes de vibration du réseau (Murphy et al., 2021; Ramesh et al., 2018) et à 1085 cm^{-1} pour le mode d'étirement symétrique du groupement carbonate (CO_3) (Badou et al., 2022; Ramesh et al., 2018). La calcite possède des pics à 155 cm^{-1} , 282 cm^{-1} , 711 cm^{-1} pour les modes de vibration du réseau (Badou et al., 2022; Barnard & De Waal, 2006; Ramesh et al., 2018) et 1086 cm^{-1} pour le mode d'étirement symétrique du groupement carbonate (CO_3) (Badou et al., 2022).

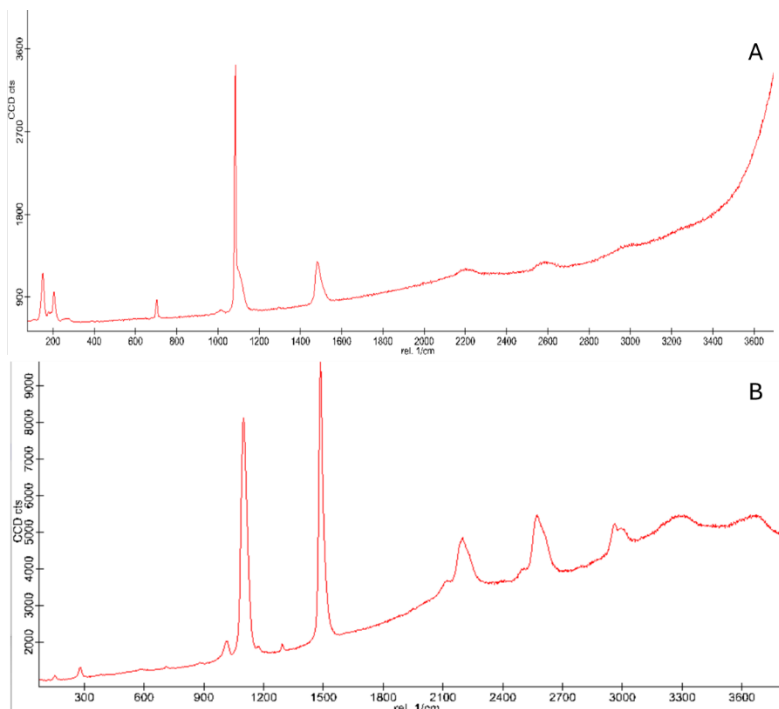


Figure 15: Exemple de spectres Raman obtenus sur les coquilles de ce projet. En A, on retrouve le spectre associé à l'aragonite et en B, celui de la calcite. Les bandes intenses observées à 1098 cm^{-1} et 1484 cm^{-1} sont attribuées à la présence de pigments dans la coquille. Leurs intensités vont dépendre de la présence accrue ou non du pigment dans la zone étudiée.

Il est aussi possible de détecter les signatures de pigments (Hedegaard et al., 2006). Leurs intensités varient en fonction de la concentration dans la zone étudiée. Les pigments présents dans la coquille des bivalves sont des polyènes (Hedegaard et al., 2006). Chez la moule bleue, deux bandes très intenses sont observées à environ 1098 cm^{-1} et à 1484 cm^{-1} (Hedegaard et al., 2006). La première bande est attribuée à l'étirement des liaisons carbone-carbone simple liaison (--C--C--), et la deuxième bande aux liaisons carbone-carbone double liaison (--C=C--) (Hedegaard et al., 2006; Williams et al., 2016). Ces bandes sont asymétriques, ce qui laisse présager de la présence de plusieurs bandes vibrationnelles pour chaque position (Barnard & De Waal, 2006; Bergamonti et al., 2013). La Figure 15 présente également la différence qui peut survenir dans la quantité de pigments présente sur une certaine région.

Objectifs et hypothèse

Cette recherche s'inscrit dans le cadre du projet Auditif, qui vise à enrichir les connaissances sur l'impact écologique de l'exposition du trafic maritime, en particulier le son de bateau-cargo sur la faune benthique. Le trafic maritime ayant considérablement augmenté ces dernières années, le développement de ces connaissances est crucial pour une meilleure compréhension de nos écosystèmes, mais aussi pour envisager une meilleure gestion des activités humaines. Ce projet a plus précisément pour objectif de caractériser l'effet du son des bateaux cargos sur la coquille dissoconque lors du développement des moules bleues (*Mytilus edulis*) du stade pédivéligère à post-larve. Pour ce faire, nous utilisons les mésocosmes Larvosonics (Olivier et al., 2022) pour simuler une exposition sonore en milieu contrôlé sur des organismes microscopiques. La spectrométrie Raman est la méthode principale utilisée pour détecter les potentiels changements dans la structure des coquilles. Ces études seront ensuite complétées par des mesures de rayons X, de microscopie électronique à balayage, diffraction d'électrons rétrodiffusés (EBSD) et d'une étude comportementale

Les expériences réalisées au Mans (France) sous la direction de Jean-François Bardeau reposent sur des résultats préliminaires obtenus lors d'un premier test réalisé en 2021 au laboratoire de l'université du Mans. L'hypothèse, découlant des résultats précédemment obtenus, est que le son va entraîner une modification dans la structure de la coquille. Il est généralement considéré que les stades larvaires des organismes benthiques sont les stades les plus sensibles (Przeslawski et al., 2015; Rayssac et al., 2010), suggérant une sensibilité accrue aux impacts sonores.

Article 1: EFFECT OF CARGO SHIP NOISE ON THE DISSOCONCH SHELL STRUCTURE OF BLUE MUSSEL POST-LARVAE

Annabelle Blanchet¹, Jean-François Bardeau², Benazir Khurshid³, Delphine Veillard¹, Natalie Reznikov³, Frédéric Olivier⁴, Laurent Chauvaud⁵, Michel Auffret⁶, Réjean Tremblay¹

¹ Institut des sciences de la mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, 310, Allée des Ursulines, Rimouski, QC, G5L 3A1, Canada

² Institut des Molécules et Matériaux du Mans, UMR CNRS 6283, Le Mans Université, Avenue Olivier Messiaen, CEDEX 9, 72085 Le Mans, France

³Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, McGill University, 3480 University Street, Montréal, Québec H3A 0E9, Canada

⁴ Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (BOREA) UMR 8067 MNHN, CNRS SU, IRD 207, UCN, UA, Paris, France

⁵CNRS, LEMAR, UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Laboratoire de Sciences de l'Environnement Marin, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

⁶Institut Universitaire Européen de la Mer, Laboratoire de Sciences de l'Environnement Marin (UMR 6539 LEMAR CNRS-UBO-IFREMER-IRD), Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

Abstract

Noise pollution is gaining more attention in research due to the potential damaging impact that it could have on marine fauna. In this present work, we studied the impact of cargo ship noise on the dissoconch shell structure of blue mussel (*Mytilus edulis*) post-larvae. The pediveliger larvae were exposed for 3 weeks in larvosonic mesocosms, a tool for sound exposure on invertebrate larvae. Three sound levels were used: low (121 dB), medium (127 dB) and high (151 dB), as well as a control without sound representing the ambient environment (116 dB). The post-larvae obtained were placed in epoxy resin on a microscopy slide (48 shells / sound level, 196 shells in total) to be examined with Raman spectrometry, scanning electron microscopy and electron backscatter diffraction.

The results showed that the shell was mostly affected between the control and the low sound level by a change in the vibrational mode of the pigment found in the shell. The resulting shell seems more robust at low sound level than at the other sound exposure with less holes and breaking calcite fibres. This result suggests that the low sound level could be close to their natural tidal environment which is noisier than the ambient noise in the deeper ocean. The mussel used that sound as a positive cue to select their habitat for metamorphosis. The mussel can then invest more energy in building a robust shell and less when finding a habitat. The control and higher sound level could create a metamorphosis delay, resulting in mussel with a lower energy level, creating a shell with more holes and with breaking of calcite fibres. Also, a change in valve opening amplitude with more closure could create a more acidic environment. This, in addition to the lower energy availability, could create the differences seen in the shell studied.

1.1 Introduction

Sounds are part of the natural marine environment, such as waves crashing on the shore. But since anthropogenic sounds have been introduced in the marine environment, like noise associated to marine traffic, it has been demonstrated to impact many organisms, from marine mammals to fish and invertebrates (Bonnell et al., 2022; Chahouri et al., 2022; De Soto et al., 2016; Di Franco et al., 2020; Popper & Hawkins, 2016; Solé et al., 2023; Weilgart, 2018). Actually, the global shipping noise emissions double every 11.5 years (Jalkanen et al., 2022) with emissions mostly measured in the low frequency range (10-50 Hz) (Hildebrand, 2009). One of the invertebrate species impacted by this noise is the blue mussel (Vazzana et al., 2016). Mussels are economically important all around the world, with an aquaculture production representing 0.13 million tons in 2017 and a value around 3 billion (Tacon, 2020). The high filtration capacity of blue mussels improves water quality in coastal environments by extracting nitrogen and reducing hypoxia risk (Guyondet et al., 2022; Smaal et al., 2019). Thus, knowledge about the impact of maritime traffic on blue mussels will help aquaculture management and their countless of different ecosystem services provided by wild populations and aquaculture productions, such as the mitigation of eutrophication (Petersen et al., 2016).

Many recent studies have investigated the impact of anthropogenic noise on blue mussels. When exposed to pile-driving noise, byssal attachment decreases and the remaining filaments are weaker (Zhao et al., 2021). A total decrease from 16.9% up to 44.5% in attachment forces is observed after sound exposure which increases the risk of blue mussel fall-off from their settlement site (Zhao et al., 2021). After boat noise exposure, the total oxygen consumption decreased (Roberts et al., 2015; Wale et al., 2019) as well as the total ingestion food rate by filtering (Wale et al., 2019). Those two parameters suggest metabolism changes and impact of noise on mussel homeostasis, as confirmed by DNA integrity modification, increasing oxidative stress (Wale et al., 2019) and negative impact on haemocyte count and glucose level after sound exposure (Vazzana et al., 2016). Mussel behaviour changes have been also observed on adult mussels exposed to vibrations related to anthropogenic noise (Roberts et

al., 2015). Less studies have been conducted on larval stages, but they show generally a higher vulnerability to stressors compared to adult stages (Harvey et al., 2013; Przeslawski et al., 2015; Qiu et al., 2002) with potential latent effect acting on following juveniles and subsequent adult stages (Podolsky & Moran, 2006). No impact of shipping noise on mussel larval filtration rate was observed (Aspirault et al., 2023), but anthropogenic sounds increased settlement and larval metamorphosis to juvenile (Cervello et al., 2023; Eggleston et al., 2016; Jolivet et al., 2016; McDonald et al., 2014; Wilkens et al., 2012).

During mussel's ontogeny, the shell composition changes, particularly at early larval stages. The prodissoconch I (PI), corresponding to the size of the initial egg (Martel et al., 1995), is produced at the D-veliger stage (Marin et al., 2007; Toupoint, 2012). The prodissoconch continue to grow during all the veliger stages, representing the pelagic larval development. The prodissoconch II (PII) characterize the metamorphosis and the transition from last veliger stage, called pediveliger to juvenile plantigrade (Marin et al., 2007; Toupoint, 2012). PI and PII are made from aragonite (Fuller & Lutz, 1988). The metamorphosis induces a change of calcium carbonate form from aragonite to calcite, representing the outer layer of the adult shell (Yarra et al., 2021). This shell is called dissoconch (D). A clear mark is present on the shell between PII and D, which indicates the size at metamorphosis (Martel et al., 1995; Ramesh et al., 2018). Juveniles and adult mussel shells are composed of an inner nacreous layer (Louis et al., 2022; Ramesh et al., 2018) formed with aragonite tablets in a "brick-wall" arrangement (Chateigner et al., 2000; de Paula & Silveira, 2009; Ren et al., 2009) and an outer layer made of calcitic prisms (Checa et al., 2014; Feng et al., 2000; Ramesh et al., 2018; Yarra et al., 2021).

In this study, we investigated the impact of cargo ships noise on the shell structure of blue mussels during their transition from veliger larvae to juveniles, to focus on dissoconch shell development. To our knowledge, we do not know how the calcium carbonated crystal forms and the pigments are impacted on a structural level by cargo ship noise. The possible impact

of noise exposure on the shell itself could potentially affect mussel vulnerability to predators and environmental stressors. We used mainly Raman spectrometry to investigate the structure of the shell and detect any changes related to noise exposure. This optical technique is non-destructive, and as already been used to characterized mineral structures in molluscs (Hawkes et al., 1996; Lu et al., 2015), such as the abalone (Badou et al., 2022), gastropods (Hedegaard et al., 2006), bivalves (Hedegaard et al., 2006; Ramesh et al., 2018) and cephalopods (Hedegaard et al., 2006). This technique can also be used to analyse the pigments integration in the shell with the optic signature obtained (Hedegaard et al., 2006). Raman spectrometry is a very sensitive technique (Hedegaard et al., 2006) allowing differential observation in calcium carbonate molecules by studying the intensity and position of peaks on vibrational spectrum. The positions of each peak represent the vibrational modes present in the structure (Hedegaard et al., 2006; Ramesh et al., 2018). Additional information on shell structure was also obtained with microscopy tools: scanning electron and X-ray microscopy.

1.2 Material and Methods

1.2.1 Larval culture and sound exposure

Protocols from Cervello et al. (2023) were used for larval culture and sound exposure. Briefly, experiments were carried out at the ISMER-UQAR wet laboratory facilities (Rimouski, Qc, Canada) using Larvosonic mesocosms including acoustic panels in a main tank supporting 6 semi-submerged experimental cylinders (5 L) filled with stagnant UV ultrafiltered seawater (Olivier et al., 2023). Three Larvosonic tanks were used for the three sound treatments and another without sound emission (room ambient sound only) considered to be the control treatment. In each Larvosonic tank, a Clark synthesis AQ339 Diluvio™ underwater loudspeaker (8 Ohms/20-17000Hz, Littleton, CO, USA) was installed on the bottom centre to play the sound treatment. To ensure sound exposure homogeneity, we selected the cylinders located in the four corners and fill the 2 cylinders left with fresh water to keep the same sound propagation throughout the tank. The noise used during the

experience was a recording from a 120 m long cargo ship, the Nohlan Ava. This ship was identified as representative of the shipping traffic in Saint-Pierre-et-Miquelon. We used three cargo ship sound level; low (121 ± 4 dB re $1\mu\text{Pa}$), medium (127 ± 2 dB re $1\mu\text{Pa}$), high (151 ± 2 dB re $1\mu\text{Pa}$), which represent the distance of passage from the cargo ship of 20m, 735m, 1.8km for the high, medium and low sound level respectively (Transmission Loss based on 20Log (distance) model). The SPL rms of the control sound treatment was measured at 116 ± 1 dB re $1\mu\text{Pa}$ thus similar to coastal natural soundscape (Aspirault et al., 2023; Jolivet et al., 2016).

Mussel spawning was induced on 30 adult mussels by thermal shock and gametes were mixed in a pool-cross design to produce one random larval family. During larval rearing, feed was given every two days as a mix of *Pavlova lutheri*, *Tisochrysis lutea*, *Chaetoceros muelleri*, *Tetraselmis suecica* and *Nannochloropsis oculata* (1:1:1:1:1, 60000 cell mL^{-1}). Once over 50% of the larval population reach the pediveliger stage (competent larvae), they were transferred into four experimental cylinders for sound exposure at a final concentration of 5 larvae mL^{-1} , with food added every two days when water was changed in the cylinder at similar composition and concentration, as already described. Two collectors consisting of 30 cm polypropylene rope were added to each cylinder for larval settlement. Every two days, collectors were carefully removed from each cylinder, hung up in the air to avoid juvenile detachment and the cylinders cleaned with Virkon VKS10 disinfectant (LANXESS Deutschland GmbH, Cologne, Germany) before water renewal with UV ultrafiltered seawater and food. Environmental parameters during all the exposure experiments were measured every two days and each cylinder with an Hanna HI98194 probe and showed few variability: pH (6.95 ± 0.08), temperature (19.8 ± 0.4 °C), luminosity (8.9 ± 0.8 FC), photoperiod (15h of light and 8 hours of night) and salinity (24.9 ± 0.8 PSU). The sound exposure was realized for 21 days for production of enough dissoconch shell during the noise exposure. Larvae were then collected and stored at -80°C .

1.2.2 Behaviour analysis

To explore potential behavioral impact of sound emission on non-settled larvae, the larval swimming behavior was analyzed by in vitro video tracking techniques, as proxy of general health status (Gamain et al., 2020). The four cylinders in each larvosonic tank were used as replicates in the experiment. For each cylinder, 20-30 non-settled larvae were sampled in 4 analytic replicates in 24-well cell culture microplates. Video acquisition was performed with a Sony A7R V camera installed on an Olympus SZ-61 binocular microscope. Each video was programmed for 30 seconds. Zoom value was adjusted to allow observation of one entire well. Videos were processed by using a Noldus EthoVision XT video tracking software (Figure 16). To assess possible variations of swimming activity over the acquisition period, 3 consecutive sequences (time bin) lasting 10 seconds each was programmed. Software analysis parameters were the distance moved (arbitrary units) and velocity. The number of tracked larvae (subjects) was established at 12 per trial. In order to characterize larval behavior, the 4 tracking variables calculated from analysis data were 1) the rate of activity representing the % of mobile larvae, 2) the total distance travelled in 30 seconds, 3) the maximum swimming speed and 4) the movement regularity. Impact of sound exposure (4 levels) were tested on each behavioural index by ANOVAs on R studio software following validation of homogeneity (Levene test) and normality (Shapiro-wilk test). When ANOVA were significant, difference between noise levels were tested with Tukey post-hoc test.

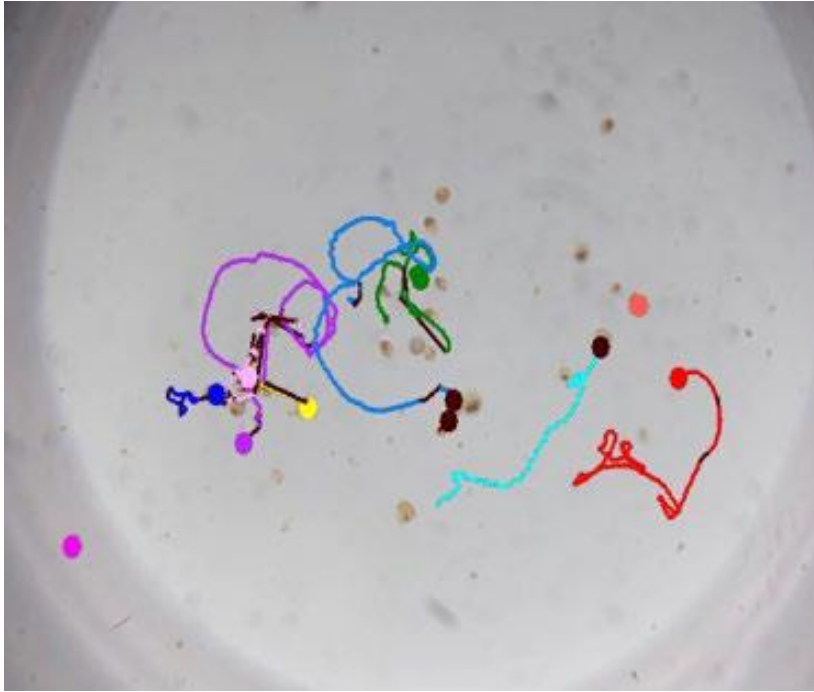


Figure 16: Example of movement recorded during the experiment by the Noldus Ethosvision software. We can see the swimming path and the static larvae (arrow head)

1.2.3 Mussel shell's slides production

After being placed for 1 min in an ethanol bath, mussel post-larvae were embedded in epoxy resin (ArtResin[®]) on a microscopy slide. For each sound level, 12 slides per cylinder (4 per sound level) were created, for a total of 192 microscopy slides. Each mussel was placed on one side (Figure 17) so that all shell types (prodissococonch1, prodissococonch2 and dissoconch) could be seen on one cross section. Once the epoxy was fully cured (around 72 hours), slides were carefully ground on a rotating polishing table (Struers, TegraPol-35) with a sequence of 1200, 2400, and 4000 grit wet-table carborundum paper, followed by polishing with 3- μ m diamond liquid (Struers) to remove any saw mark.

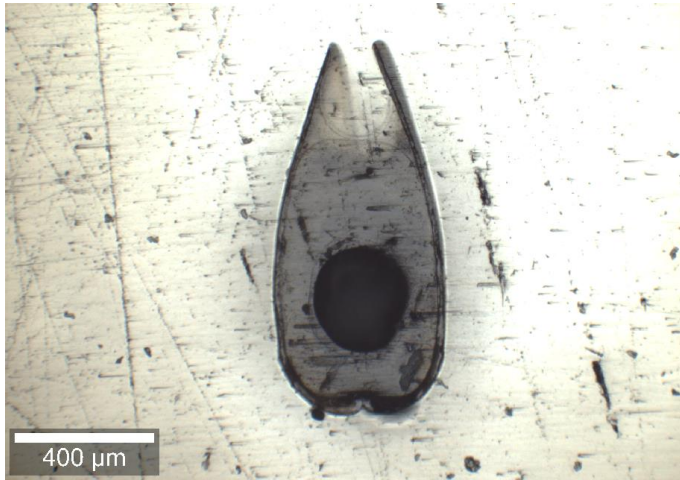


Figure 17: Finished polish of a blue mussel post-larvae on a microscopy slide for Raman spectrometry study.

1.2.4 Raman analysis

To investigate the difference in calcium carbonate in the mussel shell, a confocal Raman spectrometry was used to obtain vibrational spectra on mussel larvae for each sound level. We used a WITec Alpha 300R confocal Raman spectrometer (WITec GmbH, Ulm Germany) equipped with both a RayShield Coupler and a 1800 gmm^{-1} grating blazed at 500 nm allowing spectra measurements at extremely low wavenumbers and high spectral resolution and a thermally Peltier-cooled Si-based CCD front-illuminated detector (Andor, Oxford Instrument, Belfast, Ireland). Raman scattered signals were collected under a microscope equipped with a Zeiss EC Epiplan-Neofluar® 50x objective (numerical aperture of 0.55) and a 20x objective (numerical aperture of 0.5) focusing the 532 nm line of a Solid State Sapphire laser (Coherent INC., Santa Clara, USA) on the samples. The Raman spectrometry was calibrated using a silicon chip. The sample were exposed to a 532 nm laser (green) with 3mW power to ensure no degradation of the sample (Barnard & De Waal, 2006; Bergamonti et al., 2014) with a grating of 600 g/mm. The Raman spectra were recorded with 10 accumulations and an integration time of 6 seconds. A x100 objective was used for each spectrum. Two spectra were taken per mussel, corresponding to a spectrum in the dissoconch shell and one

in the prodissoconch 2 shell at a similar distance from the transition zone in between the two types of shell. Shells were always oriented in the same direction to obtain consistent spectrum (He & Bismayer, 2019). Measurements of the spectrum were taken using WITec Project FIVE 5.3 Software. Pigments and mineral peaks were fitted with labspec6 software to obtain all the minerals and pigments peaks characterizing calcite and aragonite. The pigments peaks in vibrational spectra in blue mussel are located at 1098 cm^{-1} and 1484 cm^{-1} for the Raman shift, representing respectively the carbon-carbon single bond (--C--C--) and double bond (--C=C--) stretching band (Hedegaard et al., 2006). ANOVAs were made using R studio software and were followed by a Tukey post-hoc test to validate difference between sound exposure level treatments. Homogeneity was validated by Levene test and normality by Shapiro-wilk test. When normality was not respected, a square-root transformation was applied. The Scanning Electron Microscopy and the x-ray microscopy were done to confirm the results seen on the Raman spectrometry.

1.2.5 Scanning electron microscopy (SEM)

Intact mussel post-larvae were fixed in 70% ethanol, dehydrated using gradient baths of increasing ethanol concentrations (2 hours at 85%, 2 hours in 96%, and 2 hours at 100%), and critical-point dried (Leica Microsystems EM CPD030 Critical Point Dryer). Critical-point dried mussels were mounted on standard 10 mm aluminum stubs using silver paint. Embedded and polished cross-sections were mounted on standard 25 mm aluminum stubs with carbon tape. Imaging of both cross-sections and intact mussels was done using Hitachi SU3500 SEM with no conductive coating at 5 keV, at low vacuum conditions (70 Pa). Overview images and higher magnification images were collected to cover the entire cross-section of the shell, and then manually stitched into a compound image using Dragonfly 2024 software (Comet Technologies Canada Inc., Montreal, Canada). For calcium carbonate polymorph identification and crystal analysis, electron backscattered diffraction (EBSD) maps were acquired at 30 keV, aperture 1, and pressure 70 Pa, using SU3500 SEM.

1.2.6 X-ray microscopy

Intact post-larvae mussels in 70% ethanol were placed in a truncated polyethylene pipette tip and stabilized on a gripper-holder for μ CT. Imaging was performed using an Xradia Versa 520 μ CT scanner; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany, using a $\times 4$ objective and a 60 kV source voltage. Detector and source distances were optimized to create a voxel size of 3 and 1.5 μm , with $\times 2$ binning (to optimize signal-to-noise ratio). At 0.7 seconds exposure per projection, 3001 projections were obtained in each acquisition, and the reconstructed 3D images were exported in the 3D TIFF format, 16-bit. Reconstructed 3D images were rendered and analyzed using Dragonfly 2024 software (Figure 18; Comet Technologies Canada Inc., Montreal, Canada).

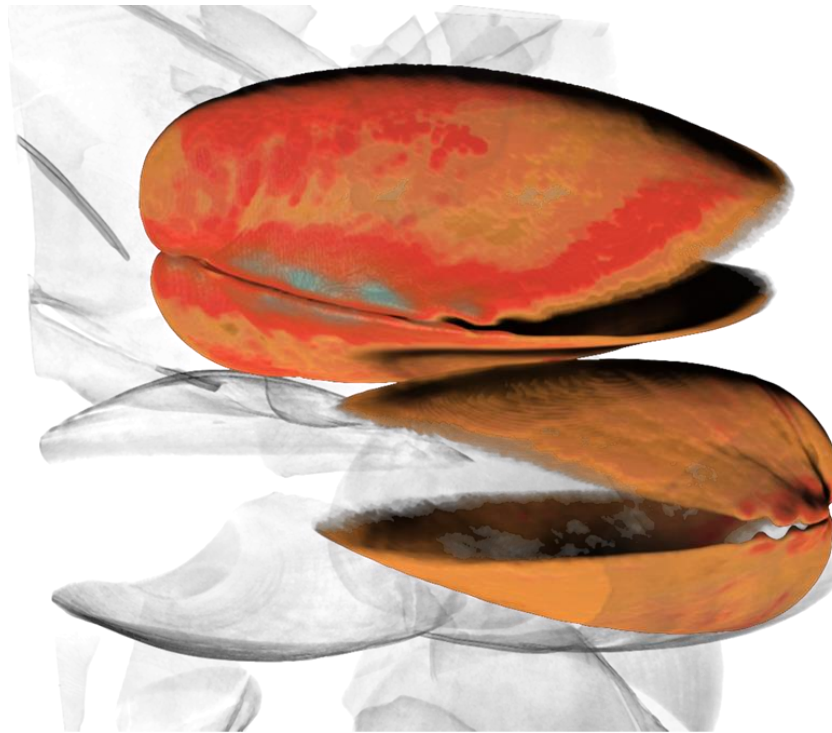


Figure 18: 3D rendering of several mussel shells, two of which are labelled to illustrate shell thickness.

1.3 Results

1.3.1 Behaviour analysis

Activity rate recorded on swimming larvae/post-larvae showed difference between sound exposure treatment (Figure 19; $df=3$; $F=3.74$; $p=0.001$) with significantly lower activity values ($p=0.025$) observed in the low sound exposure treatment (121 dB) when compared to the highest exposure treatment (151 dB). The mean activity level in each treatment was below 50% indicating the high proportion of larval settlement during the video tracking.

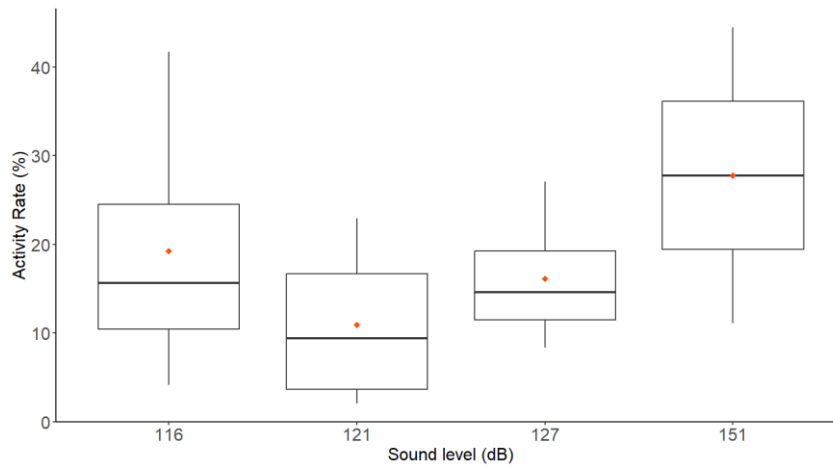


Figure 19: Effect of sound exposure on the activity rate (mobile larvae (%)) of blue mussel pediveliger larvae after 8 days of exposition. The red dot shows the respective mean for each sound level.

The total distance travelled by the larvae/post-larvae during the time recorded showed also difference between sound exposure treatment ($df=3$; $F=2.66$; $p=0.05$), with higher values in control and lower values in the low sound exposure treatment (121 dB) (Figure 20). A significant difference ($p=0.012$) was observed between the control and the low sound level (121 dB). Moreover, no significant difference in the two other behavioural index parameters, the maximum swimming speed (mean of 2 ± 2.5 arbitrary unit) and the movement regularity (7.2 ± 4.4 arbitrary unit), were observed among the treatments

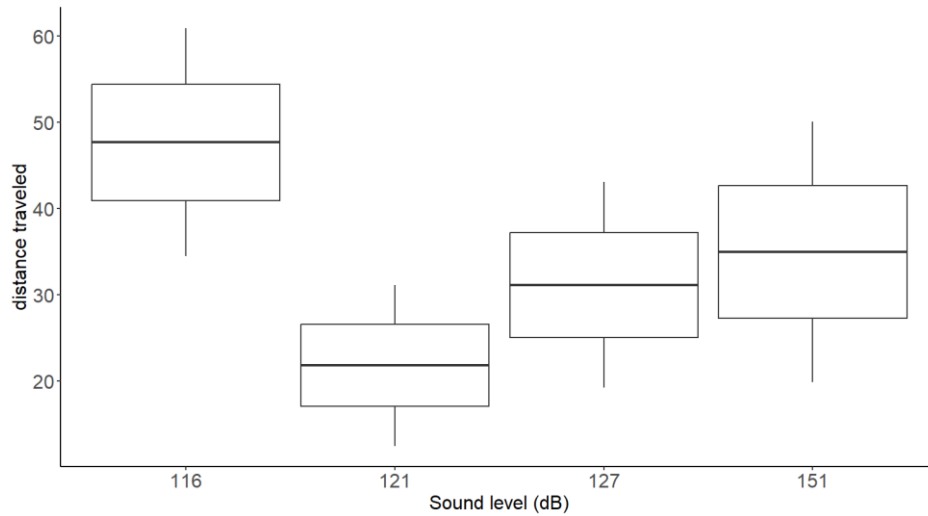


Figure 20: Effect of sound exposure on the total distance travelled of pediveliger blue mussel larvae after 8 days of exposition. In this boxplot, the middle line represents the means, the square is the mean $\pm$ SE and the line is the mean $\pm$ 1.96*SE.

1.3.2 Raman spectrometry

1.3.2.1 Mineral peaks

The characteristics peaks for aragonite are located around 155, 206 and 704 cm^{-1} for the lattice vibrations and 1083-1085 cm^{-1} for the CO_3 stretching (Ramesh et al., 2018). For each peak of the vibrational spectra, the Raman shift measured did not differ between sound exposure treatments (Table 1), reflecting that the PII shells was already built in all individuals.

Table 1: ANOVA results for each of the mineral peaks in aragonite and calcite shell

CaCO ₃ phase	Peak Position Mean (cm ⁻¹)	Sd	ANOVA results		
			Df	F	P-value
Aragonite	150,5	0,64	3	0,57	0,636
Aragonite	204,6	0,55	3	0,3	0,825
Aragonite	703,0	0,63	3	0,176	0,912
Aragonite	1083,9	0,59	3	0,536	0,658
Calcite	152,8	0,64	3	1,509	0,214
Calcite	279,5	0,46	3	1,108	0,348
Calcite	711,2	0,95	3	0,814	0,488
Calcite	1084,9	0,43	3	1,276	0,285

The characteristics peaks for calcite are located around 156, 282 and 711 cm⁻¹ for the lattice vibrations and 1086-1087 cm⁻¹ for the CO₃ stretching (Ramesh et al., 2018). As for aragonite peaks, the Raman shift position showed no differences between sound exposure treatments (Table 1)

1.3.2.2 Intensity ratio

The measurements of the intensity relative to the base line of the spectrum for the 155 cm⁻¹ and the 206 cm⁻¹ was used to estimate the intensity ratio of the aragonite mineral peaks and for the 156 cm⁻¹ and 282 cm⁻¹ to estimate the intensity ratio for calcite mineral peaks. For both ratios, no differences were observed (Table 2). With lower p-value for calcite ratio, even though non-significant, the dissoconch shell shows a trend to be more affected by cargo ship noise.

Table 2: ANOVAs results for the intensity ratio measured in the aragonite and in the calcite shell

CaCO ₃ phase	Peak Position Mean (cm ⁻¹)	Sd	ANOVA results		
			Df	F	P-value
Aragonite	1,95	0,39	3	0,185	0,906
Calcite	0,45	0,05	3	1,896	0,132

1.3.2.3 Pigments

1.3.2.3.1 Pigments peaks position

Each of the pigments peaks was fitted to obtain all the spectrum. The asymmetry of the peaks suggests the presence of more than one type of pigment (Bergamonti et al., 2014; Stemmer & Nehrke, 2014). For the first pigment peaks around 1098 cm^{-1} (Figure 21 A and B), there were differences among treatments in the dissoconch shell (p-value = 0,031) attributed to control vs low sound treatments (p-value = 0.01), but not in the PII aragonite shell. when considering the second peaks around 1484 cm^{-1} (Figure 21 C and D), no differences were observed in the PII aragonite and dissoconch shell.

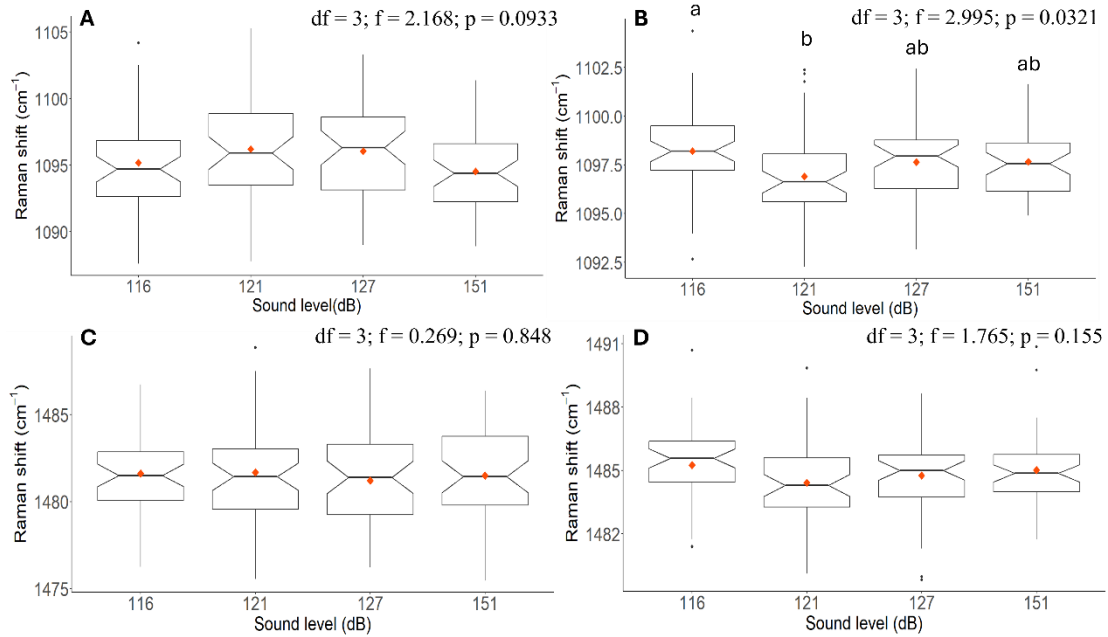


Figure 21: Position variation of pigment peaks from Raman vibrational spectra. The red dot shows the respective mean for each sound level. In A (PII shell) and B (D shell), we have the first pigment peaks obtained for the peaks around 1098 cm^{-1} from fitting with labspec6 software. In C (PII shell) and D (D shell), we have the first pigment peaks obtained for the peaks around 1484 cm^{-1} from fitting with labspec6 software.

1.3.2.3.2 Wavenumber shift in the pigment peaks

We calculated the wavenumber shift of pigments from the position in PII (aragonite) and D shells (calcite), between unexposed vs noise exposed shells, as follows: (Δ (wavenumber shift) = Raman shift PII shell – Raman shift D shell) were calculated (Figure 22). Differences between sound exposure treatments were significant (Figure 22 A) for the first pigment peaks around 1098 cm^{-1} with values from low sound level different from control ($p = 0,03$) and high sound level ($p = 0,02$). Shells of mussels exposed to control and the high sound level treatment displayed by larger wavenumber shift. No differences between treatments were observed in shells for the pigment peak at 1484 cm^{-1} .

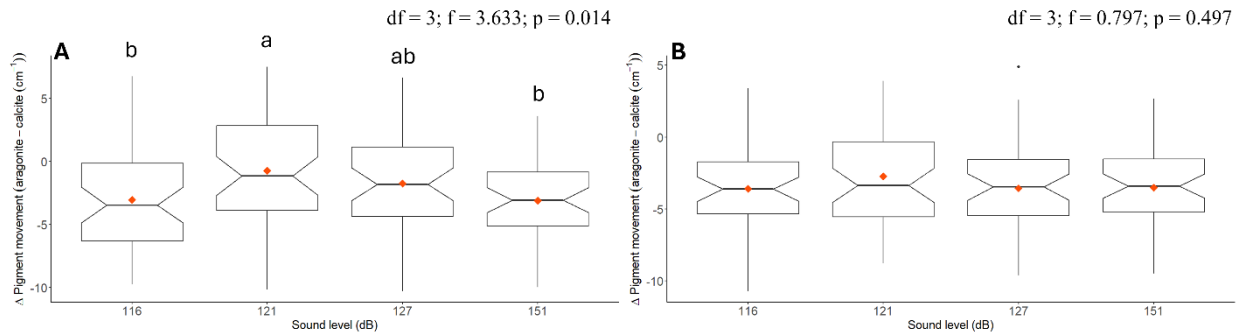


Figure 22: Difference in the Raman shift position of pigment peaks from Raman vibrational spectra in between the PII shell and the D shell (Δ =PII shell pigment position – D shell pigment position). The red dot shows the respective mean for each sound level. The position's difference for the first pigments peaks obtained around 1098 cm^{-1} (A) and for the first pigment peaks obtained around 1484 cm^{-1} (B) is the results of fitting with labspec6 software.

1.3.3 Microscopy

1.3.3.1 Scanning electron microscopy (SEM)

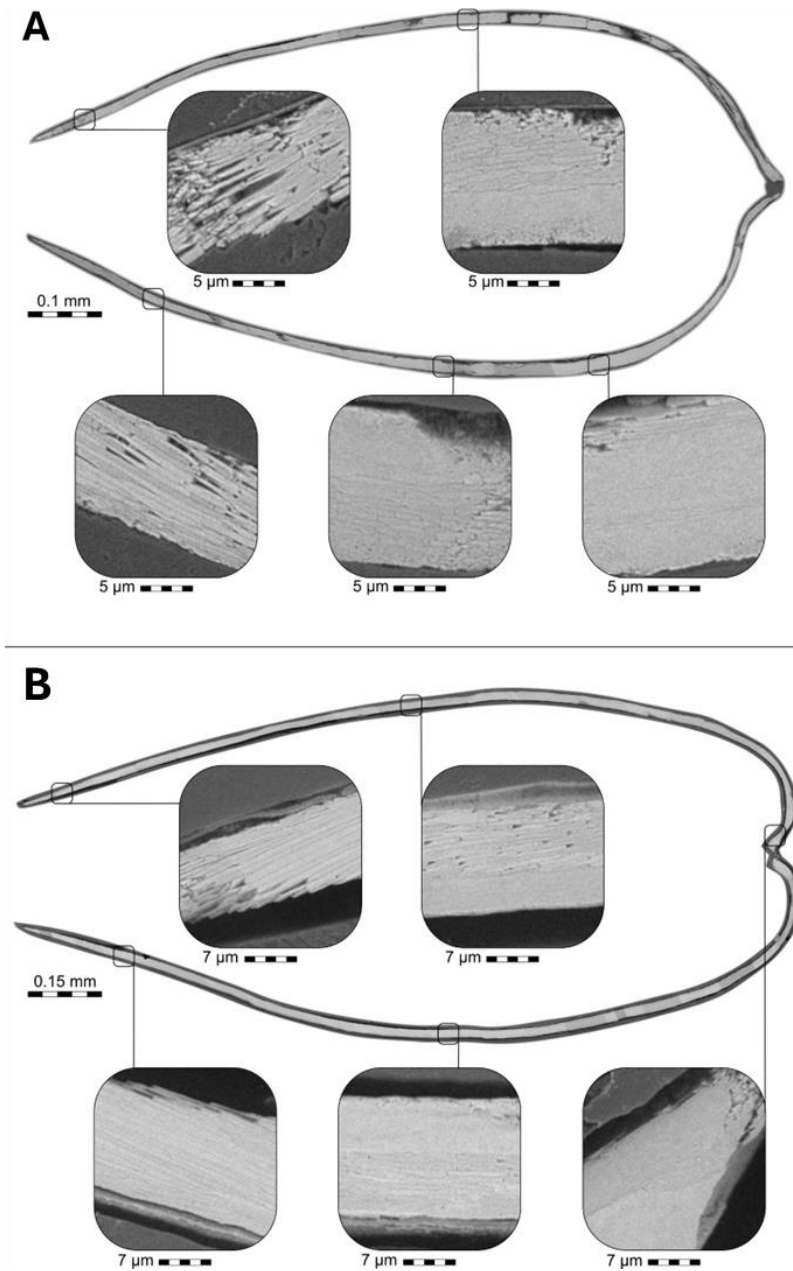


Figure 23: Scanning electron microscopy of two shells of blue mussel post-larvae. In A, we have one of the larvae in the control group. In B, we have a mussel exposed to the low sound level.

The scanning electron microscopy results confirm those obtained from the Raman spectrometry, by the comparison of the shell from the control group to the low sound exposure group; the two groups showing the most important differences with Raman measures. These images suggest that the shell seems to be more robust in the low sound exposure than in the control, with fewer discontinuities and less delamination of the calcite fibre on the tip end (Figure 23).

1.3.3.2 Electron backscatter diffraction (EBSD)

Electron backscatter diffraction (EBSD) was performed on the same shell observed under SEM from the previous section with images from the tip of the shell either in the control (Figure 24) or in low sound treatment (Figure 25). The calcite crystal size was larger in the control group than in the low sound exposure group. The orientation of the calcite fibre also seems to differ in between the two groups. The PII shell closer to the shell hinge was also analyzed, but no difference was observed, as already seen from the Raman spectrometry results.

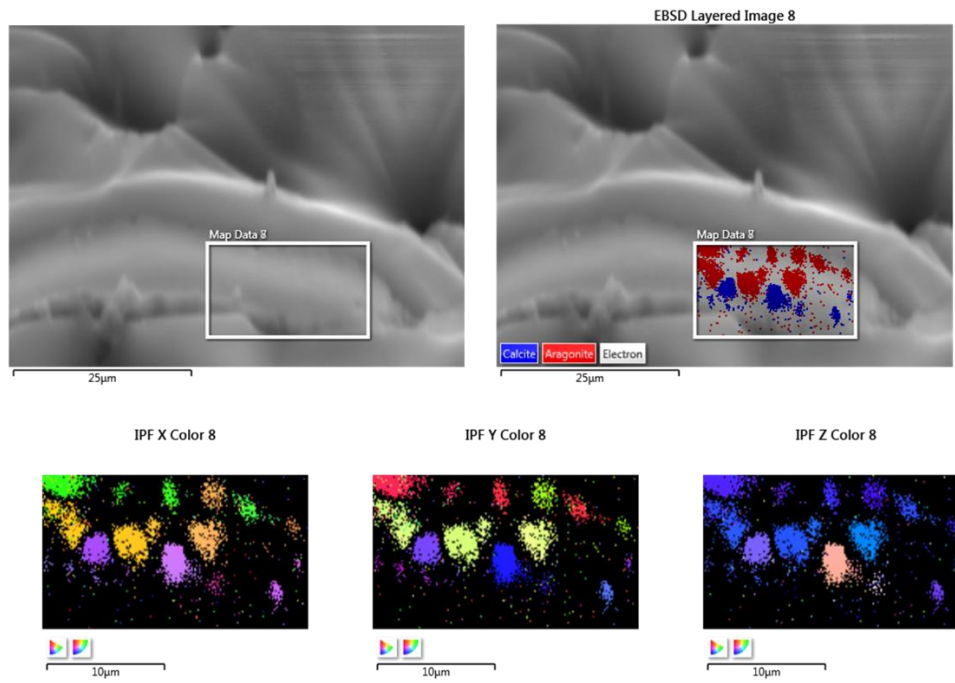


Figure 24: Electron backscatter diffraction (EBSD) of a shell of blue mussel larvae from the control group treatment (116dB).

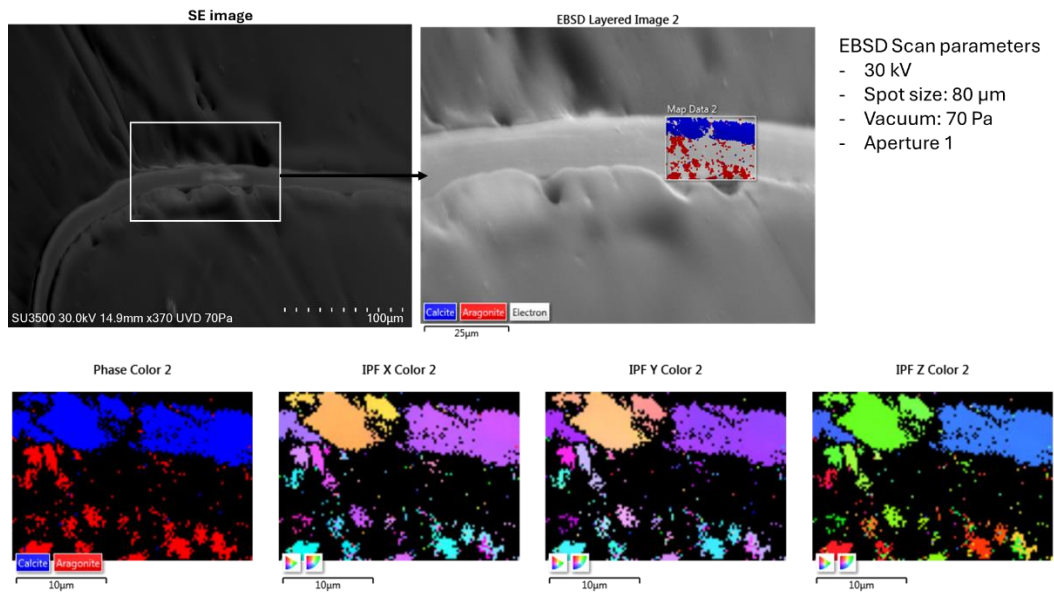


Figure 25: Electron backscatter diffraction (EBSD) of a shell of blue mussel larvae from the low sound treatment group (121dB).

1.4 Discussion

Our results showed that the young dissoconch shell of blue mussel post-larvae can be affected by sound exposure from a cargo ship noise, confirming the hypothesis. But contrary to expected, the impacts were observed mostly in low exposure, and not in medium and high exposure treatment. A similar trend was also observed in the swimming behaviour of non-settled larvae sampled at the same time. Furthermore, only some aspect of shell structure was impacted, like the wavenumber shift occurring in the pigments, the intensity ratio and the pigment peak position potentially affecting the strength of the shell. Analyses of shells with scanning electron microscopy and electrons backscatter diffraction confirm this observation. This study is the first to explore the impact of traffic noise on the shell structure of pediveliger larvae and post-larvae. As suggested by Jolivet et al. (2016) and Aspirault et al. (2023), the boat sound can have a similar decibel level than the tidal environment, ranging from 88 to 143 dB (Radford et al., 2008). It is known that mussels live in a noisier environment in the shallow coastal rocks (Ministère des pêches et des océans, 2003) where the waves create important noise levels. Mussels are well adapted to this turbulent environment by their byssal thread production used for their attach on the rocks (Cervello et al., 2023). These results could suggest that the SPL level used in the low sound exposure (121 dB re 1 μ Pa) could be closer that of their natural environment and then used as a cue by the competent larvae to select suitable habitat for settling (Jolivet et al., 2016). In this condition, mussels seem to invest more energy to build a more robust shell.

Mussels have the ability to delay their metamorphosis when encountering an habitat that is not suitable for settlement (Martel et al., 2014). Settlement success has shown to be positively correlated with flow velocity and turbulence (Pernet et al., 2003), but these hydrodynamic conditions were absent in *Larvosonic* systems to limits sound contamination. Thus, we suggest that the *Larvosonic* environment could be considered as a non-natural

suitable habitat for mussel's settlement that stimulate their metamorphosis delay. The *Larvosonic* system constitute a perfect tool to measure the impact of anthropogenic noises in condition of delayed metamorphosis largely observed under natural conditions for several marine invertebrate species (Androuin et al., 2022; Lagarde et al., 2018; Leal et al., 2018, 2019; Martel et al., 2014; Pechenik, 1990; Pechenik et al., 1998). Metamorphosis is a high energy expenditure process (Holland & Spencer, 1973) and delays of metamorphosis induce lower growth (Martel et al., 2014) and higher post-settlement mortality of juveniles (Lagarde et al., 2018). Thus, the control treatment without sound cues and the higher levels cargo ship treatment (medium and high noise level > 127 dB re 1 μ Pa) could induce metamorphosed delay until larval energetic reserves decrease to a critical threshold that allows successful metamorphosis. At this stage, larva can metamorphose spontaneously without any positive settlement cue, also known as the “desperate larvae hypothesis” (Pechenik, 1990; Toonen & Pawlik, 1994). Subsequent post-larvae seem to have lower energy to invest in their shell structure explaining the presence of more holes and breaking of the calcite fibres. Behavioral measures used as health indicators, confirm this hypothesis with lower swimming activity rate and lower distance travelled by swimming in the low sound exposure treatment (121dB). These behaviours suggest lower metamorphosed delay in this soundscape. When mussels have settled, metamorphosed and recruited on collectors, Raman and microscopy results demonstrated that boat noise impacted positively or negatively the structuration of dissoconch shell depending of on the sound level, as discussed below

1.4.1 Mineral peak position.

The analysis of the position of those peaks on the Raman spectrum was not affected by the cargo ship noise, either on the PII, not exposed to noise, or the D shell, exposed to the noise. The peaks measured at 155, 206 and 704 cm^{-1} for aragonite and 156, 282 and 711 cm^{-1} for calcite represent the crystal lattice vibrations. Peaks measured around 1083-1085 cm^{-1} for aragonite and 1086-1087 cm^{-1} for calcite represents the CO_3 bond stretching (Ramesh et al., 2018). According to Badou et al. (2022), a shift in this band could indicate additional

cation substitution, with element ions such as magnesium, manganese and iron. Since no shift was observed, we can then infer that no additional ions were introduced in the shell due to noise exposure.

1.4.2 Intensity ratio and EBSD microscopy

The intensity ratio in calcite zone was lightly affected by the sound exposure, but non-significantly ($p = 0,13$). However, there is weak evidence of a mean higher values of 0.466 in low sound level exposure (121 dB) comparatively to control (0.453) and high sound level (0.441). Such ratio could be related to a change in the crystal structural arrangements of the CaCO_3 , such as changes in the mineral crystal size (Kitajima, 1997) and crystal orientation (Murphy et al., 2021; Nehrke & Nouet, 2011; Ramesh et al., 2018), acting on crystal growth (Alves et al., 2023). The organization of the shell is the results of many factors such as ontogeny and environmental control (Hawkes et al., 1996). Measuring the relative intensity of Raman bands was used to determine the degree of crystallization (Alves et al., 2023) and degree of disorder (Kitajima, 1997). In the freshwater mussel *Cristaris plicata*, the organic matter present between the calcium carbonate fibre, calcite in our case, was responsible for the crystal growth direction and size (Louis et al., 2022). It is possible that this change in direction and size, although not significant, could be due to a higher organic matter content in low exposure sound (121dB) to control crystallization with post-larvae mussel having more energetic content. During the Raman spectrometry, we always placed the mussels in the same direction to ensure stability in the intensity of each peak since crystal orientation does play a role in the intensity of the band (Alves et al., 2023; Murphy et al., 2021).

If we compare these results to the electron backscattering diffraction (EBSD) microscopy images, we observe that the crystal size did change in the calcite region exposed to sound. The calcite crystal fibres seem bigger in the low sound level (121 dB) than in the control group. The orientation of the fibres also seems different between the two of them, but a part of this could be due to a slight change in shell orientation. It confirms that the difference

observed with the Raman spectrometry is similar to EBSD microscopy observation. However, no clear evidence on size crystallization was confirmed on the shell studied due to the high inter-individual variations (STD) observed between sound exposure treatment.

1.4.3 Pigments

Two significant comparisons between sound exposure treatments were obtained during pigment characterization measures in the dissoconch shell. Firstly, the position of the first pigment peak located at 1098 cm^{-1} (Figure 21 B) characteristic of the carbon-carbon single bond (--C--C--) stretching band (de Oliveira et al., 2010; Hedegaard et al., 2006) for the polyene pigments (Hedegaard et al., 2006). A lower Raman shift position was observed in mussel dissoconch shell exposed to low sound exposure, comparatively with control showing higher values. Intermediate values were obtained in a shell from the medium and high sound exposure levels. All the other peaks representing the pigment position have not been affected by the sound exposure. The change observed in the band position could be related to a longer polyene chain for the pigment, a change in the functional group attached to it or a change in the cis/trans conformation. It is not possible to know the exact structure only with the Raman spectrometry (Williams et al., 2016). Complementary studies are necessary to know what exactly happened in the structure of the pigments. Sound exposure also affected the wavenumber shift occurring in the first pigment peaks. The wavenumber shift is created by the position of these peaks in the aragonite shell subtracted to the position of the same peak in the calcite shell. Since the peaks of the mineral can differ between aragonite and calcite, the pigment peaks are the ones that we can compare directly. The intensity of the Raman band has also been seen to be related to the permissibility of motion (Alves et al., 2023). Since the intensity itself of the band can be affected by other variables, the wavenumber shift between the two types of shell was used to investigate potential stress effect (Xu et al., 2018) in the crystal and can be related to more spaces available in the shell. Mussel post-larvae

exposed to low sound levels (121dB) showed higher values than the control with a mean of -0.701 cm^{-1} . This value suggests that this sound exposure level creates almost no change in the position of the first pigment peaks and by association, almost no space created in the shell by the empty space. For the post-larval shell in the control and the high sound level treatments, the mean wavenumber shift value was -3.023 cm^{-1} and -3.090 cm^{-1} respectively. These values suggest that there is more space in the shell, can lead to more fragile shell. In the scanning electron microscopy (SEM) images from post-larval shell sampled in the control, there was also evidence of more empty space availability with less cohesiveness. Thus, these empty spaces in the shell were less present in general in the low sound level group (121 dB) than in the control (116 dB).

The more suitable habitat for mussels in the low sound exposure treatment (121 dB), was also confirmed in recent study of Byrro-Gauthier (in preparation). In exactly the same Larvosonic tanks and sound exposition, adult mussels instrumented by valvometry system were used. This system measures the valve movement at high resolution (10 measures per second) and the low sound exposure level (121 dB) showed the higher valve opening amplitude (%). Closer valves are generally related to more stressful conditions (Comeau et al., 2017, 2019; Durier et al., 2021). In the low sound level (121 dB), mussels showed valve opening amplitude was over 60% comparatively to less than 45% for mussels exposed to high sound level (151dB) and 55% for the control. The higher closure rate of mussel's valves can create an acidic environment in the shell, leading to demineralization of the calcium carbonate crystal (Louis et al., 2022). When the valves are closed, the metabolism become anaerobic, thus decreasing the pH, followed by a decalcification phase (Louis et al., 2022). Calcium is then liberated from the shell and is only rebuilt with the return of aerobic conditions (Louis et al., 2022). In such acidic environment, the shell could be less cohesive, as observed by the crystal orientation changes in the study of Brahmi et al. (2021). Shorter opening time and amplitude of the valves is also related to lower food ingestion and decreased metabolism related to stressful environment (Coppola et al., 2018). This potential shorter

opening time and amplitude in the mussel from the control and higher sound exposure level (151 dB) could potentially create more acidic environment for shell development with less energy available to invest in shell structure, creating a less cohesive shell.

1.5 Conclusion

In conclusion, blue mussel larvae seem well adapted for the perception of low sound level (121 dB) as measured in natural coast environment, and use this cue to settle more rapidly, preserving their energy and when metamorphosed to maintain their valves open longer. In this condition, dissoconch shell is more structured with calcite crystal more oriented without empty space. Increasing the exposed ship noise cargo from the pediveliger stage up to the post-larvae stage seem to affect the amount of empty space in the shell structure. More studies are needed to know the extent of the weakness created in the shell and if the mussel can indeed break more easily. As seen in the study from (Charifi et al., 2018), oyster exposed to cargo ship noise and exposed to cadmium have accumulated more metal into their system and were growing slower. It would also be interesting to see the cumulative effect of heavy metal or other contamination with the cargo ship noise could potentially interact with fragility of the shell.

Discussion / conclusion générale

En conclusion, le son de bateau cargo a affecté les larves de moules bleues lors d'une exposition de trois semaines sur la période de transition du stade pédivéligère vers post-larve. La position des modes de vibration associés au carbonate de calcium (CaCO_3) n'est pas affectée de façon significative. Une petite différence dans les dimensions et l'orientation des cristaux de calcite a toutefois été observée par microscopie électronique. Cette différence n'est pas significative, mais observable tout de même chez certains individus. La principale différence que nous avons révélée par spectrométrie Raman est située au niveau des pigments. En effet, la position du maximum d'intensité de la bande associée aux vibrations C-C des pigments est significativement différente entre le contrôle et le son faible. Cette différence suggère un changement dans l'environnement des pigments. De plus, la position des bandes vibrationnelles associées aux pigments est très différente entre l'aragonite et la calcite, suggérant une augmentation de l'espace disponible dans la coquille. Dans ce cas-ci, le son fort (151 dB) et le contrôle (116 dB) étaient significativement différents du son faible (121 dB). Le son faible semble donc créer un environnement idéal pour les moules par la similitude du niveau de bruit avec les environnements côtiers bruyants. Celles-ci n'ont donc pas de délai de métamorphose et ont donc plus d'énergie à fournir pour construire leur coquille. Les autres niveaux sonores semblent créer un délai de métamorphose, engendrant ainsi une baisse d'énergie disponible par les moules pour investir dans leur coquille. Les coquilles obtenues par les sons moyens (127 dB), forts (151 dB) et le control (116 dB) présentent donc plus de trou et de fibre de calcite brisé. La coquille des moules est essentielle pour leur protection face à l'environnement externe et aux prédateurs (Stewart et al., 2021). De plus, un changement dans l'amplitude de l'ouverture des valves, en plus de la diminution d'énergie, pourraient être à l'origine de la coquille moins cohésive par une augmentation de l'acidité dans la coquille. La Figure 26 démontre le changement dans l'amplitude de

l'ouverture des valves des larves de moules dans l'expérience menée par Byrro-Gauthier dans le même système Larvosonic avec les mêmes conditions sonores.

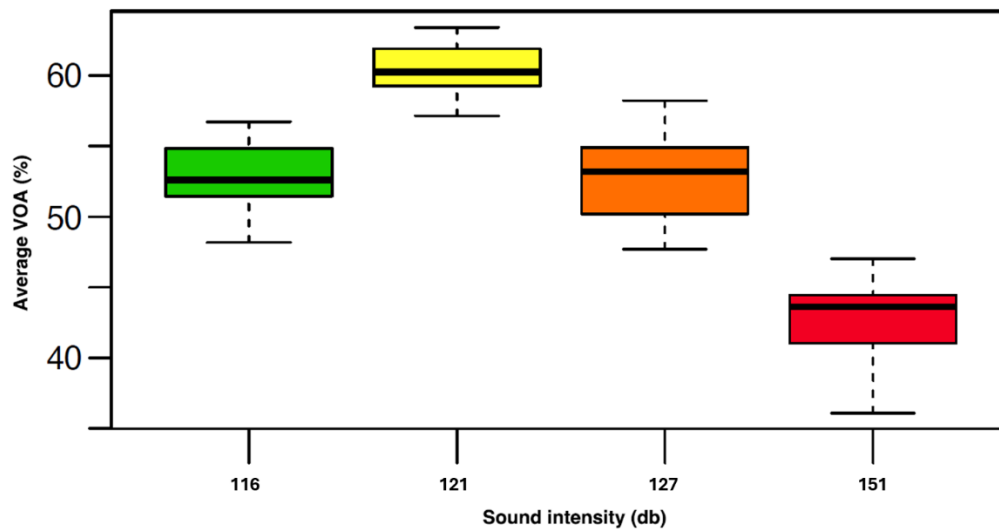


Figure 26: Amplitude de l'ouverture des valves (VOA (%)) obtenue par une exposition au son des bateaux cargos dans les larvosonics. Cette image est tirée de l'étude de Byrro-Gauthier (en préparation).

Cette recherche a apporté une partie des réponses sur l'effet des sons de bateau sur les stades larvaires de bivalves. Cependant, plusieurs questions sont encore à répondre et plusieurs autres expériences pourraient être menées pour aller plus loin dans la question. L'effet du son sur la faune marine pourrait être étudié de manière multifactorielle. En effet, le son de bateau ne vient pas de manière isolée dans la nature. Les produits chimiques dérivés du pétrole ou encore qui sont présents dans les eaux des ports par son transport par bateau ou par son déversement depuis les côtes pourraient être un autre facteur à ajouter aux expériences. On peut penser au polluant de type métal qui s'accumule dans les zones côtières et va être filtré par les organismes tels que les bivalves et s'accumuler dans leur organisme (Coppola et al., 2018; Stewart et al., 2021). Par exemple, avec l'accumulation de métaux et leur effet sur la coquille, il a été observé que la coquille des bivalves exposés au métaux était plus mince et une différence dans la minéralisation de la coquille (Stewart et al., 2021). De

plus, le réchauffement climatique et l'acidification des océans en combinaisons avec le son de bateau pourrait être intéressant à étudier sur la coquille, puisque l'on sait que ces facteurs causent également des coquilles affectées par la décalcification (Langer et al., 2014). Un effet synergique pourrait être possible (Przeslawski et al., 2015) comme déjà observé auparavant sur d'autres facteurs tel que le réchauffement de l'eau et l'accumulation de métaux (Coppola et al., 2018) et l'acidification de l'eau (Harvey et al., 2013). Il serait aussi intéressant de voir la coquille composée de nacre qui commence à se former chez les stades larvaires. Elle forme l'intérieur de la coquille et est plus sensible aux dissolutions que la calcite (Brahmi et al., 2021). Il a été démontré que lorsqu'exposé à un milieu plus acide, la nacre va croître plus en épaisseur pour compenser une partie de la dissolution (Langer et al., 2014). Avec les résultats obtenus dans cette expérience, il serait intéressant d'étudier si le son de bateau en combinaison avec un environnement bruyant, tel que créer par les vagues en milieu côtier, aurait autant d'impact sur les moules. Comme proposé par Cervello et al. (2023), créer une expérience utilisant une simulation d'environnement réel pourrait apporter de nouvelles réponses à cette question. De plus, une expérience plus longue nous permettrait d'étudier l'effet d'une exposition chronique sur l'ensemble des stades larvaires, mais aussi sur les répercussions sur le stade de vie adulte. Le stade de vie D-véligère semble particulièrement vulnérable (De Soto et al., 2013). La première coquille se forme à ce moment de la vie des larves. Il est possible que plus de dommage se font à ce moment. Il serait également pertinent d'étudier l'impact des sons de bateaux cargos sur la coquille de d'autres bivalves ayant démontrés des réponses à ces sons, tel que l'huître (Charifi et al., 2018) et le pétoncle (De Soto et al., 2013).

Le son de bateau est un problème qui pourrait être atténué de certaine façon dans les milieux naturels ou encore dans les zones d'aquaculture. Comme mentionné par Chahouri et al. (2022), il existe plusieurs façons de gérer l'impact du son sur la faune marine. Premièrement, des zones marines protégées peuvent être aménagées pour protéger des zones étant considérées plus sensibles. Cependant, protéger les espèces vivant en milieu côtier, en

particulier proche des ports, est potentiellement très compliqué. Il pourrait cependant être possible de réduire le son dans les périodes plus problématiques. On pourrait penser en autres à la période de ponte chez les larves. Une façon plus facile d'application serait probablement de modifier les bateaux sur le long terme (Chahouri et al., 2022). En utilisant la technologie disponible, il serait possible de diminuer le bruit venant des bateaux.

Bibliographie

- Alves, J. F., Edwards, H. G. M., Korsakov, A., & de Oliveira, L. F. C. (2023). Revisiting the Raman Spectra of Carbonate Minerals. *Minerals*, 13(1358).
<https://doi.org/10.3390/min13111358>
- Androuin, T., Barbier, P., Forêt, M., Meziane, T., Thomas, M., Archambault, P., Winkler, G., Tremblay, R., & Olivier, F. (2022). Pull the trigger: interplay between benthic and pelagic cues driving the early recruitment of a natural bivalve assemblage. *Ecosphere*, 13(1). <https://doi.org/10.1002/ecs2.3672>
- Arveson, P. T., & Vendittis, D. J. (2000). Radiated noise characteristics of a modern cargo ship. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 107(1), 118–129.
<https://doi.org/10.1121/1.428344>
- Aspirault, A., Winkler, G., Jolivet, A., Audet, C., Chauvaud, L., Juanes, F., Olivier, F., & Tremblay, R. (2023). Impact of vessel noise on feeding behavior and growth of zooplanktonic species. *Frontiers in Marine Science*.
<https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1111466>
- Atema, J., Fay, R. R., Popper, A. N., & Tavalga, W. N. (1988). *Sensory Biology of Aquatic Animals*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3714-3>
- Auzoux-Bordenave, S., Brahmi, C., Badou, A., de Rafélis, M., & Huchette, S. (2015). Shell growth, microstructure and composition over the development cycle of the European abalone *Haliotis tuberculata*. *Marine Biology*, 162, 687–697.
<https://doi.org/10.1007/s00227-015-2615-y>
- Badou, A., Pont, S., Auzoux-Bordenave, S., Lebreton, M., & Bardeau, J. F. (2022). New insight on spatial localization and microstructures of calcite-aragonite interfaces in adult shell of *Haliotis tuberculata*: Investigations of wild and farmed abalones by FTIR and Raman mapping. *Journal of Structural Biology*, 214.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2022.107854>
- Barnard, W., & De Waal, D. (2006). Raman investigation of pigmentary molecules in the molluscan biogenic matrix. *Journal of Raman Spectroscopy*, 37, 342–352.
<https://doi.org/10.1002/jrs.1461>

- Bassim, S., Tanguy, A., Genard, B., Moraga, D., & Tremblay, R. (2014). Identification of *Mytilus edulis* genetic regulators during early development. *Gene*.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.08.042>
- Bergamonti, L., Bersani, D., Mantovan, S., & Lottici, P. P. (2013). Micro-Raman investigation of pigments and carbonate phases in corals and molluscan shells. *European Journal of Mineralogy*, 25, 845–853. <https://doi.org/10.1127/0935-1221/2013/0025-2318>
- Bishop, C. D., Huggett, M. J., Heyland, A., Hodin, J., & Brandhorst, B. P. (2006). Interspecific variation in metamorphic competence in marine invertebrates: The significance for comparative investigations into the timing of metamorphosis. *Integrative and Comparative Biology*, 46(6), 662–682.
<https://doi.org/10.1093/icb/icl043>
- Bonnell, J., Chauvaud, S., Chauvaud, L., Mars, J., Mathias, D., & Olivier, F. (2022). *Effet des sons anthropiques sur la faune marine* (Quae).
- Brahmi, C., Chapron, L., Le Moullac, G., Soyeux, C., Beliaeff, B., Lazareth, C. E., Gaertner-Mazouni, N., & Vidal-Dupiol, J. (2021). Effects of elevated temperature and p CO₂ on the respiration, biomineralization and photophysiology of the giant clam *Tridacna maxima*. *Conservation Physiology*, 9(1). <https://doi.org/10.1093/con>
- Cannuel, R., Beninger, P. G., McCombie, H., & Boudry, P. (2009). Gill Development and Its Functional and Evolutionary Implications in the Blue Mussel *Mytilus edulis* (Bivalvia: Mytilidae). *Biological Bulletin*, 217(2), 173–188. <https://about.jstor.org/terms>
- Carl, C., Poole, A. J., Vucko, M. J., Williams, M. R., Whalan, S., & de Nys, R. (2011). Optimising settlement assays of pediveligers and plantigrades of *Mytilus galloprovincialis*. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 27(8), 859–868. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.605943>
- Carrington, E., Moeser, G. M., Thompson, S. B., Coutts, L. C., & Craig, C. A. (2008). Mussel attachment on rocky shores: The effect of flow on byssus production. *Integrative and Comparative Biology*, 48(6), 801–807.
<https://doi.org/10.1093/icb/icn078>

- Cervello, G., Olivier, F., Chauvaud, L., Winkler, G., Mathias, D., Juanes, F., & Tremblay, R. (2023). Impact of anthropogenic sounds (pile driving, drilling and vessels) on the development of model species involved in marine biofouling. *Frontiers in Marine Science*. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1111505>
- Chahouri, A., Elouahmani, N., & Ouchene, H. (2022). Recent progress in marine noise pollution: A thorough review. *Chemosphere*, 291. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132983>
- Charifi, M., Miserazzi, A., Sow, M., Perrigault, M., Gonzalez, P., Ciret, P., Benomar, S., & Massabuau, J. C. (2018). Noise pollution limits metal bioaccumulation and growth rate in a filter feeder, the Pacific oyster *Magallana gigas*. *PLoS ONE*, 13(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194174>
- Chateigner, D., Hedegaard, C., & Wenk, H.-R. (2000). Mollusc shell microstructures and crystallographic textures. *Journal of Structural Geology*, 22, 1723–1735. www.elsevier.nl/locate/jstrugeo
- Checa, A. G., Pina, C. M., Osuna-Mascaró, A. J., Rodríguez-Navarro, A. B., & Harper, E. M. (2014). Crystalline organization of the fibrous prismatic calcitic layer of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *European Journal of Mineralogy*. <https://doi.org/10.1127/0935-1221/2014/0026-2374>
- Comeau, L. A., Babarro, J. M. F., Riobó, P., Scarratt, M., Starr, M., & Tremblay, R. (2019). PSP-producing dinoflagellate *Alexandrium minutum* induces valve microclosures in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquaculture*, 500, 407–413. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.025>
- Comeau, L. A., Mallet, A., Carver, C., Nadalini, J. B., & Tremblay, R. (2017). Behavioural and lethal effects of sediment burial on quiescent Eastern oysters *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*, 469, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.11.038>
- Coppola, F., Almeida, Â., Henriques, B., Soares, A. M. V. M., Figueira, E., Pereira, E., & Freitas, R. (2018). Biochemical responses and accumulation patterns of *Mytilus galloprovincialis* exposed to thermal stress and Arsenic contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 954–962. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.051>

- Cragg, S. M., & Nott, J. A. (1977). The ultrastructure of the Statocysts in the Pediveliger Larvae of *Pecten Maximus* (L.) (Bivalvia). *Marine Biology Ecology*, 27, 23–36.
- de Oliveira, V. E., Castro, H. V., Edwards, H. G. M., & de Oliveiraa, L. F. C. (2010). Carotenes and carotenoids in natural biological samples: A Raman spectroscopic analysis. *Journal of Raman Spectroscopy*, 41, 642–650. <https://doi.org/10.1002/jrs.2493>
- de Paula, S. M., & Silveira, M. (2009). Studies on molluscan shells: Contributions from microscopic and analytical methods. *Micron*, 40, 669–690. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.05.006>
- De Soto, N. A., Delorme, N., Atkins, J., Howard, S., Williams, J., & Johnson, M. (2013). Anthropogenic noise causes body malformations and delays development in marine larvae. *Scientific Reports*, 3(2831). <https://doi.org/10.1038/srep02831>
- De Soto, N. A., Gkikopoulou, K., Hooker, S., Isojunno, S., Johnson, M., Miller, P., Tyack, P., Wensveen, P., Donovan, C., Harris, C. M., Harris, D., Marshall, L., Oedekoven, C., Prieto, R., & Thomas, L. (2016). From physiology to policy: A review of physiological noise effects on marine fauna with implications for mitigation. *Proceedings of Meetings on Acoustics*, 27(1). <https://doi.org/10.1121/2.0000299>
- Di Franco, E., Pierson, P., Di Iorio, L., Calò, A., Cottalorda, J. M., Derijard, B., Di Franco, A., Galvé, A., Guibolini, M., Lebrun, J., Micheli, F., Priouzeau, F., Risso-de Faverney, C., Rossi, F., Sabourault, C., Spennato, G., Verrando, P., & Guidetti, P. (2020). Effects of marine noise pollution on Mediterranean fishes and invertebrates: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 159. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111450>
- Drapeau, A., Comeau, L. A., Landry, T., Stryhn, H., & Davidson, J. (2006). Association between longline design and mussel productivity in Prince Edward Island, Canada. *Aquaculture*, 261(3), 879–889. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.045>
- Durier, G., Nadalini, J. B., Saint-Louis, R., Genard, B., Comeau, L. A., & Tremblay, R. (2021). Sensitivity to oil dispersants: Effects on the valve movements of the blue mussel *Mytilus edulis* and the giant scallop *Placopecten magellanicus*, in sub-arctic conditions. *Aquatic Toxicology*, 234. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105797>

- Eggleston, D. B., Lillis, A., & Bohnenstiehl, D. W. R. (2016). Soundscapes and larval settlement: Larval bivalve responses to habitat-associated underwater sounds. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 875, pp. 255–263). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2981-8_30
- Engel, J. (2017). *A Critical Survey of Biomineralization: Control, Mechanisms, Functions and Material Properties* (Springer). <http://www.springer.com/series/8884>
- Feng, Q. L., Li, H. B., Pu, G., Zhang, D. M., Cui, F. Z., Li, H. D., & Kim, T. N. (2000). Crystallographic alignment of calcite prisms in the oblique prismatic layer of *Mytilus edulis* shell. *Journal of Materials Science*, 35, 3337–3340. <https://doi.org/10.1023/A:1004843900161>
- Forêt, M., Barbier, P., Tremblay, R., Meziane, T., Neumeier, U., Duvieilbourg, E., & Olivier, F. (2018). Trophic cues promote secondary migrations of bivalve recruits in a highly dynamic temperate intertidal system. *Ecosphere*, 9(12). <https://doi.org/10.1002/ecs2.2510>
- Fuller, S. C., & Lutz, R. A. (1988). Early shell mineralogy microstructure and surface sculpture in five mytilid species. *Malacologia*, 29(2), 363–372.
- Furuhashi, T., Schwarzing, C., Miksik, I., Smrz, M., & Beran, A. (2009). Molluscan shell evolution with review of shell calcification hypothesis. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 154, 351–371. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.07.011>
- Gamain, P., Roméro-Ramirez, A., Gonzalez, P., Mazzella, N., Gourves, P. Y., Compan, C., Morin, B., & Cachot, J. (2020). Assessment of swimming behavior of the Pacific oyster D-larvae (*Crassostrea gigas*) following exposure to model pollutants. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 3675–3685. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04156-8>
- Gigot, M., Olivier, F., Cervello, G., Tremblay, R., Mathias, D., Meziane, T., Chauvaud, L., & Bonnel, J. (2023). Pile driving and drilling underwater sounds impact the metamorphosis dynamics of *Pecten maximus* (L., 1758) larvae. *Marine Pollution Bulletin*, 191. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114969>
- Gosling, E. (2021). *Marine mussels: ecology, physiology, genetics and culture*. (John Wiley & Sons.).

- Guyondet, T., Filgueira, R., Pearce, C. M., Tremblay, R., & Comeau, L. A. (2022). Nutrient-Loading Mitigation by Shellfish Aquaculture in Semi-Enclosed Estuaries. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.909926>
- Harvey, B. P., Gwynn-Jones, D., & Moore, P. J. (2013). Meta-analysis reveals complex marine biological responses to the interactive effects of ocean acidification and warming. *Ecology and Evolution*, 3(4), 1016–1030. <https://doi.org/10.1002/ece3.516>
- Hawkes, G. P., Day, R. W., Wallace, M. W., Nugent, K. W., Bettiol, A. A., Jamieson, D. N., & Williams, M. C. (1996). Analyzing the growth and form of mollusc shell layers, in situ, by cathodoluminescence microscopy and Raman spectroscopy. *Journal of Shellfish Research*, 15(3), 659–666. <https://www.researchgate.net/publication/231362710>
- He, J., & Bismayer, U. (2019). Polarized mapping Raman spectroscopy: Identification of particle orientation in biominerals. *Zeitschrift Fur Kristallographie - Crystalline Materials*. <https://doi.org/10.1515/zkri-2019-0004>
- Hedegaard, C., Bardeau, J. F., & Chateigner, D. (2006). Molluscan shell pigments: An in situ resonance Raman study. *Journal of Molluscan Studies*, 72, 157–162. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyi062>
- Helm, M. M., & Bourne, N. (2006). *Ecloserie de bivalves: un manuel pratique*. organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO).
- Hildebrand, J. A. (2009). Anthropogenic and natural sources of ambient noise in the ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 395, 5–20. <https://doi.org/10.3354/meps08353>
- Holland, D., & Spencer, B. (1973). Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* L. during larval development, metamorphosis and early spat growth. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 53(2), 287–298.
- Hubert, J., Booms, E., Witbaard, R., & Slabbekoorn, H. (2022). Responsiveness and habituation to repeated sound exposures and pulse trains in blue mussels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 547. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2021.151668>

- Hunt, H. L., & Scheibling, R. E. (1996). Physical and biological factors influencing mussel (*Mytilus trossulus*, *M. edulis*) settlement on a wave-exposed rocky shore. *Marine Ecology Progress Series*, 142, 135–145.
- International standard - ISO. (2016). *Acoustics — Description, measurement and assessment of environmental noise — Part 1: Basic quantities and assessment procedures*.
- Jalkanen, J. P., Johansson, L., Andersson, M. H., Majamäki, E., & Sigraý, P. (2022). Underwater noise emissions from ships during 2014–2020. *Environmental Pollution*, 311. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119766>
- Jolivet, A., Tremblay, R., Olivier, F., Gervaise, C., Sonier, R., Genard, B., & Chauvaud, L. (2016). Validation of trophic and anthropic underwater noise as settlement trigger in blue mussels. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep33829>
- Jones, R. R., Hooper, D. C., Zhang, L., Wolverson, D., & Valev, V. K. (2019). Raman Techniques: Fundamentals and Frontiers. *Nanoscale Research Letters*, 14(231). <https://doi.org/10.1186/s11671-019-3039-2>
- Kitajima, M. (1997). Defects in crystals studied by Raman scattering. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, 22(4), 275–349. <https://doi.org/10.1080/10408439708241263>
- Lagarde, F., Richard, M., Bec, B., Roques, C., Mortreux, S., Bernard, I., Chiantella, C., Messiaen, G., Nadalini, J.-B., Hori, M., Hamaguchi, M., Pouvreau, S., Roque D'orbcastel, E., & Tremblay, R. (2018). Trophic environments influence size at metamorphosis and recruitment performance of Pacific oysters. *Marine Ecology Progress Series*, 602, 135–153. <https://doi.org/10.2307/26508792>
- Lane, D. J. W., Beaumont, A. R., & Hunter, J. R. (1985). Byssus drifting and the drifting threads of the young post-larval mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 84, 301–308.
- Langer, G., Nehrke, G., Baggini, C., Rodolfo-Metalpa, R., Hall-Spencer, J. M., & Bijma, J. (2014). Limpets counteract ocean acidification induced shell corrosion by thickening of aragonitic shell layers. *Biogeosciences*, 11, 7363–7368. <https://doi.org/10.5194/bg-11-7363-2014>

- Leal, I., Bouchard, É., Flores, A. A. V., & Tremblay, R. (2018). Trophic cues as possible triggers of mussel larval settlement in southeastern Brazil. *Aquatic Living Resources*, 31(26). <https://doi.org/10.1051/alr/2018013>
- Leal, I., Flores, A. A. V., Collin, R., & Tremblay, R. (2019). Drifting in the Caribbean: Hints from the intertidal bivalve *Isognomon alatus*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 227. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.106333>
- Ledoux, T., Clements, J. C., Comeau, L. A., Cervello, G., Tremblay, R., Olivier, F., Chauvaud, L., Bernier, R. Y., & Lamarre, S. G. (2023). Effects of anthropogenic sounds on the behavior and physiology of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Frontiers in Marine Science*. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1104526>
- Louis, V., Besseau, L., & Lartaud, F. (2022). Step in Time: Biomineralisation of Bivalve's Shell. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.906085>
- Lu, Y., Li, Y., Li, Y., Wang, Y., Wang, S., Bao, Z., & Zheng, R. (2015). Micro spatial analysis of seashell surface using laser-induced breakdown spectroscopy and Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part B*, 110, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2015.05.012>
- Marin, F., Le Roy, N., & Marie, B. (2012). The formation and mineralization of mollusk shell. *Frontiers Un Bioscience*, 4, 1099–1125. <https://www.researchgate.net/publication/51925970>
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B., & Medakovic, D. (2007). Molluscan Shell Proteins: Primary Structure, Origin, and Evolution. In *Current Topics in Developmental Biology* (Elsevier, Vol. 80, pp. 209–276). [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(07\)80006-8](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(07)80006-8)
- Martel, A., Hynes, T. M., & Buckland-Nicks, J. (1995). Prodissoconch morphology, planktonic shell growth, and size at metamorphosis in *Dreissena polymorpha*. *Canadian Journal of Zoology*, 73, 1835–1844. www.nrcresearchpress.com
- Martel, A., Tremblay, R., Toupoint, N., Olivier, F., & Myrand, B. (2014). Veliger size at metamorphosis and temporal variability in Prodissoconch II Morphometry in the Blue Mussel (*Mytilus edulis*): Potential impact on recruitment. *Journal of Shellfish Research*, 33(2), 443–455. <https://doi.org/10.2983/035.033.0213>

- McDonald, J. I., Wilkens, S. L., Stanley, J. A., & Jeffs, A. G. (2014). Vessel generator noise as a settlement cue for marine biofouling species. *Biofouling*, 30(6), 741–749. <https://doi.org/10.1080/08927014.2014.919630>
- McDonald, M. A., Hildebrand, J. A., & Wiggins, S. M. (2006). Increases in deep ocean ambient noise in the Northeast Pacific west of San Nicolas Island, California. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 120(2), 711–718. <https://doi.org/10.1121/1.2216565>
- McKenna, M. F., Ross, D., Wiggins, S. M., & Hildebrand, J. A. (2012). Underwater radiated noise from modern commercial ships. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 131(1), 92–103. <https://doi.org/10.1121/1.3664100>
- Ministère des pêches et des océans. (2003). *Profil de la moule bleue (Mytilus edulis)*.
- Moir, A. J. G. (1977). On the Ultrastructure of the Abdominal Sense Organ of the Giant Scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin)*. *Cell and Tissue Research*, 184, 359–366.
- Murphy, A. E., Jakubek, R. S., Steele, A., Fries, M. D., & Glamoclija, M. (2021). Raman spectroscopy provides insight into carbonate rock fabric based on calcite and dolomite crystal orientation. *Journal of Raman Spectroscopy*, 52, 1155–1166. <https://doi.org/10.1002/jrs.6097>
- Nehrke, G., & Nouet, J. (2011). Confocal Raman microscope mapping as a tool to describe different mineral and organic phases at high spatial resolution within marine biogenic carbonates: Case study on *Nerita undata* (Gastropoda, Neritopsina). *Biogeosciences*, 8, 3761–3769. <https://doi.org/10.5194/bg-8-3761-2011>
- Newell, C. R., Short, F., Hoven, H., Healey, L., Panchang, V., & Cheng, G. (2010). The dispersal dynamics of juvenile plantigrade mussels (*Mytilus edulis* L.) from eelgrass (*Zostera marina*) meadows in Maine, U.S.A. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 394, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.06.025>
- Olivier, F., Gigot, M., Mathias, D., Jezequel, Y., Meziane, T., L’Her, C., Chauvaud, L., & Bonnel, J. (2022). Assessing the impacts of anthropogenic sounds on early stages of benthic invertebrates: The “Larvosonic system.” *Limnology and Oceanography: Methods*. <https://doi.org/10.1002/lom3.10527>

- Pechenik, J. A. (1990). Delayed metamorphosis by larvae of benthic marine invertebrates: Does it occur? Is there a price to pay? *Ophelia*, 32(1–2), 63–94.
<https://doi.org/10.1080/00785236.1990.10422025>
- Pechenik, J. A., Wendt, D. E., & Jarrett, J. N. (1998). Metamorphosis is not a new beginning: Larval experience influences juvenile performance. *BioScience*, 48(11), 901–910. <https://doi.org/10.2307/1313294>
- Pernet, F., Tremblay, R., & Bourget, E. (2003). Settlement success, spatial pattern and behavior of mussel larvae *Mytilus* spp. in experimental “down-welling” systems of varying velocity and turbulence. *Marine Ecology Progress Series*, 260, 125–140.
- Petersen, J. K., Saurel, C., Nielsen, P., & Timmermann, K. (2016). The use of shellfish for eutrophication control. *Aquaculture International*, 24, 857–878.
<https://doi.org/10.1007/s10499-015-9953-0>
- Pirutin, S. K., Jia, S., Yusipovich, A. I., Shank, M. A., Parshina, E. Y., & Rubin, A. B. (2023). Vibrational Spectroscopy as a Tool for Bioanalytical and Biomonitoring Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6947).
<https://doi.org/10.3390/ijms24086947>
- Podolsky, R. D., & Moran, A. L. (2006). Integrating function across marine life cycles. *Integrative and Comparative Biology*, 46(5), 577–586.
<https://doi.org/10.1093/icb/icl026>
- Popper, A. N., & Hawkins, A. (2016). The Effects of Noise on Aquatic Life II. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 875(2). <http://www.springer.com/series/5584>
- Przeslawski, R., Byrne, M., & Mellin, C. (2015). A review and meta-analysis of the effects of multiple abiotic stressors on marine embryos and larvae. *Global Change Biology*, 21(6), 2122–2140. <https://doi.org/10.1111/gcb.12833>
- Qiu, J.-W., Tremblay, R., & Bourget, E. (2002). Ontogenetic changes in hyposaline tolerance in the mussels *Mytilus edulis* and *M. trossulus*: implications for distribution. *Marine Ecology Progress Series*, 228, 143–152. <https://doi.org/10.2307/24865034>
- Radford, C. A., Jeffs, A. G., Tindle, C. T., & Montgomery, J. C. (2008). Temporal patterns in ambient noise of biological origin from a shallow water temperate reef. *Oecologia*, 156(4), 921–929. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1041-y>

- Ramesh, K., Melzner, F., Griffith, A. W., Gobler, C. J., Rouger, C., Tasdemir, D., & Nehrke, G. (2018). In vivo characterization of bivalve larval shells: A confocal Raman microscopy study. *Journal of the Royal Society Interface*, 15.
<https://doi.org/10.1098/rsif.2017.0723>
- Rayssac, N., Pernet, F., Lacasse, O., & Tremblay, R. (2010). Temperature effect on survival, growth, and triacylglycerol content during the early ontogeny of *Mytilus edulis* and *M. Trossulus*. *Marine Ecology Progress Series*, 417, 183–191.
<https://doi.org/10.3354/meps08774>
- Redfearn, P., Chanley, P., & Chanley, M. (1986). Larval shell development of four species of new zealand mussels: (Bivalvia, mytilacea). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 20(2), 157–172.
<https://doi.org/10.1080/00288330.1986.9516140>
- Ren, F., Wan, X., Ma, Z., & Su, J. (2009). Study on microstructure and thermodynamics of nacre in mussel shell. *Materials Chemistry and Physics*, 114(1), 367–370.
<https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2008.09.036>
- Roberts, L., Cheesman, S., Breithaupt, T., & Elliott, M. (2015). Sensitivity of the mussel *Mytilus edulis* to substrate-borne vibration in relation to anthropogenically generated noise. *Marine Ecology Progress Series*, 538, 185–195.
<https://doi.org/10.3354/meps11468>
- Sea, M. A., Hillman, J. R., & Thrush, S. F. (2022). Enhancing multiple scales of seafloor biodiversity with mussel restoration. *Scientific Reports*, 12(5027).
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-09132-w>
- Slabbekoorn, H. (2019, October 7). Noise pollution. *Current Biology*, 29(19), R957–R960.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.07.018>
- Smaal, A. C., Ferreira, J. G., Grant, J., Petersen, J. K., & Strand, O. (2019). *Goods and Services of Marine Bivalves*. www.zeeuwsblauw.nl
- Solan, M., & Whiteley, N. M. (2016). *Stressors in the Marine Environment* (Oxford press).
- Soldati, A., & Jacob, D. E. (2016). Manganese incorporation into mussel shells elucidated using X-ray emission spectroscopy. *Esrif*.
<https://www.researchgate.net/publication/305654328>

- Solé, M., Kaifu, K., Mooney, T. A., Nedelec, S. L., Olivier, F., Radford, A. N., Vazzana, M., Wale, M. A., Semmens, J. M., Simpson, S. D., Buscaino, G., Hawkins, A., Aguilar de Soto, N., Akamatsu, T., Chauvaud, L., Day, R. D., Fitzgibbon, Q., McCauley, R. D., & André, M. (2023). Marine invertebrates and noise. *Frontiers in Marine Science*. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1129057>
- Spiga, I., Caldwell, G. S., & Brintjes, R. (2016). Influence of pile driving on the clearance rate of the blue mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Proceedings of Meetings on Acoustics*, 27(1). <https://doi.org/10.1121/2.0000277>
- Stanley, S. M. (1972). Functional Morphology and Evolution of Byssally Attached Bivalve Mollusks. *Journal of Paleontology*, 46(2), 165–212.
- Stemmer, K., & Nehrke, G. (2014). The distribution of polyenes in the shell of *Arctica islandica* from North Atlantic localities: A confocal Raman microscopy study. *Journal of Molluscan Studies*, 80, 365–370. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyu033>
- Stewart, B. D., Jenkins, S. R., Boig, C., Sinfield, C., Kennington, K., Brand, A. R., Lart, W., & Kröger, R. (2021). Metal pollution as a potential threat to shell strength and survival in marine bivalves. *Science of the Total Environment*, 755. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143019>
- Tacon, A. G. J. (2020). Trends in Global Aquaculture and Aquafeed Production: 2000–2017. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 28(1), 43–56. <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1649634>
- Toonen, R. J., & Pawlik, J. R. (1994). Foundations of gregariousness. *Nature*, 370(6490), 511–512. <https://doi.org/10.1038/370511a0>
- Toupoint, N. (2012). *Le succès de recrutement de la moule bleue: influence de la qualité de la ressource trophique*. Université du Québec à Rimouski.
- Toupoint, N., Gilmore-Solomon, L., Bourque, F., Myrand, B., Pernet, F., Olivier, F., & Tremblay, R. (2012). Match/mismatch between the *Mytilus edulis* larval supply and seston quality: effect on recruitment. *Ecology*, 93(8), 1922–1934. <http://www.jstor.orgURL:http://www.jstor.org/stable/23225193http://www.jstor.org/page/info/about/policies/terms.jsp>

- Toupoint, N., Mohit, V., Linossier, I., Bourgougnon, N., Myrand, B., Olivier, F., Lovejoy, C., & Tremblay, R. (2012). Effect of biofilm age on settlement of *Mytilus edulis*. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm*, 28(9), 985–1001. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.725202>
- Varennnes, E., Hanssen, S. A., Bonardelli, J. C., & Guillemette, M. (2015). Blue mussel (*Mytilus edulis*) quality of preferred prey improves digestion in a molluscivore bird (common eider, *Somateria mollissima*). *Canadian Journal of Zoology*, 93(10), 783–789. <https://doi.org/10.1139/cjz-2015-0066>
- Vazzana, M., Celi, M., Maricchiolo, G., Genovese, L., Corrias, V., Quinci, E. M., de Vincenzi, G., Maccarrone, V., Cammilleri, G., Mazzola, S., Buscaino, G., & Filiciotto, F. (2016). Are mussels able to distinguish underwater sounds? Assessment of the reactions of *Mytilus galloprovincialis* after exposure to lab-generated acoustic signals. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A*, 201, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.06.029>
- Vazzana, M., Ceraulo, M., Mauro, M., Papale, E., Dioguardi, M., Mazzola, S., Arizza, V., Chiaramonte, M., & Buscaino, G. (2020). Effects of acoustic stimulation on biochemical parameters in the digestive gland of Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *The Journal of the Acoustical Society of America*, 147(4), 2414–2422. <https://doi.org/10.1121/10.0001034>
- Veillard, D., Beauclercq, S., Ghafari, N., Arnold, A. A., Genard, B., Sleno, L., Olivier, F., Choquet, A., Warschawski, D. E., Marcotte, I., & Tremblay, R. (2024). *Molecular evidence of shipping noise impact on the blue mussel, a key species for the sustainability of coastal marine environments*.
- Wale, M. A., Briers, R. A., Hartl, M. G. J., Bryson, D., & Diele, K. (2019). From DNA to ecological performance: Effects of anthropogenic noise on a reef-building mussel. *Science of the Total Environment*, 689, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.380>
- Weilgart, L. (2018). *THE IMPACT OF OCEAN NOISE POLLUTION ON FISH AND INVERTEBRATES*.

- Wilkins, S. L., Stanley, J. A., & Jeffs, A. G. (2012). Induction of settlement in mussel (*Perna canaliculus*) larvae by vessel noise. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm*, 28(1), 65–72. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.651717>
- Williams, S. T., Ito, S., Wakamatsu, K., Goral, T., Edwards, N. P., Wogelius, R. A., Henkel, T., De Oliveira, L. F. C., Maia, L. F., Strekopytov, S., Jeffries, T., Speiser, D. I., & Marsden, J. T. (2016). Identification of shell colour pigments in marine snails *Clanculus pharaonius* and *C. margaritarius* (Trochoidea; gastropoda). *PLoS ONE*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156664>
- Xu, Z., He, Z., Song, Y., Fu, X., Rommel, M., Luo, X., Hartmaier, A., Zhang, J., & Fang, F. (2018). Topic review: Application of raman spectroscopy characterization in micro/nano-machining. *Micromachines*, 9(361). <https://doi.org/10.3390/mi9070361>
- Yarra, T., Blaxter, M., & Clark, M. S. (2021). A Bivalve Biomineralization Toolbox. *Molecular Biology and Evolution*, 38(9), 4043–4055. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab153>
- Zhadan, P. M., Sizov, A. V., & Dautov, S. S. (2004). Ultrastructure of the abdominal sense organ of the scallop *Mizuchopecten yessoensis* (Jay). *Cell and Tissue Research*, 318(3), 617–629. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0926-2>
- Zhao, X., Sun, S., Shi, W., Sun, X., Zhang, Y., Zhu, L., Sui, Q., Xia, B., Qu, K., Chen, B., & Liu, G. (2021). Mussel Byssal Attachment Weakened by Anthropogenic Noise. *Frontiers in Marine Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.821019>