



Effets du zinc sur la physiologie du stade juvénile de la seiche commune *Sepia officinalis* et étude du système immunitaire pour le développement d'outils in vitro

Charles Le Pabic

► To cite this version:

Charles Le Pabic. Effets du zinc sur la physiologie du stade juvénile de la seiche commune *Sepia officinalis* et étude du système immunitaire pour le développement d'outils in vitro. Ecotoxicologie. Université de Caen Basse-Normandie, 2014. Français. NNT : . tel-01145324

HAL Id: tel-01145324

<https://theses.hal.science/tel-01145324>

Submitted on 23 Apr 2015

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

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

UNIVERSITÉ DE CAEN BASSE-NORMANDIE

UFR : Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée

Ecole doctorale Biologie Intégrative Santé Environnement

THESE

Présentée par

Charles LE PABIC

soutenue le 27 juin 2014

En vue de l'obtention du

Doctorat de l'Université de Caen Basse-Normandie

Spécialité : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions

(Arrêté du 07 août 2006)

Sujet de la thèse :

Effets du zinc sur la physiologie du stade juvénile de la seiche commune *Sepia officinalis* et étude du système immunitaire pour le développement d'outils *in vitro*

devant le jury composé de :

M. Paco BUSTAMANTE	Professeur, Université de La Rochelle	Rapporteur
M. José Pedro ANDRADE	Professeur, Université de Faro, Portugal	Rapporteur
Mme Christine PAILLARD	Directrice de Recherche CNRS, Université de Bretagne Occidentale	Examineur
Mme Cécile BELLANGER	Maître de Conférences HDR, Université de Caen	Examineur
M. Jean-Marc LEBEL	Professeur, Université de Caen	Examineur
M. Noussithé KOUETA	Maître de Conférences HDR, Université de Caen	Directeur de thèse

Avant-propos

Ce travail de recherche a été réalisé au sein de l'École Doctorale Normandie de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EDNBISE 497), dans le laboratoire de Biologie des Organismes et Écosystèmes Aquatiques (UMR BOREA, MNHN, UPMC, UCBN, CNRS-7208, IRD-207, IBFA) de l'Université de Caen Basse-Normandie.



Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet INTERREG IV-A CHRONEXPO. Elle a été financée par les Fonds Européens de Développement Régional (FEDER bourse 4059) et par la région Basse-Normandie.



Le projet CHRONEXPO a été piloté par le Docteur Bruno Fiévet de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) et a regroupé cinq partenaires anglais et français : l'Université de Plymouth, l'université de Portsmouth, le Centre des Sciences de l'Environnement, de la Pêche et de l'Aquaculture (Cefas) de Weymouth, l'IRSN de Cherbourg, et l'Université de Caen.



Communications Scientifiques

Les résultats de ces travaux de doctorat ont fait l'objet d'articles scientifiques et de communications scientifiques dans le cadre de congrès nationaux et internationaux sous forme de présentations orales et affichées :

Articles scientifiques présentés dans cet ouvrage

- Prophenoloxidase system, lysozyme and protease inhibitor distribution in the common cuttlefish *Sepia officinalis*. **Le Pabic, C.***, Safi, G.*, Serpentini, A., Lebel, J.-M., Robin J.-P., Koueta, N. (2014) *Comparative Physiology & Biochemistry, Part B* 172-173, 96-104.
- Hemocyte morphology and phagocytic activity in the common cuttlefish (*Sepia officinalis*). **Le Pabic, C.**, Goux, D., Guillamin, M., Safi, G., Lebel, J.-M., Koueta, N., Serpentini, A. *accepté dans Fish & Shellfish Immunology*.
- Physiological perturbations in juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* induced by subchronic exposure to dissolved zinc. **Le Pabic, C.**, Caplat, C., Lehodey, J.-P., Dallas, L., Koueta, N. *soumis dans Marine Pollution Bulletin*.
- First description of metal homeostasis in the juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* and consequences of dissolved zinc exposure. **Le Pabic, C.**, Caplat, C., Lehodey, J.-P., Milinkovitch, T., Cosson, R. P., Koueta, N. *en préparation*.

Autres articles scientifiques

- Responses of primary cultured haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata* under 10-day exposure to cadmium chloride. Latire, T., **Le Pabic, C.**, Mottin, E., Mottier, A., Costil, K, Koueta, N., Lebel, J.-M., Serpentini, A. (2012) *Aquatic Toxicology* 109, 213-221.
- Cephalopod culture : Current status of main biological models, and research priorities. Vidal, EAG., Villanueva, R., Andrade, JP., Gleadall, IG., Iglesias, J., Koueta, N., Rosas, C., Segawa, S., Grasse, B., Franco-Santos, RM., Albertin, BC., Caamal-Monsreal, C.,

Chimal, ME., Edsinger-Gonzales, E., Gallardo, P., **Le Pabic, C.**, Pascual, C., Roumbedakis, K., Wood, J. In : Vidal, EAG., editor : *Advances in Marine Biology* Vol. 67, Oxford : United Kingdom (2014) pp. 1-98.

- Effects of subchronic exposure to glyphosate in juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) : from molecular to individual levels. Mottier, A.*, Seguin, A.*, Devos, A., Voiseux, C., **Le Pabic, C.**, Lebel, J.-M., Serpentine, A., Fiévet, B., Costil, K. *soumis dans Marine Pollution Bulletin*.

Participations à des congrès internationaux

– Communications orales

- Effects of chronic exposure to dissolved zinc on juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. : development of appropriate biomarkers. **Le Pabic, C.**, Safi, G., Serpentine, A., Lebel, J.-M., Koueta, N. (2012) *Cephalopod International Advisory Council (CIAC)*, 27 oct.-2 nov., Florianópolis (Brésil)

- Lysozyme, antiprotease and phenoloxidase activities in cuttlefish *Sepia officinalis* L. **Koueta, N.**, Safi, G., Le Pabic, C., Serpentine, A., Lebel, J.-M., Robin, J.-P. (2012) *Cephalopod International Advisory Council (CIAC)*, 27 oct.-2 nov., Florianópolis (Brésil)

– Communications affichées

- Characterization of *Sepia officinalis* haemocytes, primary-culture development and enzymatic assays on serum and haemocytes fractions. **Le Pabic, C.**, Goux, D., Serpentine, A., Lebel, J.-M., Koueta, N. (2012) *Cephalopod International Advisory Council (CIAC)*, 27 oct.-2 nov., Florianópolis (Brésil)
- Effects of waterborne fluoxetine on survival behaviors and physiological functions in young cuttlefish. Di Poi, C., **Le Pabic, C.**, Darmaillacq, A.-S., Koueta, N., Belanger C. (2012) *Cephalopod International Advisory Council (CIAC)*, 27 oct.-2 nov., Florianópolis (Brésil)

- Histological and biochemical tools used to characterize the digestive gland maturation in cuttlefish *Sepia officinalis* L. early life history. **Safi, G.**, Le Pabic, C., Robin J.-P., Koueta N. (2012) *Cephalopod International Advisory Council (CIAC)*, 27 oct.-2 nov., Florianópolis (Brésil)
- Pre-recruits immune system evolution of cuttlefish *Sepia officinalis* L. from different spawning sites of the English Channel. **Safi, G.**, Le Pabic, C., Robin, J.-P., Koueta, N. (2011) *International Council for the Exploration of the Sea (ICES)*, 19-23 sept., Gdansk (Pologne)
- Haemocyte characterization in *Sepia officinalis* (Mollusca cephalopoda). **Le Pabic, C.**, Goux, D., Safi, G., Sepentini, A., Lebel J.-M., Koueta, N. (2011) *Cephalopod Biology Research in the 21st Century – A European Perspective (EUROCEPH)*, 7-10 avril, Naples (Italie)

Participations à des congrès nationaux

- **Communications affichées**
 - Hemocyte primary-culture from three Mollusc species and its application in ecotoxicology. **Le Pabic, C.**, **Mottier, A.**, Costil, K., Koueta, N., Lebel, J.-M., Serpentini, A. (2012) *Marine Invertebrate Cell Culture Symposium*, 30-31 août, Concarneau (France)

Remerciements

Tout d'abord je remercie Mme Sylvie Dufour, directrice de recherche CNRS et directrice du Laboratoire de "Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques" (UMR BOREA MNHN-USM 401, CNRS-7208, IRD-207, UPMC) ainsi que le professeur Pascal Sourdain, directeur du site de Caen, pour leur accueil et leur gentillesse au cours de mes travaux de thèse.

Je remercie également le docteur Noussithé Koueta, maître de conférences à l'Université de Caen, qui a encadré ce doctorat, pour son soutien et sa confiance dans la réalisation de ce travail.

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à Paco Bustamante, professeur à l'Université de La Rochelle, pour avoir accepté d'être rapporteur de ces travaux de thèse, ainsi que pour m'avoir accueilli à plusieurs reprises au sein du laboratoire LIENSs. Ses remarques et conseils ont été précieux pour mes travaux de recherche. J'espère que l'avenir me donnera l'opportunité de continuer à travailler avec lui sur ces organismes fascinants que sont les céphalopodes.

Je suis très reconnaissant envers M. José Pedro Andrade, professeur à l'Université d'Algarve, et très honoré qu'il ait accepté d'être rapporteur de cette thèse. J'attends ses remarques avec impatience.

Je remercie également Mmes Christine Paillard et Cécile Bellanger, respectivement directrice de recherche CNRS à l'Institut Universitaire Européen de la Mer de Plouzané, et maître de conférences à l'Université de Caen Basse-Normandie, pour avoir accepté d'être examinatrices de ce travail de thèse.

Merci au professeur Jean-Marc Lebel, examinateur de ces travaux de recherche, pour sa confiance, ses conseils et sa gestion de l'antenne Caennaise du programme CHRONEXPO.

Un grand merci au docteur Antoine Serpentine pour l'ensemble de sa contribution à ce travail et tout particulièrement pour la partie culture cellulaire qui n'aurait pas été possible sans

son aide. Je remercie également Mmes Isabelle Domart-Coulon et Delphine Pichon d'avoir partagé leurs connaissances relatives à la culture primaire de cellules issues de céphalopodes, qui m'ont grandement aidé à mettre en place les outils présentés dans cette thèse.

Merci au docteur Bruno Fiévet de l'IRSN, coordinateur du projet CHRONEXPO pour la qualité d'encadrement du programme. Il nous a permis de réaliser ces travaux de recherche dans des conditions idéales, tant au niveau des moyens, que des échanges scientifiques et culturels avec nos amis anglais. Merci pour son envie constante de tirer ce programme vers le haut.

J'en profite également pour remercier tous les autres acteurs du programme : Alexandre, Claire, Lorna, Awhadesh, Jennifer, Gordon, Brett et tous les autres, qui ont tous fait preuve de curiosité vis-à-vis du modèle "seiche", ont partagé leur maîtrise de certains outils comme le test COMET ou le video tracking, rendant cette expérience d'autant plus enrichissante.

Tous les travaux réalisés pendant cette thèse n'auraient pas été possibles sans les structures et la cellule technique du Centre de Recherches en Environnement Côtier (CREC) de Luc-sur-Mer. Un immense merci à Jean-Paul Lehodey qui m'a permis, par son savoir-faire, de développer la plupart des structures d'élevage mises en place au cours de cette thèse. J'ai toujours rêvé d'avoir un ami bricoleur comme toi, toujours prêt à partager ses connaissances. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité, ta patience et tes nombreuses autres qualités. Le CREC n'aurait assurément pas eu la même saveur sans toi. J'espère que l'avenir nous permettra de rester en contact.

Je ne peux pas parler du CREC et des élevages de seiches sans remercier les différents membres du GMPc qui m'ont beaucoup apporté au cours de nos saisons d'élevage. Merci à Christelle, Anne-Sophie, Cécile (re-merci), Ludovic et Carole, ainsi qu'à leurs nombreux stagiaires.

Je remercie également tout le personnel du CREC (Manu, Léna, Olivier, Pascal, Yann, Anaïs, Guillaume, David) pour m'avoir aidé de près ou de loin, techniquement ou moralement, pendant ces quelques années passées en leur compagnie.

Je remercie enfin Céline Zatylny et Joël Henry pour m’avoir permis de réaliser mes expériences d’élevage dans une partie de leurs locaux au CREC.

Un très grand merci à Didier Goux pour tout le temps passé en microscopie électronique. Sa dextérité des poignets et sa connaissance de ce genre d’imagerie m’ont permis de gagner un temps précieux et d’exploiter pleinement mes échantillons. J’ai été très heureux de faire ta connaissances et qui sait, peut être un jour nous reverrons-nous là où la côte est belle... Ken e vi gwelet !

Je remercie Christelle Caplat pour ses nombreux accueils dans les locaux de Corrodys où ont été réalisés la plupart des dosages en zinc dissous de cette thèse. Merci pour le partage de ta vision de chimiste du milieu marin qui a été enrichissante pour moi, ainsi que pour ta gentillesse et ta disponibilité.

Je tiens également à remercier Carine Churlaud qui a réalisé les analyses des éléments traces présents dans les tissus de seiche. Merci pour ses explications concernant le fonctionnement des différents systèmes analytiques des éléments traces présents au CCA, ainsi que pour sa gentillesse et son accueil.

Un très grand merci à M. Richard Cosson pour la réalisation des dosages de métallothionéines, ses explications sur cette méthode, son accueil au sein du laboratoire MMS de l’Université de Nantes, ainsi que pour le temps passé à m’expliquer et discuter des résultats. J’ai été très heureux de faire sa connaissance et espère avoir l’occasion de collaborer à nouveau avec lui.

Un grand merci à Béatrice Adeline pour son aide et ses précieux conseils concernant les colorations histologiques.

Je tiens également à remercier Benoit Bernay et Marion Berthelot pour m’avoir permis de travailler sur la plateforme PROTEOGEN et d’avoir supporté mon usage mono-maniaque

des lecteurs d'absorbance. Merci également pour leur aide et leur gentillesse.

Merci à Maryline Guillaumin pour son expertise en cytométrie en flux ayant permis de répondre à un grand nombre de questions concernant la préparation d'échantillon et l'analyse des données de cet outil particulièrement puissant.

Je remercie Thomas Milinkovitch pour avoir accepté de me consacrer du temps et d'avoir partagé ses techniques de dosages d'enzymes impliquées dans la gestion du stress oxydatif.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire BOREA de Caen, professeurs, maîtres de conférences et personnels techniques qui ont pu contribuer de près ou de loin à la rédaction de ce manuscrit.

Merci également aux quelques courageux stagiaires qui n'ont pas eu peur de m'accompagner dans ce projet. Merci à Fan Qin (mon assistant mysis), ainsi qu'à Laura Varin et Ruth Quinn-Parsons (sans qui je n'aurais probablement pas survécu à ma dernière saison d'élevage). Bien que ponctué de tâches répétitives (élevage oblige!), j'ai été très heureux de pouvoir partager ces moments avec vous.

Un très grand merci à Thomas Lacoue-Labarthe pour l'intérêt porté à mes travaux de recherche, ses conseils, son aide... J'espère réussir aussi bien que toi dans le milieu des céphalopodes et que nous aurons l'occasion de travailler ensemble à de nombreuses reprises.

Je remercie le professeur Franck Le Foll et le docteur Damien Rioult pour leur accueil au laboratoire d'écotoxicologie et des milieux aquatiques du Havre et le partage de leur superbe outil qu'est le cell tracking. Je regrette seulement de n'avoir pas eu le temps de mettre à profit cet outil chez la seiche avec eux.

Enfin, je remercie tous mes collègues doctorants et post-doctorants du laboratoire que j'ai été très heureux de rencontrer et avec qui, malgré ma présence inconstante au laboratoire, j'ai passé de très bon moments. Dans le désordre, je remercie Michael Gras pour m'avoir

réconcilié avec R et pour avoir conservé le titre de personne la plus désagréable du laboratoire... Merci pour ta disponibilité et ta bonne humeur (si, si). Merci à Nicolas Schiffrine pour m'avoir fait découvrir un grand nombre de packages sans lesquels mes résultats n'auraient pas été ce qu'ils sont. Merci à Emilie Farcy pour ses protocoles de cytométrie en flux et ses histoires de post-doc qui font rêver d'en faire. Merci à Martin Ubertini (le plus italien des bretons) pour être ce qu'il est. Merci à tous les autres : Alexis (mon premier fan), Camille, Maxoooooooouuuuu, Marie, Alex, Cécile, Rémi, Laëtitia, Pauline, Thomas (notre pipelette nationale), Christiane (toujours prête à finir mes gâteaux pour rendre service), Emmanuelle, Edouard, Samuele... Un merci spécial pour mes acolytes adorateurs de la seiche, Jérèm et Valoche, pour m'avoir facilité la vie un grand nombre de fois (mais chut, c'est un secret!!!).

Un merci particulier à Georges Safi, mon frère doseur, sans qui je n'ose imaginer ce qu'aurait contenu cette thèse. Merci pour m'avoir mis le pied à l'étrier concernant les élevages de seiches et les dosages biochimiques. Tu es formidable et j'espère que nous ne nous perdrons pas de vue de si tôt.

Un dernier merci spécial à Antoine Mottier, mon partenaire de thèse, qui n'a jamais hésité à partager (en sciences, en L^AT_EX, en potin, en péristaltisme...). Je le remercie pour toute l'aide qu'il m'a apportée et pour tous les bons moments passés ensemble.

Merci à ma famille et particulièrement à mon frère Pierre, sans qui mes articles n'auraient pas été de la même qualité. Merci pour le temps passé dessus, merci pour sa patience, pour sa gentillesse. Merci pour tout...

Enfin, un merci amoureux à Morgane, avec qui tout devient possible. Merci pour tout ce que tu m'apportes au jour le jour...

Liste des abréviations

Aa	Acides aminés
ACP	ACid Phosphatases
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AMP	AntiMicrobial Peptide
APO	Activated PhenolOxidase
ARN	Acide RiboNucléique
BAPNA	N α -benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride
BH	Branchial Heart
BHA	Branchial Heart Appendages
BSA	Bovin Serum Albumin
CDNB	1-Chloro-2,4-DiNitroBenzene
Cefas	Center for environment, fisheries and aquaculture science
Da	Dalton
DCE	Directive Cadre sur l'Eau
DCFH-DA	2',7', DiChloroFluoresceine DiAcétate
DG	Digestive Gland
DGA	Digestive Gland Appendages
DMSO	Dimethyl SulfOxide
DPP	Differential Pulse Polarographic analysis

EC ₅₀	50 % Effective Concentration
EDTA	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
EPA	Environmental Protection Agency
EQS	Environmental Quality Standards
FCM	Flow CytoMetry
FSC	Forward SCatter
GSH	Glutathion réduit
GST	Glutathion S-Transférase
Hc	Hemocyte
Hcy	Hémocyanine
HEW	Hen Egg White
HMWP	High Molecular Weight Protein
INERIS	Institut National de l'Environnement Industriel et des RISques
IREP	Registre français des Emissions Polluantes
IRSN	Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire
L-DOPA	3,4-dihydroxy-L-phenylalanine
LC ₅₀	50 % Lethal Concentration
LPO	Lipid PerOxidation
MBA	Marine Biological Association
MDA	MalonDiAldehyde
ML	Mantle Length
MOD	Matière Organique Dissoute
MPS	Molluscan Physiological Saline
MTs	MétalloThionéines

NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate oxydase
NIST	National Institute of Standards and Technology
NOEC	No Observed Effect Concentration
NR	Neutral Red
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	Protease Inhibitor
PO	PhénolOxydase
proPO	ProPhénolOxydase
PRR	Pattern Recognition Receptor
PSG	Posterior Salivary Glands
ROCCH	Réseau d'Observation de la Contamination CHimique du littoral
ROS	Reactive Oxygen Species
SAA-F	Spectrométrie d'Absorption Atomique en mode Flamme
SD	Standard Deviation
SE	Standard Error
SEM	Scanning Electron Microscopy
SH	Systemic Heart
SOD	SuperOxyde Dismutase
SRM	Standard Reference Material
SSC	Side SCatter
Stc	Stomach
TEM	Transmission Electron Microscopy

TI	Trypsin Inhibition
TPCK	N-Tosyl-L-Phenylalanyl Chloromethyl Ketone
WB	White Bodies
Zn	Zinc

Liste des tableaux

1.1	Résumé des seuils d'expositions chroniques au Zn tolérés en eau de mer de différents pays.	9
3.1	Zinc concentrations (mean $\pm$ standard deviation in $\mu\text{g L}^{-1}$ and μM) in seawater during the experiments.	82
3.2	Predation behavior efficiency in control and Z3-exposed conditions. N correspond to the number of feeding behavior observations made on 10 juvenile cuttlefish batches.	84
3.3	ACP activity (% of control) measured during Zn-exposures (expressed as mean $\pm$ SD (n)). * and *** indicate significant ACP activity differences between control and respective Zn concentrations for $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively.	85
3.4	Cathepsin activity (% of control) measured during Zn-exposures (expressed as mean $\pm$ SD (n)). *, ** and *** indicate significant cathepsin activity differences between control and respective Zn concentrations for $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.	85
3.5	Trypsin activity (% of control) measured during Zn-exposures (expressed as mean $\pm$ SD (n)). * indicates significant trypsin activity differences between control and respective Zn concentrations for $p < 0.05$	86
3.6	Total PO-like activity (% of control) measured during Zn-exposures (expressed as mean $\pm$ SD (n)). * and ** indicate significant PO-like activity differences between control and respective Zn concentrations for $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.	86
4.1	Total trace element concentration (mean $\pm$ SD ; $\mu\text{g g}^{-1}$ dw) in whole juvenile <i>Sepia officinalis</i> during its two first months of life.	108

4.2	Soluble metal proportions ($\% \pm \text{SD}$) in whole <i>Sepia officinalis</i> during its two first months of life.	110
4.3	Positive correlations between soluble concentrations of trace elements and metallothioneins measured in control juvenile cuttlefish between 2- and 8-week post-hatching. Upright and italic scripts correspond to Pearson and Spearman correlations, respectively. Underlined : $p\text{-value} < 0.001$; other : $p\text{-value} < 0.05$	111
4.4	Positive correlations between insoluble concentrations of trace elements measured in control juvenile cuttlefish between 2- and 8-week post-hatching. Upright and italic scripts correspond to Pearson and Spearman correlations, respectively. Underlined : $p\text{-value} < 0.001$; other : $p\text{-value} < 0.05$	111
4.5	Zinc concentrations (mean $\pm \text{SD}$ in $\mu\text{g L}^{-1}$ and μM) in seawater during the experiment	113
4.6	Trace metal concentrations (mean $\pm \text{SD}$ in $\mu\text{g g}^{-1}$ dw) in prey (<i>C. crangon</i>) used during this study	113
5.1	Concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ poids sec) en Zn dans les tissus de moule SRM 2976 mesurées (moyenne $\pm \text{SD}$) et certifiées (moyenne $\pm \text{IC}_{95}$).	137
5.2	Concentrations (moyenne $\pm \text{SD}$; $\mu\text{g g}^{-1}$ poids sec) en Zn dans les tissus de <i>N. integer</i> en conditions contrôles (C) et en conditions exposées (E) en fonction du temps au cours de l'exposition 1. Les astérisques indiquent les différences significatives entre les 2 conditions testées à chaque temps d'exposition (* $p < 0.05$).	138
5.3	Concentrations (moyenne $\pm \text{SD}$; $\mu\text{g g}^{-1}$ poids sec) en Zn dans les tissus de <i>N. integer</i> en conditions contrôles (C) et en conditions exposées (E) en fonction du temps au cours de l'exposition 2. Les astérisques indiquent les différences significatives entre les 2 conditions testées à chaque temps d'exposition (* $p < 0.05$).	139
6.1	Reported circulant hemocyte concentrations (mean $\pm \text{SD}$ and range $\times 10^6$ cell mL^{-1}) in cephalopod, gastropod and bivalve mollusks.	157

6.2	Specific activity repartition in hemolymph compartments : hemocyte (10×10^6 cell mL^{-1}) and plasma. Asterisk (*) indicates significance between PO- and APO-like activities in each compartment ($p < 0.05$).	163
8.1	Récapitulatif des effets du Zn sur les différents marqueurs utilisés pour des analyses sur animal entier et sur glande digestive en fonction du temps d'exposition. Légende : gras indique les concentrations induisant la mortalité; bleu et + signifie que le paramètre est augmenté vis-à-vis du contrôle; rose et - signifie que le paramètre est diminué vis-à-vis du contrôle. Les zones grisées indiquent que le marqueur n'a pas été testé à cette période.	185

Table des figures

1.1	Les différents partenaires du programme CHRONEXPO, leurs modèles, et les contaminants étudiés.	5
1.2	Classification des mollusques, d'après Lecointre et Le Guyader (2001).	11
1.3	Aire de distribution de <i>Sepia officinalis</i> . Les fortes abondances sont représentées en gris et les faibles abondances sont représentées en pointillés, d'après Gras (2013).	13
1.4	Le cycle de vie de <i>Sepia officinalis</i> en Manche, les périodes d'exploitation, et les principaux outils de pêche utilisés, modifié d'après Bloor <i>et al.</i> (2013). . .	14
1.5	Photographie d'une reproduction de seiche commune. A gauche, le mâle, à droite, la femelle.	16
1.6	Le système digestif de <i>Sepia officinalis</i> . En légende, le trajet du bol alimentaire, des enzymes excrétées, ainsi que celui du bol alimentaire vers les organes d'assimilation ; les principaux sites où ont lieu les digestion intra- et extracellulaire, modifié d'après Mangold et Bidder (1989b).	17

1.7	Photographies de coupes histologiques transversales de glande digestive de <i>Sepia officinalis</i> . (A) Tubule digestif montrant la disposition des cellules digestives (dc) et des cellules basales (bc) autour de la lumière du tubule. Noter la présence de concrétions bleues dans le cytoplasme des cellules basales correspondant à des granules insolubles riches en éléments traces, appelés "sphérules". it : tissu intertubulaire ; bl : lysosomes érythrophiles voués à l'excrétion pour la digestion extracellulaire ; yb : lysosomes impliqués dans la digestion intracellulaire. Coloration à l'hématoxiline et à l'éosine. (B) Détail des cellules digestives présentant un système lysosomal très développé dont certains lysosomes sont en cours d'excrétion (eb). L'encart présente un corps brun qui correspond aux corps solides endocytés par la cellule digestive et non digérés. Ces composés sont stockés dans de larges vésicules avant d'être excrétés dans la lumière du tubule. La flèche indique un phagosome ayant fusionné avec un lysosome dans la cadre de la digestion intracellulaire, étape précédant la formation du corps brun. Coloration tétrachromique. Echelles : 25 μ m, modifié d'après Costa <i>et al.</i> (2014).	20
1.8	Le système circulatoire de <i>Sepia officinalis</i> et ses principaux organes et vaisseaux, modifié d'après Schipp (1987a). En noir, le système artériel ; en gris, le système veineux.	22
1.9	Les principales formes de lectines caractérisées chez les mollusques bivalves, modifié d'après Soudant <i>et al.</i> (2013).	25
1.10	Représentation en trois dimensions d'une Hcy de mollusque et détail de sa structure. Représentation de l'organisation de la sous-unité de <i>S. officinalis</i> , d'une unité fonctionnelle, et du site actif d'une unité fonctionnelle, modifiée d'après Coates et Nairn (2014).	27
1.11	Bilan simplifié des voies mises en place chez un invertébré lors d'une infection, modifié d'après Amparyup <i>et al.</i> (2013).	30
1.12	Etapes de la phagocytose et de l'encapsulation, et principaux rôles assurés par les médiateurs humoraux au cours de ces étapes, modifié d'après Soudant <i>et al.</i> (2013).	33

1.13	Représentation en trois dimensions d'une métallothionéine avec ses deux domaines (α et β) liant les éléments traces grâce aux groupements thiols des cystéines la composant, modifiée d'après Romero-Isart et Vašák (2002). . . .	37
1.14	Réaction catalysée par la glutathion S-transférase.	39
1.15	Réactions catalysées par la superoxyde dismutase et la catalase.	39
2.1	Internal anatomy of cuttlefish <i>Sepia officinalis</i> , with studied tissues. BH : branchial hearts, BHA : branchial heart appendages, SH : systemic heart, DG : digestive gland, DGA : digestive gland appendages, PSG : posterior salivary glands, Stc : stomach, WB : white bodies (modified after Boyle et Rodhouse, 2005).	52
2.2	PO-like and APO-like activities (U mg prot ⁻¹) in 13 body compartments of cuttlefish <i>Sepia officinalis</i> . BH : branchial hearts, BHA : branchial heart appendages, SH : systemic heart, DG : digestive gland, DGA : digestive gland appendages, PSG : posterior salivary glands, Stc : stomach, WB : white bodies. The bars represent the means ($\pm$ SE) of 10 animals. Subscript letters indicate one-way ANOVA results within each activity group (PO- or APO-like) : bars with same subscript letter are not significantly different ($p < 0.05$). *, ** and ***, indicate significant PO- and APO-like activity differences in each organs for $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.	57
2.3	Lysozyme-like activity (μ g HEW Lysozyme eq. mg prot ⁻¹) in 13 body compartments of cuttlefish <i>Sepia officinalis</i> . BH : branchial hearts, BHA : branchial heart appendages, SH : systemic heart, DG : digestive gland, DGA : digestive gland appendages, PSG : posterior salivary glands, Stc : stomach, WB : white bodies. The bars represent the means ($\pm$ SE) of 10 animals. Bars with same subscript letter are not significantly different ($p < 0.05$).	61
2.4	PI activity (TI % μ g prot ⁻¹) in 13 body compartments of cuttlefish <i>Sepia officinalis</i> . BH : branchial hearts, BHA : branchial heart appendages, SH : systemic heart, DG : digestive gland, DGA : digestive gland appendages, PSG : posterior salivary glands, Stc : stomach, WB : white bodies. The bars represent the means ($\pm$ SE) of 10 animals. Bars with same subscript letter are not significantly different ($p < 0.05$).	64

3.1	Side view of the experimental system and top view of a compartmentalized sieve allowing individual follow-up of juvenile cuttlefish. Black arrows indicate the circulating direction of water renewal and grey arrow indicates water pump mixing direction inverted on the other side tank.	77
3.2	Survival probability function of Zn exposure-time at all concentration tested. Only concentrations which induced survival probability decrease are presented here. Z1 to Z3 survival probabilities were similar to control ($n = 40$ per condition).	83
3.3	Growth in weight (A) and mantle length (B) during 5-week post-hatching in control, Z1, Z2 and Z3 conditions. Results are represented as mean $\pm$ SD ($n = 16$ per condition for each exposure time). The exponential curves were adjusted to the average weights and mantle lengths of control.	87
4.1	Side view of the experimental system and top view of a compartmentalized sieve allowing individual follow-up of juvenile cuttlefish. Black arrows indicate the circulating direction of water renewal and grey arrow indicates water pump mixing direction inverted on the other side tank.	101
4.2	Evolution of metallothionein concentrations (mean $\pm$ SD; $\mu\text{g g}^{-1}$ dw) in juvenile cuttlefish and associated weight (mean $\pm$ SD; g) during the 2 months post-hatching.	112
4.3	Total inner Zn concentrations (mean $\pm$ SD; $\mu\text{g g}^{-1}$ dw) in juvenile cuttlefish reared in control and in 2 Zn concentrations (Z1, Z2). Asterisks correspond to significant differences compared to control (* <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001). . .	114
4.4	Total inner Mn concentrations (mean $\pm$ SD; $\mu\text{g g}^{-1}$ dw) in juvenile cuttlefish reared in control and in two Zn concentrations (Z1, Z2). Asterisks correspond to significant differences between y-intercept compared to control (** <0.01 , *** <0.001).	115
4.5	Soluble Ag, Cd, Cu and Zn proportions (mean $\pm$ SD; %) in juvenile cuttlefish reared in control and in 2 Zn concentrations (Z1, Z2). Asterisks correspond to significant differences at each time compared to control (* <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001).	116

4.6	Evolution of metallothionein concentrations (mean $\pm$ SD ; $\mu\text{g g}^{-1}$ dw) in juvenile cuttlefish reared in control and in 2 Zn concentrations (Z1, Z2) during 6 week post-hatching. Asterisks correspond to significant differences of metallothionein evolution compared to control (i.e. different slopes; $** < 0.01$).	117
4.7	Glutathione S-transferase, superoxide dismutase and catalase activities (mean $\pm$ SD ; respectively in $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ prot, U mg^{-1} prot, and U mg^{-1} prot) in the digestive gland of juvenile cuttlefish in control, Z1 and Z2 conditions after 4-week post-hatching and in control and Z1 conditions after 6- and 8-week post-hatching. Letter above control indicates its evolution, and asterisks above Z1 or Z2 correspond to significant differences of activity compared to control ($* < 0.05$, $** < 0.01$).	118
4.8	Lipid peroxidation (mean $\pm$ SD ; nmol MDA g^{-1} prot) in the digestive gland of juvenile cuttlefish in control, Z1 and Z2 conditions after 4-week post-hatching and in control and Z1 conditions after 6- and 8-week post-hatching. Letter above control indicates its evolution, and asterisks above Z1 correspond to significant differences of activity compared to control ($* < 0.05$).	118
5.1	Caractéristiques anatomiques d'une femelle Mysidacé en vue latérale, modifié d'après Tattersall et Tattersall (1951).	127
5.2	Principales caractéristiques anatomiques (A) de la femelle (marsupium) et (B) du mâle (la flèche indique l'allongement du quatrième paire de pléopodes) <i>N. integer</i> , modifié d'après Tattersall et Tattersall (1951).	129
5.3	Structure expérimentale d'élevage de <i>N. integer</i>	131
5.4	Courbe de mortalité (%) d'une population d'environ 300 adultes de <i>N. integer</i> suivie sur une période de 3 mois.	133
5.5	Représentation d'une structure adaptée à l'élevage de <i>N. integer</i> à des fins expérimentales, modifiée d'après Domingues <i>et al.</i> (1999).	134
6.1	Freshly adhesive <i>Sepia officinalis</i> hemocytes presenting refringent (arrowhead) and non-refringent (arrow) granules. Inset : hemocytes completely spread . .	159

6.2	Stained <i>S. officinalis</i> freshly adhesive hemocytes; (A) Wright staining highlighting large nucleus (n), slightly basophilic cytoplasm, acidophilic granules (arrow) and lucent granules (arrowhead) in spread hemocytes; (B) Neutral red uptake staining of two hemocytes highlighting lysosomal system.	159
6.3	Electron micrographs of <i>S. officinalis</i> circulating hemocytes. (A) Scanning electron micrograph of several hemocytes showing similar aspect; (B) Scanning electron micrograph of one hemocyte producing many pseudopodia; (C) Transmission electron micrograph of circulating hemocytes presenting characteristic lobate-nucleus (N) with highly condensed chromatin along the inner surface of the nuclear membrane, well-developed rough endoplasmic reticulum (rER), electron-dense lysosomal vesicles (arrow) and electron-lucent vesicles (arrowhead). Bar : 1 μm . Inset : high magnification of mitochondria (m) and Golgi apparatus (G). Bar : 0.1 μm	161
6.4	Electron micrographs of <i>S. officinalis</i> circulating hemocytes. (D) Transmission electron micrograph of circulating hemocytes presenting numerous vesicles; electron-dense lysosomal granules (arrow) and electron-lucent vesicles (arrowhead). Bar : 0.5 μm . (E-F) Electron-lucent vesicles showing inner hemocyanin-like molecules (small arrow). Bars : 100 nm.	162
6.5	Flow cytometer bivariate plots showing distributions of particle size (FSC) vs internal complexity (SSC) of fresh Hcs of <i>S. officinalis</i> . Insets representing histogram of both variables. (A) Typical cuttlefish dot-plot; (B) Dot-plot showing wide internal complexity (SSC) distribution sometimes observed. . .	164
6.6	Graphs representing evolution of phagocytic parameters function of time (30, 60, 120 and 180 min) at three temperatures (4, 15 and 25°C) ($N = 5$); (A) Phagocytic hemocyte percentages and (B) engulfed bead number.	165
6.7	Transmission electron micrographs of <i>S. officinalis</i> hemocyte. (A) Phagocytic hemocyte presenting several engulfed 1 μm latex beads (b). Bar : 1 μm . Sequential events of the internalization of beads (B-D); (B) hemocyte-bead adhesion. Bar : 0.1 μm ; (C) bead engulfment. Bar : 0.2 μm ; and (D) fusion between phagosomal and lysosomal compartments. Bar : 0.5 μm	166

6.8	Graph representing phagocytic hemocyte percentage and mean engulfed bead number of <i>S. officinalis</i> hemocytes ($N \geq 4$; 2h incubation at 15°C) function of plasma concentration (%) treatments. Statistically significant differences were made against control (0% plasma concentration) at each plasma concentration for phagocytic cell percentage (°) and engulfed bead number (*); * and ° $p < 0.05$; ** $p < 0.01$	167
6.9	Transmission electron micrographs of 1 μm latex beads (b). (A) One bead after incubation in medium without plasma add; (B) One bead after incubation in plasma presenting important coating by hemocyanin-like molecules (arrow). Bars : 100 nm. (C) Apparent hemocyanin-like molecule implication in bead aggregation (arrow). Bar : 200 nm.	169
7.1	Evolution de la viabilité (moyenne $\pm$ SD; %) des hémocytes de <i>S. officinalis</i> maintenus dans 3 media de culture (L-15, DMEM et Hank's) à 15°C (A) et 17°C (B).	176
7.2	Effet de 24h d'exposition des hémocytes de <i>S. officinalis</i> à différentes concentrations métalliques sur la capacité de phagocytose (moyenne $\pm$ SD; %); (A) exposition au Cd; (B) exposition au Zn. Les astérisques indiquent les différences avec la valeur contrôle de 100 % (pointillés); * $p < 0.05$	178
7.3	Effet de 24h d'exposition des hémocytes de <i>S. officinalis</i> à différentes concentrations en Cd sur la production de ROS (moyenne $\pm$ SD; %). Les astérisques indiquent les différences avec la valeur contrôle de 100 % (pointillés); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$	179
8.1	Schéma bilan représentant les principales conséquences d'une exposition au Zn dissous du juvénile de <i>S. officinalis</i> . Les points d'interrogation indiquent les principales questions émergeant de nos conclusions.	189

Table des matières

I	Introduction	1
1	Introduction	3
1.1	Contexte et présentation du projet CHRONEXPO	3
1.1.1	Contexte scientifique	3
1.1.2	Présentation du projet CHRONEXPO	4
1.2	Le zinc	6
1.2.1	Généralités	6
1.2.2	Principales fonctions	6
1.2.3	Toxicité et réglementation en milieu aquatique	7
1.3	Le modèle biologique : la seiche commune	
	<i>Sepia officinalis</i>	11
1.3.1	Généralités	11
1.3.2	Le système digestif de <i>Sepia officinalis</i>	16
1.3.3	Le système circulatoire et l'immunité des céphalopodes	21
1.3.4	Rappel des connaissances concernant l'écotoxicologie des éléments traces chez la seiche	34
1.4	Objectifs de l'étude et organisation du manuscrit	41
II	Distribution du système prophénoloxydase, des lysozymes et des inhibiteurs de protéases dans les tissus de la seiche commune <i>Sepia officinalis</i>	43
2	Prophenoloxidase system, lysozyme and protease inhibitor distribution in the common cuttlefish <i>Sepia officinalis</i>	47

2.1	Introduction	49
2.2	Material and methods	51
2.2.1	Animals and tissue samples	51
2.2.2	Chemicals	52
2.2.3	Enzyme extraction	53
2.2.4	Biochemical analysis	53
2.2.5	Statistical analysis	55
2.3	Results and discussion	56
2.3.1	APO- and PO-like activity distribution and potential functions	56
2.3.2	Lysozyme distribution	60
2.3.3	PI distribution	62

III Etude des effets d'expositions prolongées au zinc sur la physiologie du stade juvénile de la seiche commune *Sepia officinalis* au cours de sa vie côtière 67

3	Physiological perturbations in juvenile cuttlefish <i>Sepia officinalis</i> induced by subchronic exposure to dissolved Zn	71
3.1	Introduction	73
3.2	Materials and methods	75
3.2.1	Animals	75
3.2.2	Experimental design	76
3.2.3	Predatory behavior study	78
3.2.4	Enzymatic assays	79
3.2.5	Chemicals	81
3.2.6	Statistical analysis	81
3.3	Results	81
3.3.1	Zn measurements in seawater	81
3.3.2	Mortality	83
3.3.3	Predation behavior	84
3.3.4	Enzymatic responses to Zn exposure in juvenile	84
3.3.5	Zn exposure impacts on juvenile cuttlefish growth	87

3.4	Discussion	88
3.4.1	Mortality	88
3.4.2	Predatory behavior impairment	89
3.4.3	Digestive system perturbations	89
3.4.4	Immune system perturbations	91
3.4.5	Growth loss induced by Zn exposures	92
3.5	Conclusions	93
4	Metal homeostasis in the juvenile cuttlefish <i>Sepia officinalis</i> and consequences of dissolved zinc exposure	95
4.1	Introduction	97
4.2	Materials and methods	99
4.2.1	Animals	99
4.2.2	Experimental design	100
4.2.3	Subcellular fractionation and MT determination	102
4.2.4	Trace element analysis in respective soluble and insoluble fractions . .	103
4.2.5	Biochemical analysis	104
4.2.6	Statistical analysis	105
4.3	Results	107
4.3.1	Trace metal homeostasis in juvenile cuttlefish	107
4.3.2	Zn exposures	113
4.4	Discussion	119
4.4.1	Metal homeostasis in juvenile cuttlefish	119
4.4.2	Zn exposures	121
5	Essais et limites d'une contamination trophique	125
5.1	Choix de la proie	126
5.2	Description de l'espèce choisie	128
5.3	Description du système d'élevage	130
5.3.1	Structure d'élevage	130
5.3.2	Conditions d'élevage	132
5.3.3	Suivis	132

5.3.4	Bilan concernant l'élevage de <i>N. integer</i>	135
5.4	Contamination au Zn de <i>Neomysis integer</i>	136
5.4.1	Résultats et discussion	138
5.4.2	Bilan et perspectives	140

IV Caractérisation des hémocytes de *Sepia officinalis* et développement de leur culture primaire dans le but de réaliser des tests de toxicité *in vitro* 141

6 Hemocyte morphology and phagocytic activity in the common cuttlefish (*Sepia officinalis*) 145

6.1	Introduction	147
6.2	Material and methods	148
6.2.1	Animals	148
6.2.2	Hemolymph collection	148
6.2.3	Chemicals	149
6.2.4	Morphological characterization of <i>S. officinalis</i> Hcs	149
6.2.5	Biochemical analysis	151
6.2.6	Flow cytometry (FCM) analysis	153
6.2.7	Data analysis	155
6.3	Results and Discussion	158
6.3.1	Hc viability and concentration	158
6.3.2	Hc identification and characterization	158
6.3.3	Enzymatic assays	162
6.3.4	FCM analysis	163
6.4	Conclusions	170

7 Développement et utilisation des hémocytes de seiche en conditions *in vitro* pour des études en écotoxicologie 171

7.1	Introduction	172
7.2	Matériels et méthodes	173
7.2.1	Prélèvement d'hémolymphe et mise en culture	173

7.2.2	Effet des paramètres de culture sur la viabilité	173
7.2.3	Effet des paramètres de culture sur la viabilité	174
7.2.4	Analyse des données	175
7.3	Résultats et discussion	176
7.3.1	Effet du milieu de culture et de la température	176
7.3.2	Effet du Cd et du Zn sur la phagocytose et la production de ROS . .	177
V	Conclusion générale - perspectives	181
8	Conclusion générale - perspectives	183
8.1	Effets du Zn sur le stade juvénile de <i>S. officinalis</i>	184
8.2	Caractérisation des hémocytes de <i>S. officinalis</i> et développement de leur culture primaire	191
	Références bibliographiques	195
	ANNEXES	241

Première partie

Introduction

Chapitre 1

Introduction

1.1 Contexte et présentation du projet CHRONEXPO

1.1.1 Contexte scientifique

Les céphalopodes font l'objet d'une activité de pêche depuis l'Antiquité. Cependant, le développement d'une pêche ciblée a été seulement initiée au Japon dans les années 1960 et s'est rapidement étendue à l'ensemble du globe. La stagnation des débarquements de poissons depuis le début des années 1990 a également incité les pêcheurs à se tourner vers cette ressource de second plan qui est passée de 0,5 million de tonnes débarquées en 1958 à plus de 4 millions en 2008, et représente à présent près de 4 % des débarquements mondiaux pour une valeur d'environ 5 milliards de dollars chaque année (Jereb *et al.*, 2005). Dans les eaux européennes, les débarquements de céphalopodes dépassent régulièrement les 100 000 tonnes annuelles (statistiques FAO) avec comme principaux consommateurs les pays méditerranéens (Espagne, Italie, Grèce, Portugal), et la France. Afin de mettre en place une gestion rationnelle de cette ressource et en raison de traits d'histoire de vie sensiblement différents des poissons, un certain nombre de travaux ont été menés dans le but d'améliorer les connaissances relatives aux populations de céphalopodes (Pierce et Guerra, 1994; Royer, 2002; Royer *et al.*, 2006; Gras, 2013). Ces études ont cherché à décrire des paramètres fondamentaux de dynamique de populations tels que les habitats nécessaires à la reproduction, la contribution de différentes aires de ponte au recrutement du stock exploité, et les effets de facteurs biotiques et abiotiques sur la croissance et la survie des juvéniles (Challier, 2005; Gras, 2013;

Bloor *et al.*, 2013).

En Europe, la seiche commune *Sepia officinalis* est l'une des premières ressources de céphalopodes en termes d'exploitation et d'importance économique (Denis et Robin, 2001; Pierce *et al.*, 2010). La Manche est la principale zone de pêche de cette espèce et la France le pays exploitant majoritairement ce stock avec environ 10 000 tonnes débarquées chaque année (Dunn, 1999; Royer *et al.*, 2006; Bloor *et al.*, 2013). En raison d'un cycle de vie court et d'un taux de croissance fortement lié à la température du milieu ainsi qu'à la disponibilité en nourriture, la seiche commune (comme la plupart des céphalopodes) présente une variabilité inter-annuelle d'abondance importante (Pierce *et al.*, 2008; Rocha et Guerra, 1999; Jackson et Moltschaniwskyj, 2002; Royer *et al.*, 2006). Ce cycle de vie, d'une durée de 2 ans en Manche (Boucaud-Camou et Boismery, 1991), est caractérisé par des migrations printanières liées à la reproduction, du large vers la côte, soit d'un point de vue écotoxicologique, entre un milieu présumé peu contaminé et une zone plus fortement soumise aux activités anthropiques (Lacoue-Labarthe, 2007). Ainsi, la ponte, l'intégralité du développement embryonnaire et les premières étapes du développement des juvéniles ayant lieu près des côtes, la question de l'influence des contaminants sur ces étapes/stades de vie s'est posée (Bloor *et al.*, 2013; Boucaud-Camou et Boismery, 1991). La cinétique d'accumulation et l'influence des métaux sur le développement embryonnaire de la seiche ayant été précédemment étudiées (Lacoue-Labarthe, 2007), la sensibilité du stade juvénile vis-à-vis de la pollution ainsi que les modifications physiologiques potentiellement induites restaient à explorer. Cette étape particulièrement importante dans la vie de l'animal, d'une durée de 1 à 2 mois, conditionne sa taille et son état physiologique avant une migration automnale au large. Ce travail de thèse s'est inscrit dans le cadre du programme européen CHRONEXPO.

1.1.2 Présentation du projet CHRONEXPO

Dans un contexte européen d'échange de compétences et de connaissances scientifiques entre la France et le Royaume-Uni, le projet CHRONEXPO INTERREG IV-A a été mis en place afin d'étudier l'impact de divers polluants d'origine anthropique retrouvés en Manche sur les stades juvéniles de divers organismes marins d'intérêt. L'un des principaux objectifs de ce projet était de réaliser des expositions aux contaminants dans des conditions réalistes,

c'est-à-dire à des concentrations proches de celles retrouvées dans le milieu naturel et sur une durée cohérente avec les temps pendant lesquels les organismes sont exposés dans la nature. Ce projet regroupait cinq partenaires en France et au Royaume-Uni : l'université de Caen, l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) de Cherbourg, les universités de Plymouth et Portsmouth, et le Centre des Sciences de l'Environnement, de la Pêche et de l'Aquaculture (Cefas) de Weymouth. Au sein de ces structures, l'impact de contaminants de natures diverses (métaux, radionucléides, pesticides) sur différentes espèces d'invertébrés marins d'intérêt économique et/ou écologique a été étudié (Fig. 1.1).



FIGURE 1.1 – Les différents partenaires du programme CHRONEXPO, leurs modèles, et les contaminants étudiés.

Le zinc (Zn) a été désigné en début de programme comme contaminant à étudier par chacun des acteurs. Ainsi, nous avons choisi d'analyser uniquement l'effet de cet élément sur les juvéniles de seiche, mais de travailler sur un grand nombre de biomarqueurs potentiels.

1.2 Le zinc

1.2.1 Généralités

Le Zn est un élément trace métallique de numéro atomique 30 et de masse molaire 65,38 g mol⁻¹. Comme tout élément trace métallique, c'est un bon conducteur de chaleur et d'électricité qui présente sous forme solide une malléabilité utilisée depuis l'Antiquité pour la réalisation d'alliages (e.g. laiton, bronze). C'est le 27^{ème} élément le plus abondant de la croûte terrestre où il est principalement trouvé sous forme de sphalérite (ZnS, ou blende). Il est par conséquent naturellement présent dans le sol, l'air et l'eau de notre planète.

Dans l'eau de mer, les ions dissous des éléments traces sont répartis entre les ions libres et ceux formant des complexes avec différents ligands, organiques ou inorganiques. Les ions libres (i.e. hydratés) sont couramment considérés comme étant la forme dissoute disponible pour être accumulée, autrement appelée la fraction biodisponible (Rainbow, 1995; Rainbow *et al.*, 1993). Cette biodisponibilité varie en fonction de l'élément étudié, mais aussi en fonction de paramètres tels que le pH, la salinité et la concentration en matière organique dissoute (MOD) (Rainbow, 1995; Hogstrand, 2012). En absence de cette dernière (i.e. MOD), le Zn sous sa forme hydratée (i.e. Zn(OH)₂) est la forme de Zn dissous majoritairement présente en eau de mer (i.e. à une salinité > 30 psu et un pH > 8), ce qui le rend particulièrement biodisponible pour les organismes marins (Hogstrand, 2012; Rainbow, 1995).

1.2.2 Principales fonctions

Le Zn est essentiel pour la croissance, le développement et la différenciation des micro-organismes, des plantes et des animaux (Vallee, 1986). Cet élément, impliqué donc dans de nombreuses fonctions biologiques, est la plupart du temps associé à des protéines. A ce jour, plus de 300 métalloenzymes à Zn ont été décrites, appartenant aux six classes d'enzymes : oxydo-réductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases et ligases. Dans la majorité des cas, l'ion Zn²⁺ est un cofacteur indispensable au bon fonctionnement de ces métalloenzymes. Il peut jouer un rôle catalytique (e.g. anhydrases carboniques, carboxypeptidases, phosphatases alcalines), co-catalytique (e.g. phospholipase C, nucléase P1, leucyl-aminopeptidase) ou structurel (e.g. aspartate carbamoyltransferase, doigts de zinc).

Les éléments traces peuvent être classés en fonction de leur affinité de liaison à certains

ions/ligands pour former un complexe. Ainsi, les éléments traces de classe A (e.g. Ca^{2+} , Mg^{2+}) vont préférentiellement se lier à l'atome d'oxygène, puis à l'azote, et présenteront une affinité moins importante pour le soufre. Les éléments traces de classe B (e.g. Ag^+ , Hg^{2+}) ont une affinité inverse pour ces trois éléments (i.e. $\text{S} > \text{N} > \text{O}$), tandis que les éléments traces de transition (e.g. Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) sont ambivalents et se lient indifféremment à l'un ou l'autre de ces atomes (Nieboer et Richardson, 1980). Ces propriétés chimiques des éléments traces jouent un rôle fondamental dans leur répartition à l'intérieur de l'organisme et permettent de mieux appréhender les processus de détoxification mis en place pour les réguler. En tant qu'élément trace de transition, les sites de liaison coordonnant le Zn au sein des protéines peuvent être l'azote de l'histidine, l'oxygène de l'aspartate ou du glutamate, et le soufre de la cystéine (la liaison à l'histidine étant la plus couramment observée, suivie de la liaison à la cystéine; McCall *et al.*, 2000).

Contrairement aux autres éléments traces de transition de la première ligne du tableau périodique (i.e. Cr^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}), l'ion Zn^{2+} a son orbitale d pleine (d^{10}). C'est par conséquent un ion stable, qui fonctionne comme un acide de Lewis acceptant les électrons par paire, ce qui en fait un cofacteur idéal des réactions qui demandent un ion stable en tant que catalyseur. Il a été montré que cette propriété de liaison rend le Zn nécessaire à la réalisation de processus fondamentaux tels que la synthèse d'ADN et d'ARN, la division cellulaire et le bon fonctionnement du système immunitaire. Il intervient également dans la structure et le fonctionnement des membranes (Ploysangam *et al.*, 1997; Shankar et Prasad, 1998; Dempsey, 2013; Bettger et O'Dell, 1981). Par ailleurs, le Zn exerce de façon indirecte une protection antioxydante, d'une part en induisant la synthèse de composés réducteurs comme les métallothionéines (MTs), d'autre part en tant que composant d'enzymes de régulation du stress oxydatif comme la superoxyde dismutase (SOD), et enfin en inhibant ou limitant l'activité de producteurs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme la NADPH oxydase et certains ions métalliques (i.e. Fe^{2+} , Cu^{2+}) (O'Dell, 2000; Bray et Bettger, 1990; Cai *et al.*, 1999).

1.2.3 Toxicité et réglementation en milieu aquatique

Les activités anthropiques contribuent à enrichir le milieu naturel en Zn. En France, malgré la fermeture des dernières mines d'extraction au début des années 1990, de nombreuses

sources de rejet de cet élément persistent. En 2010, les secteurs industriels principalement concernés étaient la sidérurgie, la métallurgie et le coke (variété de charbon) qui émettent un peu plus de 700 tonnes de Zn (et ses composés) par an, dont environ 50 % dans les sols, 30 % dans les eaux et 20 % dans l’atmosphère. Bien que moins importants, les rejets d’origines urbaines (e.g. trafic routier, incinération d’ordures) et agricoles (alimentation porcine, engrais) restent significatifs (IREP, 2010). Des analyses en milieu aquatique montrent que le Zn fait partie des composés toujours détectés et présents à des concentrations supérieures à $10 \mu\text{g L}^{-1}$ en entrée et en sortie de stations d’épuration (INERIS, 2010). Mis à part ces rejets, le Zn est introduit directement en milieu marin par la dissolution d’anodes sacrificielles et par certaines peintures antisalissures, qui visent à prévenir la corrosion (Alzieu *et al.*, 1999; Mottin *et al.*, 2012). Cet élément trace est mesuré à des concentrations importantes dans le milieu marin, pouvant dépasser le milligramme dans certains cas extrêmes (Amado Filho *et al.*, 1997; Liu et Wang, 2013; Srinivasa Reddy *et al.*, 2005). En Manche, il est souvent retrouvé sous forme dissoute à des concentrations proches de la dizaine de microgrammes, ce qui en fait l’un des éléments dissous les plus concentrés de cette masse d’eau (Lachambre et Fisson, 2007c; Sheahan *et al.*, 2007).

Comme tous les éléments traces essentiels, le Zn présent en trop grande quantité induit des effets délétères à des seuils différents en fonction des organismes. En milieu aquatique, la plupart des études décrivant les mécanismes de toxicité induits par le Zn ont été réalisées sur des poissons d’eau douce. Elles ont mis en évidence que la cause première d’intoxication associée à cet élément était liée à une perturbation de l’homéostasie du calcium. En effet, les ions Zn^{2+} sont capables d’imiter les ions Ca^{2+} et d’entrer dans l’organisme en empruntant les canaux calciques des cellules branchiales, ce qui entraîne une hypocalcémie (par inhibition compétitive). En conditions aiguës, ce phénomène se traduit au niveau des branchies, qui sont donc les premiers organes affectés, par des dégradations fonctionnelles et structurelles importantes (e.g. hypersécrétion, hypertrophie, hyperplasie) conduisant à l’asphyxie (Hogstrand, 2012; Hughes et Barritt, 1989; Ballatori, 2002).

En milieu marin, la majorité des LC_{50}s (i.e. concentrations induisant 50 % de mortalité) issues d’études sur des poissons et bivalves marins adultes, exposés 96 h à du Zn, est comprise entre 1 et 10 mg Zn L^{-1} (e.g. Ciji et Bijoy Nandan, 2014; Malik *et al.*, 1998; Spear, 1981; Amiard-Triquet *et al.*, 1986; Chan, 1988; Franco *et al.*, 2006). Bien que plusieurs études en

milieu marin aient mis en évidence des modifications de la vitesse de croissance, du taux de reproduction et du développement larvaire de nombreux invertébrés à des concentrations oscillant entre 50 et 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (King *et al.*, 2006; Hook et Fisher, 2002; Sarabia *et al.*, 2008; Brereton *et al.*, 1973; Martin *et al.*, 1981; Fathallah *et al.*, 2010; Nadella *et al.*, 2013; Tellis *et al.*, 2014; Watling, 1982; Calabrese *et al.*, 1973; Calabrese et Nelson, 1974; Jorge et Moreira, 2005), peu d’entre elles ont décrit l’origine des perturbations observées (Hogstrand, 2012; Tellis *et al.*, 2014). Alors que le Zn ne semble pas affecter différemment les stades de développement des téléostéens, les seuils de toxicité du Zn mesurés chez des invertébrés sont plus élevés pour les stades adultes que pour les stades larvaires (e.g. Tellis *et al.*, 2014; Hogstrand, 2012; Fathallah *et al.*, 2010).

TABLE 1.1 – Résumé des seuils d’expositions chroniques au Zn tolérés en eau de mer de différents pays.

Pays	Concentration en Zn ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Référence
USA	85,6 ¹	USEPA (1987) ²
Australie/Nouvelle-Zélande	15	ANZECC (1992) ³
Chine	100	NEPA (1989) ⁴
UE	$\leq 8,8$	UE (2010) ⁵

En raison des usages importants et variés du Zn par l’homme, la concentration en Zn dissous des zones côtières est régulièrement supérieure au bruit de fond ($\leq 1 \mu\text{g L}^{-1}$). Une NOEC (i.e. concentration sans effet observé sur l’environnement) $\leq 8,8 \mu\text{g L}^{-1}$ pour le domaine maritime de l’Union Européenne a été publiée en 2010. Cependant, à cause de l’insuffisance de données concernant la toxicité de cet élément sur les organismes marins, cette valeur correspond aux études menées en milieu dulçaquicole où le zinc dissous est majoritairement lié à la MOD (European Commission Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection, 2010). En France, depuis 2007 et la mise en œuvre de la Directive Cadre sur l’Eau (DCE), la surveillance des concentrations en Zn dans les eaux côtières n’est pas rendue publique (Ifremer, 2011). A travers le monde, peu de pays ont mis en place un critère de qualité de l’eau de mer concernant cet élément, et ils varient beaucoup d’un pays à l’autre

1. concentration tenant compte de l’exposition par la voie trophique

2. US Environmental Protection Agency (1987)

3. Australia and New Zealand Environment & Conservation Council (1992)

4. National Environmental Protection Agency (1989)

5. European Commission Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection (2010)

(Tableau 1.1).

Les teneurs en Zn mesurées dans les tissus de moules le long des côtes françaises, dans le cadre du réseau de surveillance ROCCH entre 2003 et 2007, mettent en évidence des concentrations deux fois supérieures à la médiane nationale ($107 \mu\text{g g}^{-1}$ poids sec) sur les côtes nord et sud de la Bretagne, ainsi que plus localement dans le sud de la France sur les sites de Capbreton, Port Grimaud et Ajaccio (Ifremer, 2007). Suite au rapport de l'Union Européenne, des valeurs de CL/CE₅₀ de 60 et $190 \mu\text{g Zn L}^{-1}$ ont été proposées pour les invertébrés et les poissons, respectivement, ainsi qu'une concentration sans effet sur les invertébrés et les algues de $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

1.3 Le modèle biologique : la seiche commune

Sepia officinalis

1.3.1 Généralités

1.3.1.1 Classification

La seiche commune *Sepia officinalis* est un organisme métazoaire appartenant à l'embranchement des mollusques, qui sont caractérisés par un tégument spécialisé, le manteau ; une structure buccale chitineuse, dure et dentée, la radula ; et par la forme de peigne de leurs branchies, appelées également cténidies. Cet embranchement, défini par une organisation du corps en trois parties plus ou moins distinctes : le pied, le manteau et la masse viscérale, est constitué de huit classes, dont les céphalopodes (Lecointre et Le Guyader, 2001 ; Fig. 1.2).

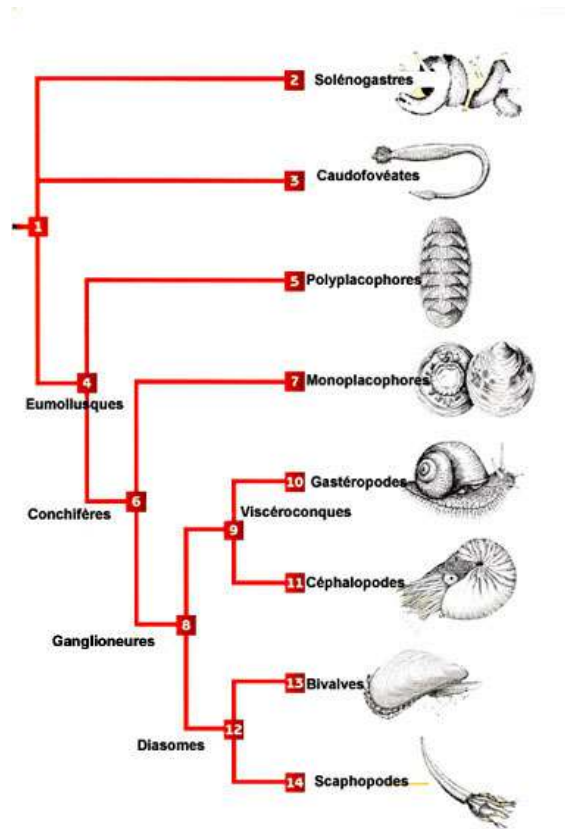


FIGURE 1.2 – Classification des mollusques, d'après Lecointre et Le Guyader (2001).

Cette classe, possédant une tête distincte du corps (caractère commun aux gastéropodes ; Viscéroconques) et très développée, regroupe des organismes exclusivement marins dont la

partie antérieure du pied est modifiée en de multiples tentacules, tandis que la partie postérieure forme un siphon, entonnoir musculeux assurant l'expulsion de l'eau de la cavité palléale. Mis à part cette organisation anatomique particulière, les céphalopodes présentent également de nombreux caractères dérivés, parmi lesquels : un système circulatoire clos, un système nerveux extrêmement centralisé et deux pièces squelettiques mandibulaires en forme de « bec-de-perroquet ». Au sein des céphalopodes, on distingue deux sous-classes :

1. les Nautiloides, regroupant cinq espèces principalement caractérisées par une coquille externe ;
2. les Coleoides, incluant toutes les autres espèces de céphalopodes (environ 700) et ayant pour traits communs une coquille interne (réduite ou perdue pour certains groupes), une paire de branchies, trois cœurs, huit bras ou plus pourvus de ventouses et/ou de crochets, des yeux à lentilles et des cellules de peau pourvues de pigments (les chromatophores) leur permettant de changer de couleur ou de faire apparaître des motifs divers sur leur corps.

Parmi les Coléoides, le super-ordre regroupant toutes les espèces de seiches et de calmars est celui des décapodiformes caractérisé par la présence de dix tentacules : huit bras formant la couronne, et une paire de tentacules plus longs, spécialisée dans la capture de proies rapides et distantes. Les seiches appartiennent à l'ordre des Sepiida et à la famille des Sepiidae. Cette dernière regroupe des animaux possédant une coquille interne de nature calcaire connue sous le nom d'« os de seiche » ou « sépion ».

Position systématique de la seiche commune, *Sepia officinalis* :

Embranchement : Mollusca

Classe : Cephalopoda Cuvier, 1797

Sous-Classe : Coleoidea Bather, 1888

Ordre : Sepiida Zittel, 1895

Famille : Sepiidae Leach, 1817

Genre : *Sepia* Linnaeus, 1758

Espèce : *officinalis* Linnaeus, 1758



1.3.1.2 Aire de répartition et habitat de la seiche commune

L'aire de répartition de *Sepia officinalis* s'étend, sur la façade Atlantique nord-est, du nord de l'Europe (des îles Shetland au sud de la Norvège) aux côtes de l'Afrique du nord-ouest (approximativement à la frontière mauritano-sénégalaise). Elle est également présente sur tout le pourtour Méditerranéen (Reid *et al.*, 2005) (Fig. 1.3). Il a récemment été mis en évidence que tous les individus de la façade Atlantique appartiennent à une seule population génétique (Pérez-Losada *et al.*, 2007), distincte de la population représentée par les individus de Méditerranée (Pérez-Losada *et al.*, 2002).

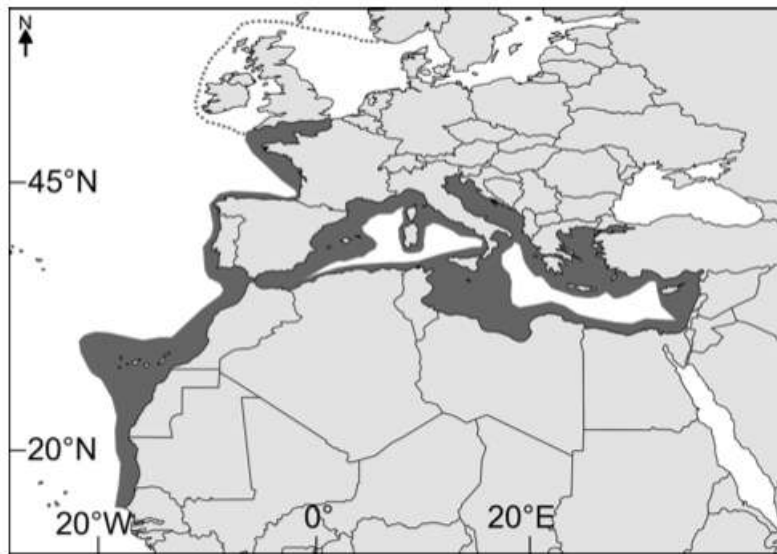


FIGURE 1.3 – Aire de distribution de *Sepia officinalis*. Les fortes abondances sont représentées en gris et les faibles abondances sont représentées en pointillés, d'après Gras (2013).

La seiche commune est une espèce démersale (ou necto-benthique) inféodée au domaine néritique, qui s'étend de la zone de balancement des marées à la limite du plateau continental à environ 200 m de profondeur. Elle occupe généralement des fonds meubles sablo-vaseux dans lesquels elle peut s'enfouir à des fins cryptiques (Mather, 1986). Sa répartition saisonnière sur le littoral européen est fortement corrélée à la température dont les limites d'optimum vont de 9 à 25°C (Boucaud-Camou et Boismery, 1991).

1.3.1.3 Cycle de vie de la seiche

Comme un certain nombre de céphalopodes, la seiche effectue des migrations saisonnières. Ces dernières se font du large vers la côte au printemps, où la seiche profite de l'abondance de

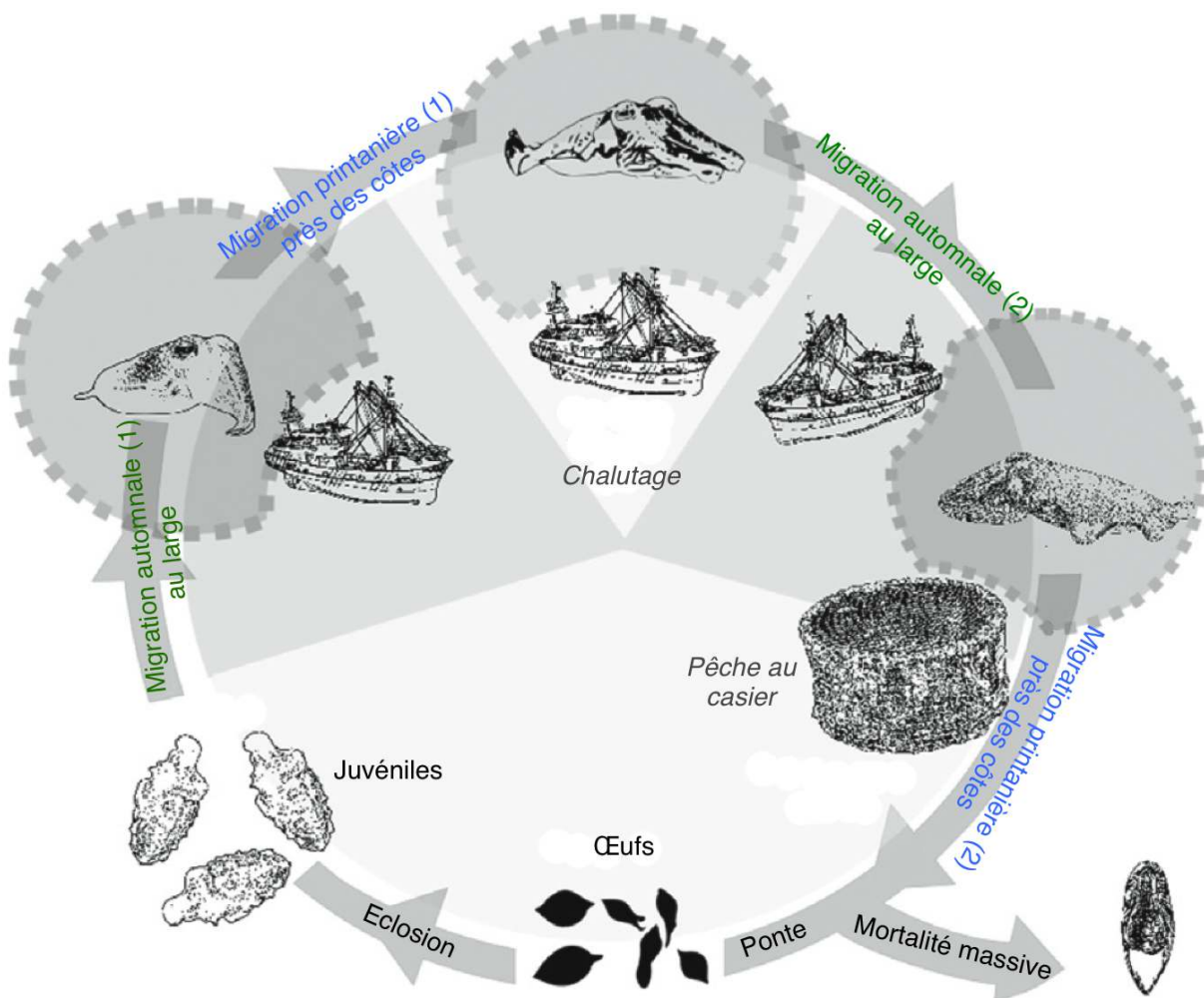


FIGURE 1.4 – Le cycle de vie de *Sepia officinalis* en Manche, les périodes d'exploitation, et les principaux outils de pêche utilisés, modifié d'après Bloor *et al.* (2013).

proies et se reproduit, et de la côte vers le large (à une centaine de mètres de profondeur) à l'automne, où elle bénéficie de températures plus favorables pour passer l'hiver ($\geq 10^{\circ}\text{C}$) (Reid *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2003). L'accouplement, la ponte, le développement embryonnaire, l'éclosion et les premières semaines de vie du juvénile ont donc lieu sur le littoral.

Comme tous les Coléoidés, la seiche est sémelpare et présente une espérance de vie courte (1 à 2 ans), régulée au sein de son aire de répartition principalement par la température. Ce paramètre est celui qui a le plus d'impact sur le cycle de vie des céphalopodes. En effet, il a été montré que la température influence directement le développement des œufs, l'absorption du vitellus, le taux de croissance, la demande alimentaire, et l'espérance de vie des céphalopodes (e.g. Richard, 1971; Forsythe *et al.*, 1994; Vidal *et al.*, 2014). Plus les eaux sont chaudes, plus le métabolisme de l'animal est élevé et sa durée de vie raccourcie. Ainsi, les individus se développant entre les côtes ouest-africaines et le Portugal ont une durée de vie maximale de 1 an (Mangold, 1966; Guerra et Castro, 1988; Coelho et Marthins, 1991), tandis qu'en Manche le cycle de vie décrit jusqu'à présent a une durée exclusive de 2 ans (Boucaud-Camou et Boismery, 1991; Dunn, 1999) (Fig. 1.4). Entre ces deux zones (i.e. des côtes Portugaises au nord du Golfe de Gascogne), la population est partagée entre des individus qui se reproduisent après une ou deux années de vie (Le Goff et Daguzan, 1991; Gauvrit *et al.*, 1997).

La durée de la période de reproduction varie également en fonction de la température moyenne de l'eau. En effet, la reproduction s'observe tout au long de l'année au sud du Portugal (Bakhayoko, 1983; Guerra et Castro, 1988) et en Mer Méditerranée (Mangold, 1966), de mars à août dans le Golfe du Morbihan (Le Goff et Daguzan, 1991), et de mai à septembre en Manche avec un pic d'éclosion en juillet (Boucaud-Camou et Boismery, 1991; Challier *et al.*, 2002).

La seiche est une espèce gonochorique dont la reproduction a lieu dans la position "tête-à-tête" (Fig. 1.5). Le mâle dépose ses spermatophores, à l'aide d'un bras spécialisé (appelé bras hectocotyle), dans la cavité sous-buccale de la femelle, où ils pourront être conservés jusqu'à la ponte. Quelques dizaines à quelques centaines d'œufs volumineux et riches en vitellus, noirs car couverts d'encre, et présentant un diamètre de 8 à 10 mm, seront déposés par grappes, plusieurs femelles pouvant pondre sur une même grappe. Aucun soin n'est apporté aux œufs par la suite.



FIGURE 1.5 – Photographie d’une reproduction de seiche commune. A gauche, le mâle, à droite, la femelle.

Après un développement pouvant durer 30 à 90 jours en fonction de la température, des juvéniles de 7 à 9 mm (longueur de manteau) percent la capsule de l’œuf. Malgré une morphologie semblable à celle de l’adulte, certaines fonctions physiologiques ne sont pas encore pleinement matures. Au cours du premier mois de vie post-éclosion, certaines parties du système nerveux central vont se développer (i.e. les lobes verticaux et subverticaux; Dickel *et al.*, 1997), et les formes majoritairement embryonnaires du pigment respiratoire (i.e. l’hémocyanine (Hcy)) vont évoluer vers les formes adultes (Decleir *et al.*, 1970, 1971; Strobel *et al.*, 2012). A ce jour, la maturation du système digestif est la modification physiologique survenant à cette période la plus décrite (e.g. Boucaud-Camou *et al.*, 1985; Yim et Boucaud-Camou, 1980; Yim, 1978; Martínez *et al.*, 2011).

1.3.2 Le système digestif de *Sepia officinalis*

Les céphalopodes étant en grande majorité des carnivores macrophages, leur mode de nutrition se distingue de celui des autres mollusques. D’une part, les morceaux de proies avalés contiennent très souvent des fragments squelettiques; d’autre part, leur mode de vie très actif nécessite la consommation de grandes quantités de nourriture. Les particularités de la structure et du fonctionnement de l’appareil digestif des céphalopodes découlent de ces caractéristiques (Mangold et Bidder, 1989b).

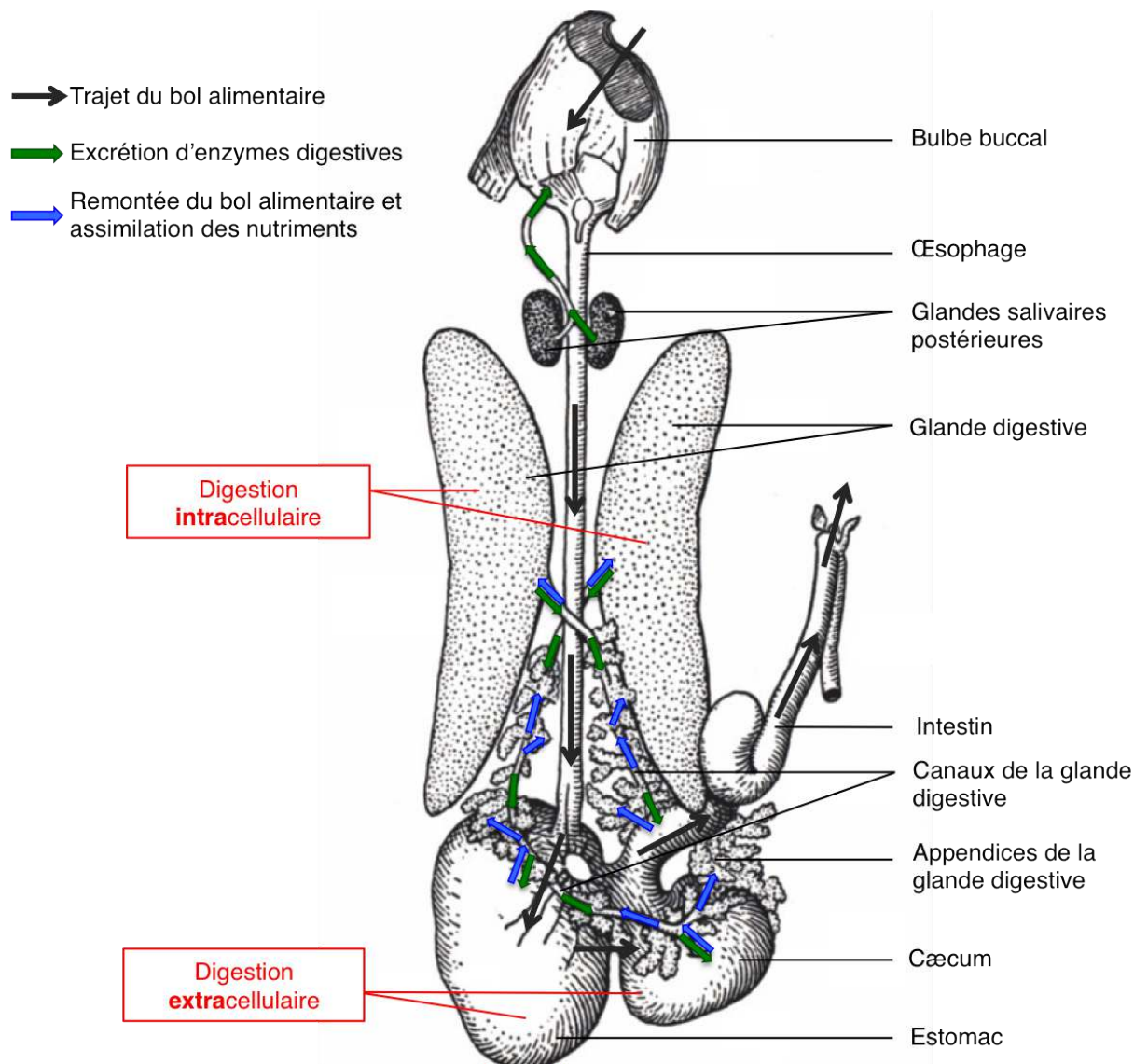


FIGURE 1.6 – Le système digestif de *Sepia officinalis*. En légende, le trajet du bol alimentaire, des enzymes excrétées, ainsi que celui du bol alimentaire vers les organes d'assimilation ; les principaux sites où ont lieu les digestion intra- et extracellulaire, modifié d'après Mangold et Bidder (1989b).

Le système digestif des céphalopodes est en forme de U (Fig. 1.6). Il commence au niveau d'un bulbe buccal situé au centre de la couronne brachiale et est principalement composé de deux puissantes mandibules (renfermant une radula), et de muscles lui conférant une mobilité importante. Les orifices des glandes salivaires antérieures et postérieures débouchent dans la cavité buccale. Bien que les principales fonctions des sécrétions salivaires soient indéniablement l'aide à la consommation de la proie, via des molécules paralysantes et/ou lysant les tissus externes et internes avant l'ingestion, le rôle précis des composés contenus dans les glandes salivaires reste peu connu (Kanda *et al.*, 2003; Nagai, 2012; Ueda *et al.*, 2008; Fry *et al.*, 2009; Undheim *et al.*, 2010; Boucaud-Camou et Boucher-Rodoni, 1983).

La cavité buccale est prolongée par l'œsophage qui permet d'amener le bol alimentaire à l'estomac, dont les parois musculeuses réalisent un broyage mécanique, associé à l'action d'enzymes sécrétées par la glande digestive (digestion extracellulaire), l'estomac ayant une faible capacité sécrétrice (Boucaud-Camou, 1973). Une fois cette étape réalisée, le bol alimentaire passe dans le cæcum où se prolonge l'action des enzymes et débute l'assimilation des éléments digérés. L'intestin sert principalement à récupérer les débris non dégradés afin de les évacuer en fin de digestion. Tout au long de ces étapes, la glande digestive sécrète des enzymes vers l'estomac et le cæcum via les canaux digestifs (Mangold et Bidder, 1989b). Ces canaux, bordés par les appendices de la glande digestive, servent également de voie pour la remontée du bol alimentaire vers la glande digestive et les appendices de la glande digestive (Boucaud-Camou, 1973; Yim et Boucaud-Camou, 1980; Boucaud-Camou et Boucher-Rodoni, 1983). Ces derniers ont pour rôle principal l'assimilation des petites molécules issues de la digestion extracellulaire pour la distribution dans l'organisme (Boucaud-Camou et Boucher-Rodoni, 1983; Perrin, 2004). Ils sont également impliqués dans l'osmorégulation via l'absorption de sels et d'eau (Wells et Wells, 1989; Schipp et von Boletzky, 1976). La glande digestive, qui est l'organe de synthèse de la majorité des enzymes digestives, est également le siège de l'assimilation d'une partie des nutriments issus de la digestion extracellulaire ainsi que celui d'une digestion intracellulaire par endocytose d'une partie du bol alimentaire (Boucaud-Camou *et al.*, 1985; Boucaud-Camou et Boucher-Rodoni, 1983; Boucaud-Camou et Yim, 1980). Contrairement aux appendices de la glande digestive, les nutriments assimilés par la glande digestive sont réutilisés pour son propre métabolisme (Boucaud-Camou et Yim, 1980).

1.3.2.1 La glande digestive de *Sepia officinalis* et sa maturation

La glande digestive de la seiche est composée de tubules, formés par un épithélium unistratifié, qui se rejoignent dans de larges lumières pour déboucher dans les canaux de la glande digestive (Fig. 1.7). Ces tubules sont bordés d’une fine couche de tissus conjonctifs et musculaires richement vascularisés (Boucaud-Camou et Boucher-Rodoni, 1983). Cet organe possède une structure histologique complexe, variant assez largement suivant le stade de digestion, l’âge de l’animal, et probablement d’autres facteurs encore indéterminés (Boucaud-Camou, 1973; Yim et Boucaud-Camou, 1980). Chez les céphalopodes, la glande digestive joue un rôle important dans les processus digestifs tels que la production de la plupart des enzymes digestives ainsi que le stockage de nutriments et de lipides, mais aussi dans la détoxification, le stockage et l’excrétion de certains composés toxiques (Boucaud-Camou et Roper, 1995; Martínez *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2014). Il a longtemps été admis qu’un type cellulaire, présent sous différentes formes, était à l’origine de ces multiples fonctions (Boucaud-Camou et Boucher-Rodoni, 1983; Yim et Boucaud-Camou, 1980). Récemment, une étude histologique approfondie de cet organe a proposé une classification en trois types cellulaires : les cellules digestives (ou cellules à boules), les cellules excrétrices et les cellules basales (Fig. 1.7). Les premières, correspondant aux cellules décrites jusqu’à présent, assurent la sécrétion d’enzymes, l’excrétion des produits de la digestion et de certains métaux comme le Fe, l’absorption, le stockage de lipides et de polysaccharides ; les secondes ont un rôle d’excrétion de sels (non représentées) ; et les troisièmes sont impliquées dans le renouvellement des deux premières, ainsi que dans la détoxification, le stockage et l’excrétion de certains éléments traces (Fig. 1.7 ; Costa *et al.*, 2014).

Une des particularités du processus de digestion des céphalopodes est la simultanéité d’une digestion extracellulaire assurée par des enzymes fonctionnant à un pH alcalin, avec une digestion intracellulaire ayant lieu à pH acide. Cette caractéristique confère aux céphalopodes leur potentiel de croissance considérable (Costa *et al.*, 2014).

La maturation de la glande digestive se déroule pendant les premières semaines suivant l’éclosion du juvénile (i.e. entre trois et quatre semaines en fonction des conditions), et correspond à une phase de multiplication intense des cellules suivie d’une phase de différenciation cellulaire (Yim et Boucaud-Camou, 1980). En effet, à la naissance, la glande digestive du juvénile est composée de deux petites masses de cellules indifférenciées accolées à un vitel-

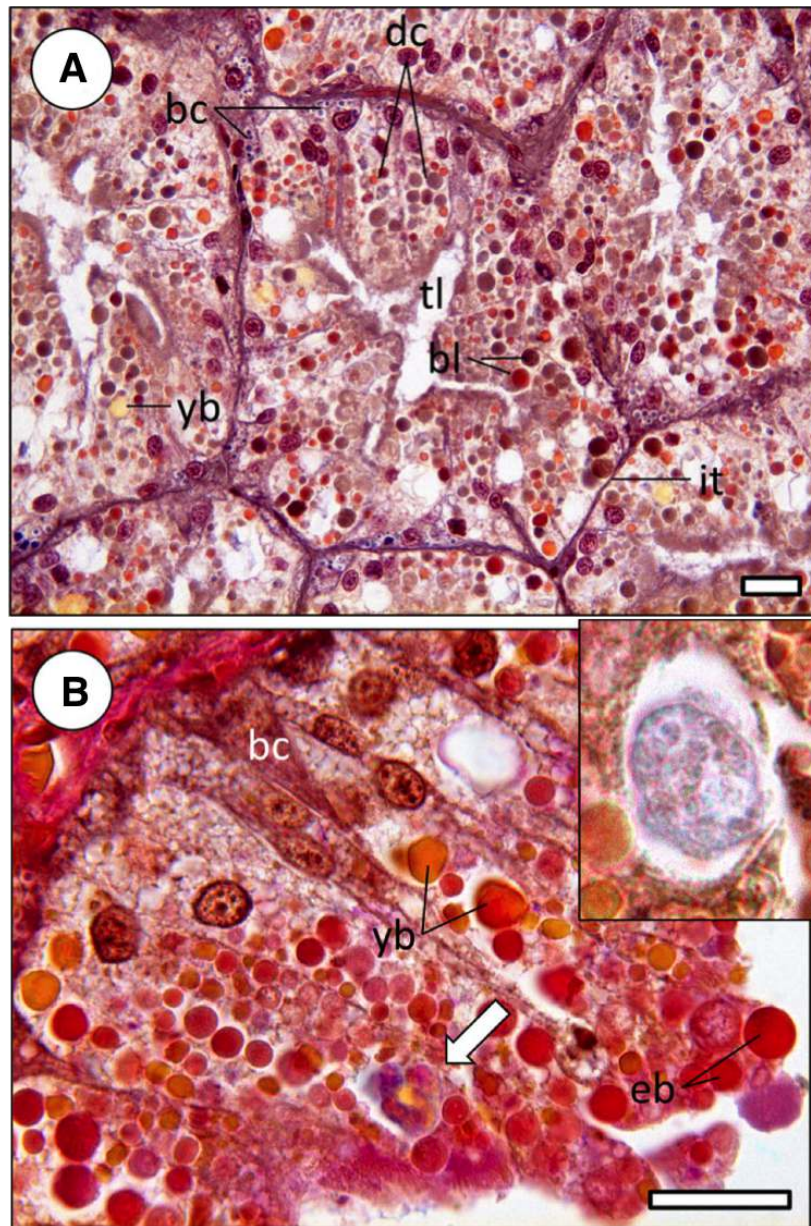


FIGURE 1.7 – Photographies de coupes histologiques transversales de glande digestive de *Sepia officinalis*. (A) Tubule digestif montrant la disposition des cellules digestives (dc) et des cellules basales (bc) autour de la lumière du tubule. Noter la présence de concrétions bleues dans le cytoplasme des cellules basales correspondant à des granules insolubles riches en éléments traces, appelés "sphérules". it : tissu intertubulaire; bl : lysosomes érythrophiles voués à l'excrétion pour la digestion extracellulaire; yb : lysosomes impliqués dans la digestion intracellulaire. Coloration à l'hématoxiline et à l'éosine. (B) Détail des cellules digestives présentant un système lysosomal très développé dont certains lysosomes sont en cours d'excrétion (eb). L'encart présente un corps brun qui correspond aux corps solides endocytés par la cellule digestive et non digérés. Ces composés sont stockés dans de larges vésicules avant d'être excrétés dans la lumière du tubule. La flèche indique un phagosome ayant fusionné avec un lysosome dans la cadre de la digestion intracellulaire, étape précédant la formation du corps brun. Coloration tétrachromique. Echelles : 25 μm , modifié d'après Costa *et al.* (2014).

lus interne qui sera consommé dans les premiers jours suivant l'éclosion, simultanément à la phase de multiplication cellulaire. Ce vitellus est assimilé via des processus de digestion intracellulaire acide. La phase de différenciation cellulaire est initiée par la première prise alimentaire et se traduit par la mise en place progressive de la digestion extracellulaire alcaline. Ce processus va se développer jusqu'à ce que la maturation de la glande digestive soit complète (Yim et Boucaud-Camou, 1980; Boucaud-Camou *et al.*, 1985). La digestion intracellulaire, quant à elle, est présente et se maintient au niveau de la glande digestive pendant toute la vie de l'animal. Lorsqu'elles sont pleinement fonctionnelles, les cellules digestives de la glande digestive présentent de nombreuses vésicules, d'au moins deux types : des vésicules servant au stockage des enzymes alcalines, excrétées au cours de la digestion, et des lysosomes contenant des enzymes acides qui participent à la digestion intracellulaire (Boucaud-Camou et Yim, 1980; Costa *et al.*, 2014).

La glande digestive étant le principal organe de synthèse des enzymes digestives, le dosage des activités protéolytiques acides et alcalines de *Sepia officinalis* permet de suivre la maturation de cet organe. Les principales protéases étudiées chez les céphalopodes sont les chymotrypsines, les trypsines et les carboxypeptidases A en tant qu'effectrices de la digestion extracellulaire (alcaline), et les cathepsines en tant qu'effectrices de la digestion intracellulaire (acide). Des hydrolases comme les phosphatases acides et alcalines jouent également un rôle au cours des phases de digestion (Mangold et Bidder, 1989b).

1.3.3 Le système circulatoire et l'immunité des céphalopodes

1.3.3.1 Le système circulatoire de *Sepia officinalis*

En comparant l'organisation du système circulatoire des céphalopodes Coléoidés à celui des autres invertébrés (e.g. arthropodes et autres mollusques), Schipp (1987a) décrit un groupe ayant atteint un niveau d'évolution particulièrement élevé (Fig. 1.8).

En effet, le système circulatoire des céphalopodes est clos, composé d'un système artériel, principalement dorsal, relié à un système veineux ventral par un réseau capillaire. La circulation de l'hémolymphe est assurée par un cœur central (dit systémique) composé d'un ventricule et de deux auricules, responsable de la circulation artérielle à travers deux aortes, appelées céphalique et postérieure. La circulation veineuse est assurée par des vaisseaux contractiles et deux cœurs branchiaux, qui conduisent l'hémolymphe dans les branchies à

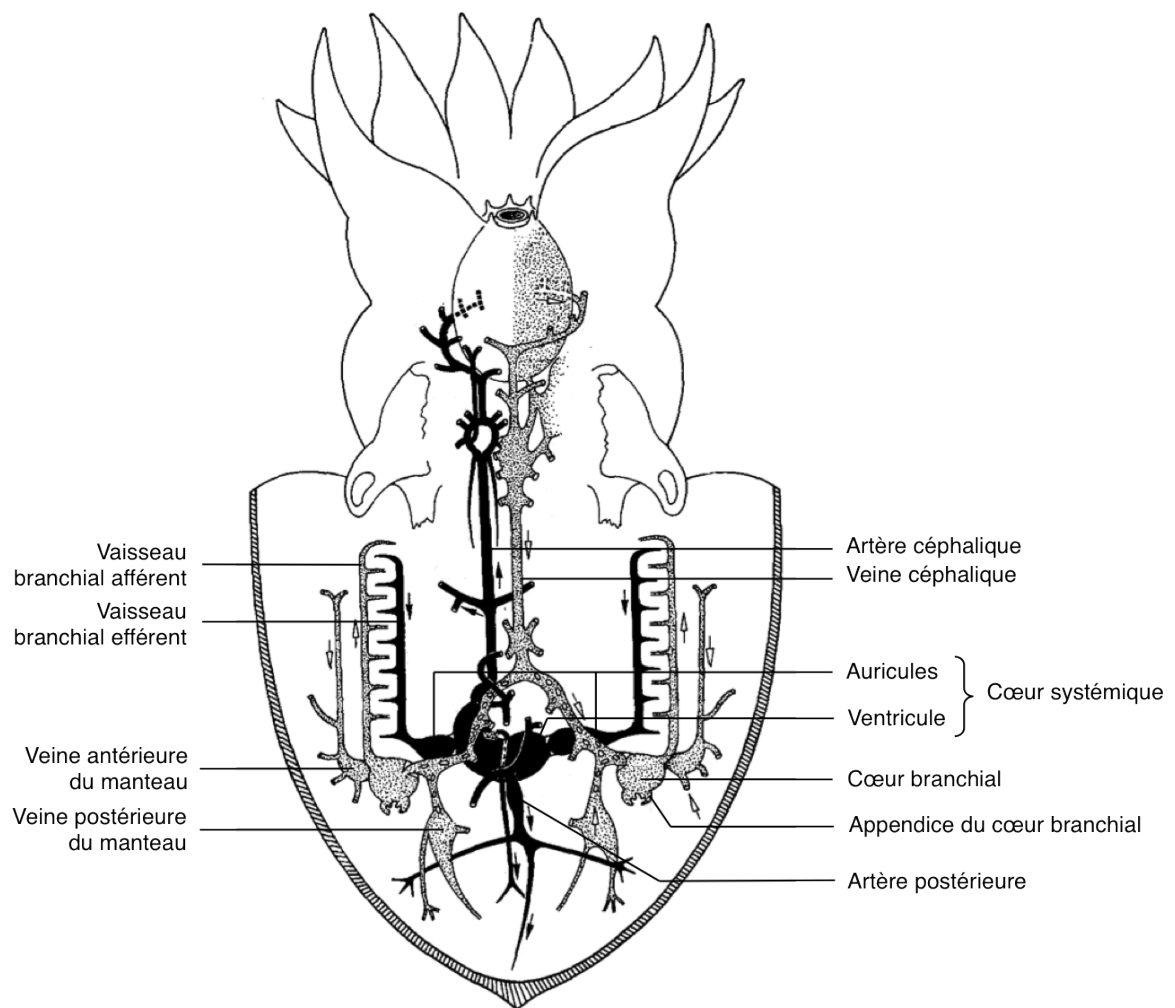


FIGURE 1.8 – Le système circulatoire de *Sepia officinalis* et ses principaux organes et vaisseaux, modifié d'après Schipp (1987a). En noir, le système artériel ; en gris, le système veineux.

une pression optimale pour permettre les échanges gazeux (Mangold et Bidder, 1989a; Shadwick et Nilsson, 1990; King *et al.*, 2005; Schipp, 1987b; Barber et Graziadei, 1965). Les cœurs branchiaux sont pourvus d'appendices en charge de l'ultrafiltration de l'hémolymphe pour la formation primaire d'urine. Trois types cellulaires sont retrouvés dans les tissus des cœurs branchiaux et de leurs appendices : les rhogocytes (anciennement appelés les cellules ovoïdes), les hémocytes et les cellules mésenchymatiques triangulaires. Ces cellules sont toutes impliquées dans la destruction de composés allogéniques présents dans l'hémolymphe via des processus d'endocytose, ainsi que dans l'excrétion de composés intervenant dans les défenses immunitaires. Le complexe des cœurs branchiaux participe également au catabolisme de l'hémocyanine (Hcy), ainsi qu'au stockage de cette molécule et d'éléments traces essentiels tels que le Cu et le Fe (retrouvés à des concentrations importantes dans ces organes), mais aussi non essentiels comme le Cd, probablement excrété dans l'urine (Fiedler et Schipp, 1987; Schipp et Hevert, 1978; Beuerlein *et al.*, 1998; Beuerlein et Schipp, 1998; Beuerlein *et al.*, 2000, 2002a; Bustamante *et al.*, 2002b).

L'hémolymphe est constituée du plasma dans lequel circulent les hémocytes, principales cellules du système immunitaire. Le plasma est essentiellement composé d'Hcy (à plus de 90 %), le pigment respiratoire, dont l'apoprotéine est synthétisée par les glandes branchiales (D'Aniello *et al.*, 1986; Mangold et Bidder, 1989a; Schipp et Hevert, 1978; Schipp *et al.*, 1973), et d' α_2 -macroglobuline, un inhibiteur de protéases à large spectre impliqué dans l'immunité (Thøgersen *et al.*, 1992; Armstrong, 1992, 2010; Vanhoorelbeke *et al.*, 1994). Les hémocytes, cellules de première importance dans les processus de défense immunitaire, sont synthétisés par les corps blancs, organes pairs multi-lobés situés au niveau de la tête, entre les lobes optiques et les yeux. A ce jour, un seul type d'hémocytes a été décrit chez *Sepia officinalis* (Claes, 1996; Mangold et Bidder, 1989a).

1.3.3.2 Rappel des connaissances sur le système immunitaire des céphalopodes

Bien que de plus en plus étudié, le fonctionnement du système immunitaire des invertébrés reste mal compris. Il est classiquement mis en opposition avec celui des vertébrés qui possèdent un système immunitaire dit "acquis" ou "adaptatif" qui confère à son hôte une capacité de réponse spécifique à un agent pathogène ainsi qu'une réponse "mémoire" permettant une élimination ciblée plus efficace. Ce système immunitaire adaptatif est complémentaire

du système immunitaire inné que l'on retrouve chez tous les êtres vivants pluricellulaires animaux et végétaux (Iwanaga et Lee, 2005; Loker *et al.*, 2004). Au sein des invertébrés, ce sont les insectes, et particulièrement *Drosophila melanogaster*, qui ont servi de modèle d'étude du système immunitaire inné. Les travaux concernant les organismes marins ne sont apparus que plus récemment, notamment en lien avec le développement de l'aquaculture et des phénomènes de mortalité massive liés à des pathogènes, des contaminants, et/ou d'autres facteurs environnementaux (e.g. Lotz, 1997; Wang *et al.*, 2013b; Xue et Renault, 2000; Vazquez *et al.*, 2009). Parmi les mollusques, le fonctionnement de l'immunité a principalement été étudié chez les bivalves en raison de leur importance économique, et dans une moindre mesure chez les gastéropodes, pour leur rôle de vecteur de parasites vis-à-vis de l'homme et/ou d'animaux d'élevage (Ford, 1992; Donaghy *et al.*, 2010; Loker *et al.*, 2004). Au sein des céphalopodes, malgré les particularités évolutives de leur système circulatoire, peu d'études descriptives du fonctionnement du système immunitaire ont été menées (Malham, 1996; Castellanos-Martínez, 2013). Par conséquent, la description ci-dessous, généraliste à l'exception des sujets spécifiquement abordés dans notre étude, empruntera les connaissances acquises au sein d'autres groupes d'invertébrés (i.e. mollusques et crustacés) avant de développer les travaux réalisés chez les céphalopodes.

Le système immunitaire inné est traditionnellement présenté comme étant composé des processus à médiation humorale, qui correspondent aux composés dissous, qu'ils soient présents dans l'hémolymphe ou dans des vésicules intracellulaires, et à médiation cellulaire, qui se rapportent à l'action des hémocytes. Ces deux processus sont étroitement connectés et agissent en synergie.

1.3.3.3 La médiation humorale

L'organisation de la médiation humorale peut être présentée en trois sous-groupes : 1) les récepteurs de reconnaissance du corps étranger (PRRs), 2) les voies de signalisation de la réponse immunitaire, et 3) les effecteurs immunitaires.

1) Parmi la multitude de **récepteurs de reconnaissance de corps étrangers (PRRs)** connus chez les invertébrés, les lectines sont les principales molécules ayant été étudiées chez les céphalopodes (Rögener *et al.*, 1985; Alpuche *et al.*, 2010). Il s'agit de protéines ou glycopro-

téines qui se lient spécifiquement aux carbohydrates présents sur les membranes bactériennes (Castellanos-Martínez et Gestal, 2013; Wang *et al.*, 2012). Bien que toutes leurs fonctions n'aient pas encore été décrites, leur implication a été rapportée dans la reconnaissance du non-soi, l'agglutination et l'opsonisation (i.e. processus facilitant la phagocytose) des bactéries, ainsi que dans l'activation du système du complément (Matsubara *et al.*, 2006; Pruzzo *et al.*, 2005; Fujita, 2002). Les trois principaux groupes de lectines décrits chez les mollusques sont les galectines, lectines les plus étudiées et conservées au sein du règne animal, qui se lient au β -galactoside; les lectines C, qui présentent une activité de liaison dépendante de l'ion Ca^{2+} ; et les lectines de type I, qui se lient spécifiquement à l'acide sialique. De récentes études (Lehmann *et al.*, 2006; Vasta, 2009; Kolarich *et al.*, 2012) ont mis en évidence la nature de leur forme, soluble ou membranaire, chez les bivalves (Fig. 1.9).

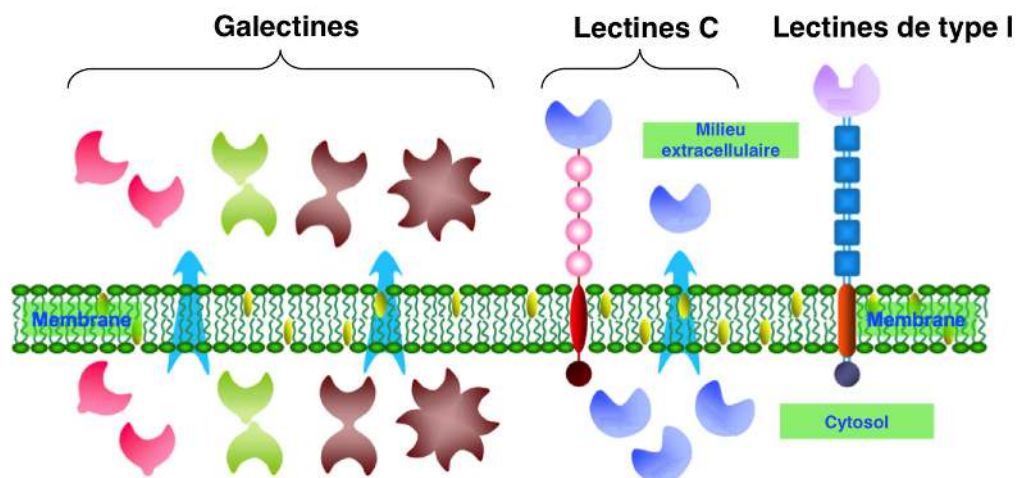


FIGURE 1.9 – Les principales formes de lectines caractérisées chez les mollusques bivalves, modifié d'après Soudant *et al.* (2013).

Chez les céphalopodes, la présence de lectines dans le plasma est connue depuis longtemps. Dans les années 1990, une lectine C de 260 kDa issue du plasma d'*Octopus vulgaris* a été caractérisée (Rögener *et al.*, 1985) et l'agglutination de différentes souches bactériennes par les plasma d'*Octopus maya*, *Sepiotheutis lessoniana*, et *S. officinalis* a été mise en évidence. Plus récemment, des séquences homologues d'ARN de lectines C spécifiques du mannose (Castellanos-Martínez, 2013) et de galectines ont été extraites d'hémocytes d'*O. vulgaris* et d'*Euprymna scolopes* (Castellanos-Martínez, 2013; Collins *et al.*, 2012). Une autre lectine de 66 kDa issue du plasma d'*O. maya* et montrant une activité d'agglutination a également été caractérisée (OmA). Cette lectine ne montre pas de similarités avec les séquences peptidiques

de lectines connues, mais présente des homologies avec une Hcy d'*Octopus dofleini* (Alpuche *et al.*, 2010).

L'implication de l'Hcy dans le système immunitaire des invertébrés semble de plus en plus évidente. Chez les céphalopodes, cette molécule représente la quasi-totalité des protéines présentes dans le plasma (D'Aniello *et al.*, 1986) et sa plurifonctionnalité (e.g. lectine, phénoloxydase, précurseur de peptides antimicrobiens) a été mise en évidence chez de nombreux invertébrés (e.g. Coates et Nairn, 2014; Decker et Jaenicke, 2004). Ce pigment respiratoire, bleu sous sa forme oxydée, est une protéine de poids moléculaire élevé qui possède un site actif à deux ions cuivre, maintenus par six résidus histidine, permettant la liaison réversible d'une molécule de dioxygène. Chez *S. officinalis*, la molécule d'Hcy est un décamère, constitué de sous-unités de 350-450 kDa, de forme cylindrique. Chaque sous-unité est composée de huit unités fonctionnelles (désignées de *a* à *h* à partir de l'extrémité N-terminale) d'environ 50 kDa (Fig. 1.10). Plusieurs études ont souligné la capacité de la molécule d'Hcy à présenter une activité de type phénoloxydase chez les céphalopodes (Campello *et al.*, 2008; Siddiqui *et al.*, 2006; Decker et Tuzek, 2000; Decker *et al.*, 2007; Salvato *et al.*, 1998). Siddiqui *et al.* (2006) ont d'ailleurs montré que cette activité, issue du plasma de *S. officinalis*, avait pour seule origine l'Hcy, et que l'unité fonctionnelle *g* de cette molécule en est la principale responsable. Le rôle et le fonctionnement des enzymes de type phénoloxydases seront développés ci-dessous.

D'autres PRRs ont été récemment mis en évidence dans les tissus des céphalopodes *O. vulgaris* et *E. scolopes*, parmi lesquels on trouve des protéines de liaison aux β -1,3-glucane, lipopolysaccharide et peptidoglycane (β GBPs, LGBP, PGBP, PGRP, GNBP), et des récepteurs de type Toll (TLRs) (Castellanos-Martínez, 2013; Collins *et al.*, 2012; Troll *et al.*, 2009; Goodson *et al.*, 2005), mais leur fonctionnement n'a pas encore été étudié.

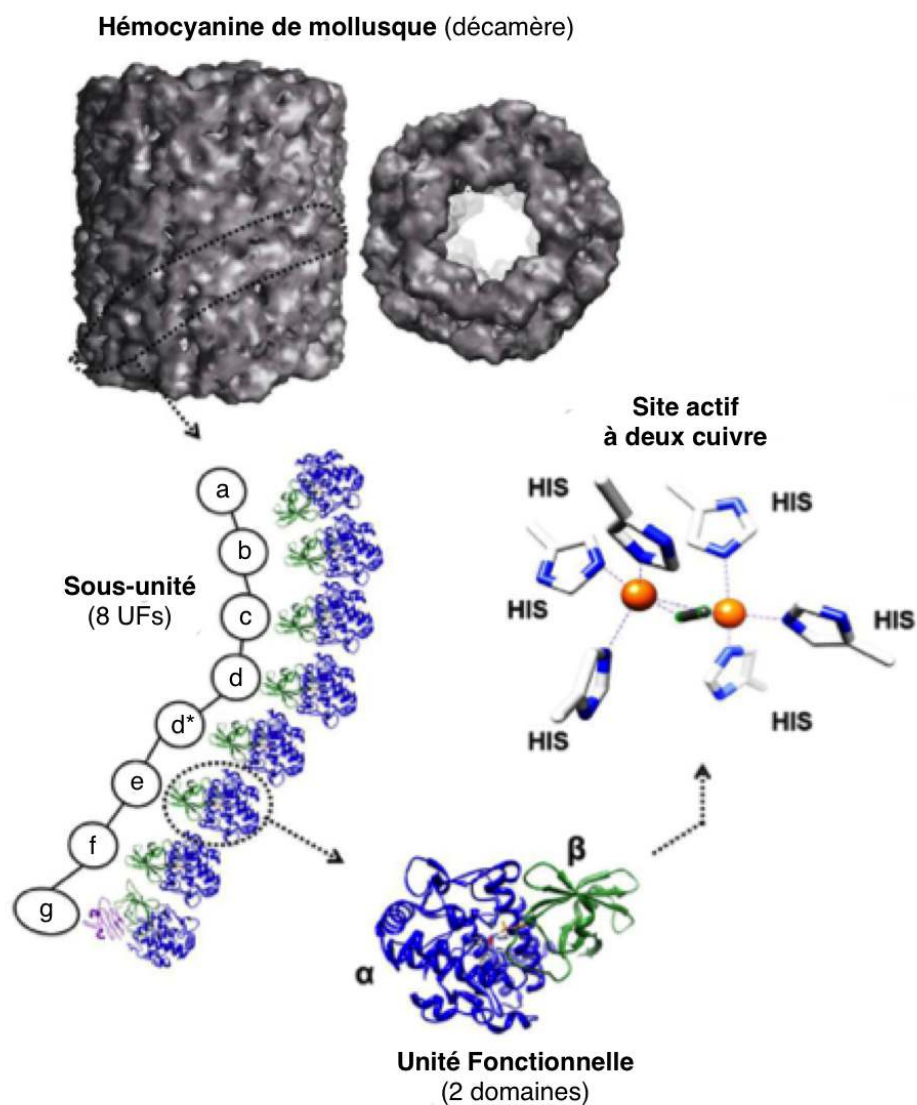


FIGURE 1.10 – Représentation en trois dimensions d’une Hcy de mollusque et détail de sa structure. Représentation de l’organisation de la sous-unité de *S. officinalis*, d’une unité fonctionnelle, et du site actif d’une unité fonctionnelle, modifiée d’après Coates et Nairn (2014).

2) Les principales **voies de signalisation de la réponse immunitaire** décrites chez les invertébrés, notamment les mollusques, sont le système du complément, la cascade Toll/NF- κ B, les cascades protéolytiques et le système prophénoloxydase (proPO).

- Le **système du complément** est l'un des plus anciens systèmes de défense du règne animal (Castillo *et al.*, 2009). Il comprend plus d'une trentaine de protéines sériques et membranaires qui jouent un rôle essentiel dans les défenses immunitaires innées. L'activation de ce système induit trois principales activités : le déclenchement de l'inflammation, l'opsonisation des pathogènes, et leur lyse (Fujita, 2002; Castillo *et al.*, 2009). Il a surtout été décrit chez les mammifères, mais certains de ses composants ont été récemment mis en évidence chez des céphalopodes (Collins *et al.*, 2012; Castillo *et al.*, 2009; Schleicher et Nyholm, 2011; Castellanos-Martínez, 2013).

- La **cascade Toll/NF- κ B** (également appelée Toll) est initiée par l'activation des récepteurs du même nom (Toll-like receptors) qui sont des protéines transmembranaires situées à l'interface extra-/intracellulaire ou à l'intérieur de la cellule, dans un endosome. Cette cascade entraîne l'activation de processus très divers comme l'inflammation, l'apoptose et les cascades protéolytiques.

- Les **cascades protéolytiques immunitaires** font partie des premières cascades déclenchées lors d'une infection. En effet, la libération de protéases par l'organisme va entraîner le déclenchement d'autres voies de signalisation telles que les systèmes proPO et du complément. Les inhibiteurs de protéases, comme les α_2 -macroglobulines, font également partie de ces voies de signalisation. Ils régulent l'action des protéases endogènes et empêchent les protéases synthétisées par les pathogènes d'avoir des effets délétères à l'intérieur de l'organisme infecté (Armstrong, 2006, 2010; Wang *et al.*, 2013b). En raison de la diversité des protéases, les inhibiteurs de protéases sont impliqués dans de nombreux processus dont un certain nombre est encore mal compris.

Au sein du système immunitaire des invertébrés, il a été montré que des inhibiteurs de protéases sont impliqués dans la régulation de la coagulation de l'hémolymphe, des cascades prophénoloxydase et du complément, et dans la synthèse de cytokines et de peptides antimi-

crobiens (Agarwala *et al.*, 1996; Tong et Kanost, 2005; Xue *et al.*, 2009). La plupart de ces molécules inhibent de façon spécifique les enzymes protéolytiques d’une seule classe mécanistique (i.e. protéases aspartiques, protéases à cystéines, protéases à sérines, métalloprotéases) en agissant sur leur structure pour les inactiver de façon irréversible (Umasuthan *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2009; Huntington *et al.*, 2000). Les α_2 -macroglobulines, qui sont présentes dans le plasma de la plupart des métazoaires, agissent différemment en formant une cage autour de la protéase qui va limiter son action sans l’inactiver. De plus, l’action de ce groupe d’inhibiteurs de protéases n’est pas limitée à une classe mécanistique (Armstrong, 2010).

Chez les céphalopodes, la présence des α_2 -macroglobulines a été mise en évidence dans les plasma d’*O. vulgaris*, d’*Eledone cirrhosa*, de *S. officinalis* et de *Loligo pealii* (Vanhoorelbeke *et al.*, 1994; Thøgersen *et al.*, 1992; Armstrong, 1992; Malham *et al.*, 1998b). Vanhoorelbeke *et al.* (1994) ont même souligné que cette protéine est la deuxième plus abondante dans le plasma de *S. officinalis* après l’Hcy. D’autres études ont mesuré d’importantes activités inhibitrices de protéases dans la glande digestive de différents céphalopodes (Kishimura *et al.*, 2010, 2001; Sof’ina *et al.*, 1988; Ishikawa *et al.*, 1966).

- Les **phénoloxydases (POs)** sont des métalloprotéines à cuivre qui catalysent la première étape de la mélanisation (production de la mélanine ou mélanogenèse), c’est-à-dire l’hydroxylation et/ou l’oxydation d’un composé phénolé (tyrosine et 3,4-dihydroxyphénylalanine). Chez les invertébrés, la mélanisation joue un rôle important dans la reconnaissance du non-soi, la production de substances toxiques pour les agents pathogènes, la réparation des blessures, le durcissement de la cuticule et l’apparition de facteurs stimulant les défenses cellulaires (i.e. phagocytose et/ou encapsulation; Cerenius *et al.*, 2008). Récemment, les recherches concernant les POs ont visé à déterminer plus précisément la nature des POs étudiées (Le Bris *et al.*, 2013, 2014; Luna-Acosta, 2010). En effet, ce groupe d’enzymes comprend les tyrosinases, les catécholases et les laccases. Toutes trois peuvent catalyser l’oxydation d’*o*-diphénols (activité catécholase), cependant les tyrosinases ont également la capacité de réaliser l’orthohydroxylation des monophénols (activité crésolase), tandis que les laccases sont aussi capables de catalyser l’oxydation de *m*- et *p*-diphénols, ainsi que d’autres composés comme les amines aromatiques (activité laccase).

Une caractéristique des POs réside dans leur forme inactive : la prophénoloxydase (proPO).

La cascade proPO correspond aux étapes nécessaires à l'activation de la proPO en PO. Cette cascade est initiée par la reconnaissance de motifs présents sur les pathogènes (PAMPs) qui induit (directement ou via des PRRs) le déclenchement d'une cascade de protéases à sérine aboutissant à la conversion de la forme zymogénique proPO en PO (Fig. 1.11).

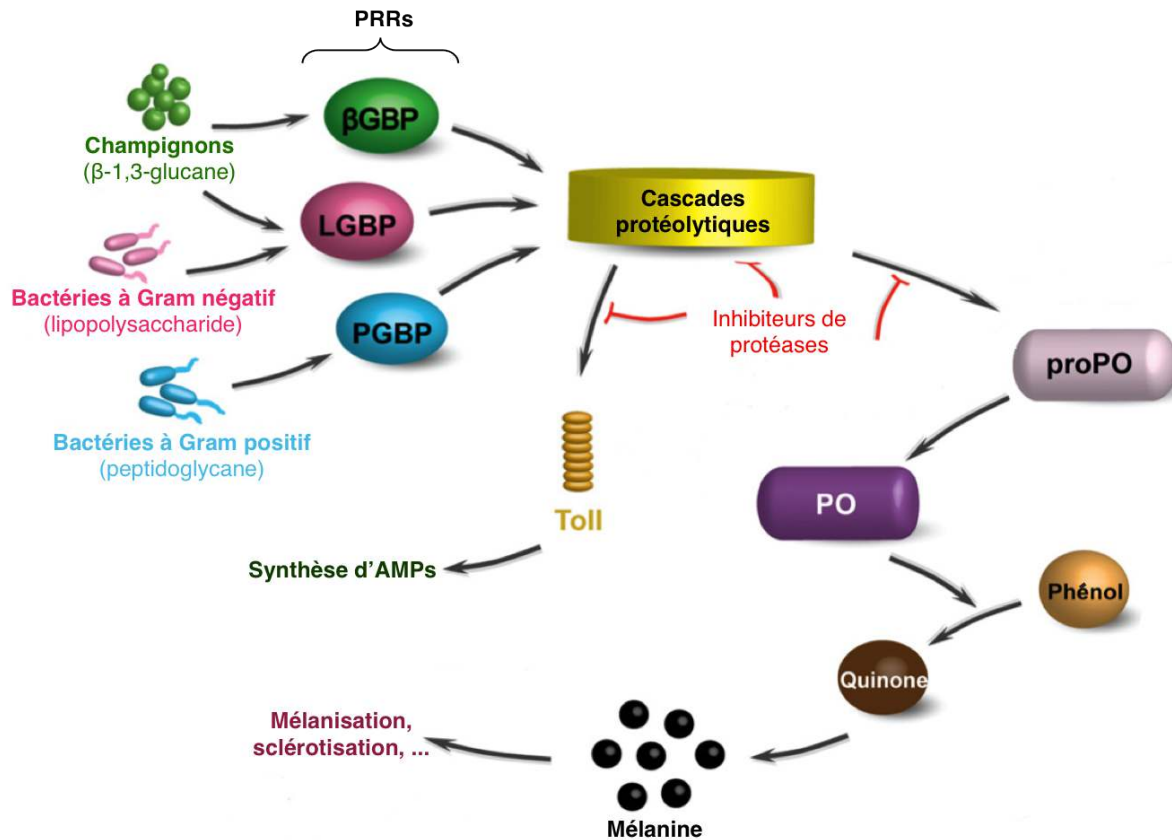


FIGURE 1.11 – Bilan simplifié des voies mises en place chez un invertébré lors d'une infection, modifié d'après Amparyup *et al.* (2013).

Chez les céphalopodes, en dehors des tyrosinases impliquées dans la synthèse de l'encre, les POs en tant que composant du système immunitaire n'ont pas été spécifiquement étudiées (Fan *et al.*, 2009; Fiore *et al.*, 2004; Naraoka *et al.*, 2000, 2003; Palumbo *et al.*, 1997). Plusieurs travaux ont porté sur l'activité PO générée par l'Hcy (Campello *et al.*, 2008; Salvato *et al.*, 1998; Siddiqui *et al.*, 2006; Decker, 1998). En effet, les Hcys d'un grand nombre d'invertébrés peuvent présenter des activités POs (appelées *Hcy-derived PO*) en fonction de l'accessibilité de leur site actif. Ces molécules peuvent même voir leur activité augmenter en présence de différents activateurs (de façon similaire à la proPO). C'est alors un changement

de conformation de l'Hcy qui permet une meilleure accessibilité de son site actif pour les composés phénolés.

3) Les **effecteurs immunitaires** sont des composés chargés d'inactiver et de détruire le pathogène. Les principaux composés de ce genre décrits dans la littérature sont les **peptides antimicrobiens (AMPs)** et les **enzymes hydrolytiques** (Wang *et al.*, 2013b).

- Les **peptides antimicrobiens (AMPs)** sont caractérisés par leur petite taille (12-100 Aa), leur stabilité à la chaleur, ainsi que leur nature cationique et hydrophobique. Leurs propriétés tensioactives et perforatrices permettent de rompre les membranes des microorganismes, ce qui provoque leur lyse (Hooper *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009). Ils sont généralement produits et stockés dans les hémocytes avant d'être libérés plus localement dans une zone infectée ou susceptible de le devenir (Mitta *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2007). De spécificité faible, ces peptides ont montré des activités anti-bactériennes, antifongiques, et anti-virales ainsi qu'une implication dans la cicatrisation. Les principaux AMPs découverts chez les mollusques sont issus de bivalves (e.g. défensines, mytilines).

- Les **enzymes hydrolytiques** regroupent des protéines responsables de la lyse intra- et/ou extracellulaire (Xue et Renault, 2000) telles que les phosphatases acides et alcalines, les lysozymes, la β -glucuronidase, les estérases, les protéases, les lipases et les amylases (Carballal *et al.*, 1997a; Xue et Renault, 2000; Pipe, 1990; Cima *et al.*, 2000; López *et al.*, 1997a; Matozzo *et al.*, 2007). Ces enzymes ont été détectées dans les hémocytes de nombreux mollusques, ainsi que dans le plasma, mais en quantité moins importante (Carballal *et al.*, 1997a). Elles sont majoritairement stockées dans les lysosomes de ces cellules ou d'organes impliqués dans le système immunitaire.

L'action des lysozymes est fondamentale pour permettre la lyse d'un grand nombre de bactéries. En effet, ces enzymes clivent la liaison 1,4- β -glycosique entre l'acide N-acétylmuramique et le N-acétylglucosamine des parois bactériennes, conduisant à la lyse de la cellule (Herreweghe et Michiels, 2012). Outre cette activité antibactérienne, d'autres fonctions ont récemment été mises en évidence dans le système immunitaire d'invertébrés, comme la modulation de la réponse immunitaire par interaction avec les lectines, certains composés du

système du complément, et/ou les POs (Herreweghe et Michiels, 2012; Wang et Zhang, 2010; Rao *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2007; Goto *et al.*, 2007).

Chez les céphalopodes, des activités lysozymes ont été mesurées ponctuellement dans l'hémolymphe ou le plasma d'*O. vulgaris*, en tant qu'indicateur de réponse à un stress (e.g. Grimaldi *et al.*, 2013; Locatello *et al.*, 2013). La seule étude descriptive de la répartition de ces enzymes dans le système circulatoire d'un céphalopode a été réalisée sur l'octopode *E. cirrhosa*. Ce travail a mis en évidence la présence d'une activité lysozyme au niveau des hémocytes, du plasma, ainsi que dans tous les autres organes étudiés (i.e. branchies, corps blancs, cœurs branchiaux et leurs appendices, glandes salivaires; Malham *et al.*, 1998b). Cependant, aucune réponse claire de cette activité enzymatique en tant qu'effecteur immunitaire n'a pu être soulignée après injection de contaminants ou de bactéries dans le système circulatoire de ces octopodes (Malham *et al.*, 1998b; Grimaldi *et al.*, 2013; Locatello *et al.*, 2013).

1.3.3.4 La médiation cellulaire

La médiation cellulaire est assurée par les hémocytes, cellules circulant librement dans le plasma ou infiltrées dans les tissus. Alors qu'il est courant de trouver au moins deux populations hémocytaires dans l'hémolymphe des mollusques gastéropodes et bivalves, la grande majorité des études descriptives de ces cellules chez les céphalopodes rapportent un seul type cellulaire (Malham, 1996; Cowden et Curtis, 1981; Rodríguez-Domínguez *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 2012). Ces cellules sont impliquées dans de nombreuses fonctions physiologiques chez les mollusques, comme la digestion, le transport et la distribution de nutriments (Beninger *et al.*, 2003), la réparation coquillière et tissulaire (Mount *et al.*, 2004), la détoxification (Mattozzo *et al.*, 2001), et la protection de l'organisme vis-à-vis des micro-organismes pathogènes (e.g. Donaghy *et al.*, 2010; Soudant *et al.*, 2013; Rodríguez-Domínguez *et al.*, 2006). Cette dernière fonction est assurée principalement par les processus de phagocytose, d'encapsulation, et de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, autrement appelés radicaux libres), aboutissant à la destruction de l'agent étranger. Le processus de phagocytose, abondamment décrit dans la littérature, se décompose en 4 étapes (Fig. 7.2) :

1. La chimiotaxie, qui correspond à l'attraction et la migration vers un stimulus chimique libéré par l'organisme infecté ou porté par l'agent étranger ;
2. La reconnaissance du corps étranger et son adhésion, qui peut dépendre de certains

composés (e.g. lectines), indispensables à ce processus ou permettant simplement de l'améliorer ;

3. L'internalisation du corps étranger par endocytose ;
4. La dégradation intracellulaire.

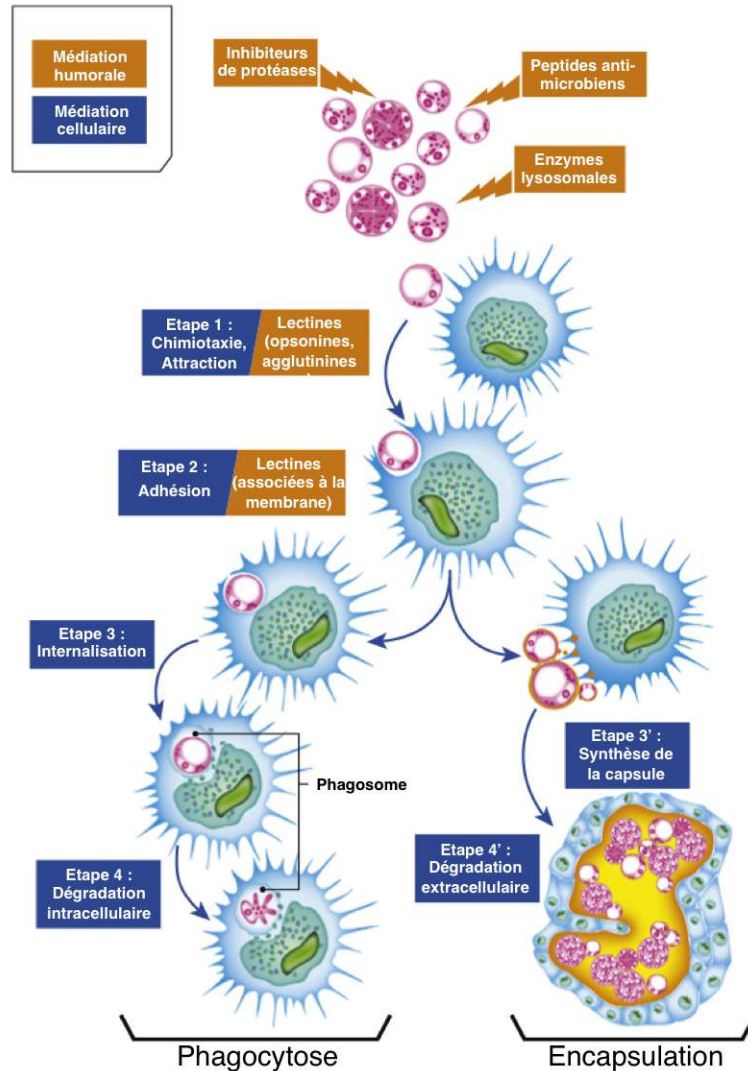


FIGURE 1.12 – Etapes de la phagocytose et de l'encapsulation, et principaux rôles assurés par les médiateurs humoraux au cours de ces étapes, modifié d'après Soudant *et al.* (2013).

Le processus d'internalisation conduit à la formation d'un phagosome primaire dans lequel la destruction du micro-organisme a lieu (étape 3). Des lysosomes cytoplasmiques viennent fusionner avec ce phagosome et libèrent leurs enzymes hydrolytiques, contribuant ainsi à la dégradation du composé phagocyté (étape 4). Au cours de l'internalisation du corps étranger, une enzyme membranaire, la NADPH oxydase (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phos-

phate oxydase) est activée, provoquant une augmentation de la consommation d’oxygène par la cellule, et la formation directe ou indirecte de ROS, tels que l’anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d’hydrogène (H_2O_2), l’oxygène singulet (1O_2), le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$) ou l’anion hypochlorite (ClO^-). Les ROS sont connus pour leurs activités microbicides et agissent seuls ou en synergie avec les enzymes lysosomales (Neumann *et al.*, 2001; Soudant *et al.*, 2013; Di *et al.*, 2013).

Lorsque l’endocytose du corps étranger ne peut avoir lieu, généralement à cause de sa taille, les hémocytes forment une capsule par agrégation autour de ce corps, c’est l’encapsulation (étape 3’). Ils la détruisent ensuite par excrétion d’enzymes et de ROS à l’intérieur de cette capsule, c’est la dégradation extra-cellulaire (étape 4’ ; Fig. 7.2).

Chez les céphalopodes, le comportement de phagocytose des hémocytes est connu depuis longtemps (Stuart, 1968; Cowden et Curtis, 1981). Cependant, peu d’études ont décrit ce processus et les paramètres l’influençant (Malham *et al.*, 1997; Castellanos-Martínez *et al.*, 2014; Rodríguez-Domínguez *et al.*, 2006).

Il est possible d’étudier le fonctionnement et le comportement des hémocytes vis-à-vis de différents stimuli à partir de cultures primaires. Cet outil permet de travailler sur cette composante du système immunitaire, isolée de toute interaction avec les autres composantes. Dans le cas des céphalopodes, la culture primaire d’hémocytes représente une alternative intéressante aux expériences d’expositions à des pathogènes *in vivo* (par balnéation ou injection), en raison de la fragilité de ces animaux vis-à-vis des manipulations et de la faible disponibilité en animaux adultes. Dans le cadre de travaux d’écotoxicologie, la culture primaire d’hémocytes de céphalopodes s’avère utile pour étudier l’impact direct de différents contaminants sur le comportement de ce type cellulaire (présenté au chapitre 7).

1.3.4 Rappel des connaissances concernant l’écotoxicologie des éléments traces chez la seiche

L’importante capacité d’accumulation des éléments traces par la seiche a été mise en évidence dans de nombreuses études (e.g. Miramand et Bentley, 1992; Miramand *et al.*, 2006; Schipp et Hevert, 1978; Bustamante *et al.*, 2006a). Son rôle clé dans les réseaux trophiques marins, en tant que proie d’un grand nombre de prédateurs supérieurs (e.g. oiseaux, mammifères) a incité les scientifiques à étudier le métabolisme de cet animal vis-à-vis de ces

contaminants.

La plupart des travaux s'intéressant aux concentrations en éléments traces présents dans *S. officinalis* ont d'abord été réalisés *in situ* (Miramand et Bentley, 1992; Miramand *et al.*, 2006; Schipp et Hevert, 1978; Bustamante *et al.*, 2006a). Ils ont mis en évidence que le principal organe d'accumulation est la glande digestive, dans laquelle des teneurs très élevées en Ag, Cd, Cu, Fe et Zn ont été mesurées (Miramand et Bentley, 1992; Miramand *et al.*, 2006; Bustamante *et al.*, 2006a). Le rôle des cœurs branchiaux a également été rapporté dans l'accumulation et probablement la détoxification de différents éléments (i.e. Co, Cu, Fe, Ni, V) (Miramand et Bentley, 1992; Schipp et Hevert, 1978). Une étude portant sur l'accumulation de huit éléments chez *S. officinalis* tout au long de son cycle de vie a montré qu'elle a lieu dès la naissance pour le Cd, le Cu, le Fe, le Pb, le V et le Zn, et dure toute la vie de l'animal. Seule la concentration en Ag dans l'animal diminue à partir de la migration automnale au large (Miramand *et al.*, 2006).

En milieu aquatique, l'assimilation des éléments traces passe par les voies dissoute et trophique, dans des proportions différentes en fonction de l'organisme étudié et de la biodisponibilité de l'élément dans l'eau et la nourriture (Rainbow, 2002). L'utilisation de radiotraceurs en milieu contrôlé a permis d'estimer les taux d'assimilation pour différents éléments traces chez la seiche adulte et juvénile, à des concentrations environnementales. Cela a permis de mettre en évidence que le Cd, le Co et le Zn sont majoritairement accumulés par la seiche par la voie trophique, alors que l'Ag l'est principalement par la voie dissoute (Bustamante *et al.*, 2004). Ces études ont confirmé le rôle prépondérant de la glande digestive en tant qu'organe d'accumulation, pour ces quatre éléments, et celui des cœurs branchiaux comme probable voie d'excrétion du Co et du Cd (Bustamante *et al.*, 2002b, 2004).

Une fois dans l'organisme, les éléments traces sont "métaboliquement disponibles", au moins jusqu'à ce que des processus physiologiques interagissent pour les excréter ou les lier à une molécule particulière ayant une forte affinité pour l'élément, l'empêchant de se fixer ailleurs (Rainbow, 2002). Ce n'est qu'une fois lié, que l'élément est considéré "détoxiqué" (Mason et Jenkins, 1995). Au sein des invertébrés, la précipitation des éléments traces sous la forme de granules est un mécanisme de détoxification efficace (Marigómez *et al.*, 2002). Ce processus passe par une liaison de ces éléments avec des protéines cytosoliques (i.e. solubles) qui les transportent au niveau de vésicules de stockage (e.g. lysosomes) dans lesquelles leur

précipitation peut avoir lieu. L'organisme a ainsi la possibilité de stocker le composé potentiellement toxique sous une forme inactive (i.e. insoluble), et éventuellement de l'excréter (Liu et Wang, 2013; Bustamante *et al.*, 2006a; Blackmore et Wang, 2002). Dans la glande digestive de *S. officinalis*, un type de granules, appelés sphérules, a été décrit au niveau des cellules basales (Fig. 1.7). Les principaux éléments traces détectés dans les sphérules sont le Cu, le Zn, l'Ag, le Ca, le Mg, le Sr et le Pb, associés à du soufre, suggérant l'implication de métallothionéines (MTs) dans ce processus (Martoja et Marcaillou, 1993; Costa *et al.*, 2014). Cependant, l'existence de telles organites (i.e. sphérules) dans les cellules de la glande digestive de *S. officinalis* reste sujette à controverse (e.g. Bustamante *et al.*, 2006a).

Dans le règne animal, les MTs sont les principales molécules prenant en charge les éléments traces au niveau de la fraction soluble (i.e. cytosolique). Ces protéines de petite taille (10-20 kDa), riches en cystéine, ont une importante capacité à lier les métaux grâce à leurs groupements thiols ($-SH$; Fig. 1.13). Elles sont impliquées dans l'homéostasie des métaux essentiels (Cu et Zn) en tant que réservoir pour diverses fonctions métaboliques, ainsi que dans la détoxification d'éléments traces non essentiels (e.g. Hg, Cd, Ag) (e.g. Amiard *et al.*, 2006; Cosson, 1991; Roesijadi, 1992). D'autres molécules ayant des propriétés similaires aux MTs peuvent également avoir un rôle de ligand, comme le glutathion (GSH, sous sa forme réduite) ou les protéines de haut poids moléculaire (HMWP) (Dickinson et Forman, 2002; Serafim et Bebianno, 2010). Afin de déterminer les principaux composants responsables de la prise en charge des éléments traces dans la glande digestive de *S. officinalis*, le fractionnement subcellulaire de sept éléments traces (i.e. Ag, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn) issus de seiches adultes prélevées dans le milieu naturel a été estimé (Bustamante *et al.*, 2006a). Ainsi, il a été mis en évidence que l'Ag, le Fe, le Mn, le Pb et le Zn sont majoritairement stockés sous une forme insoluble, confirmant leur détoxification/stockage sous forme de granules et/ou associés aux membranes, tandis que le Cd, le Co et le Cu sont principalement présents dans la fraction soluble, impliquant leurs liaisons avec des protéines cytosoliques. Cependant, peu d'éléments solubles ont montré des liaisons importantes avec des composés de taille similaire aux MTs (Bustamante *et al.*, 2006a).

Les processus de détoxification mis en place par la seiche en cas d'exposition importante à un élément trace restent méconnus. La nature des mécanismes chargés de réguler l'accumulation et le fractionnement subcellulaire des éléments traces chez les céphalopodes juvéniles,

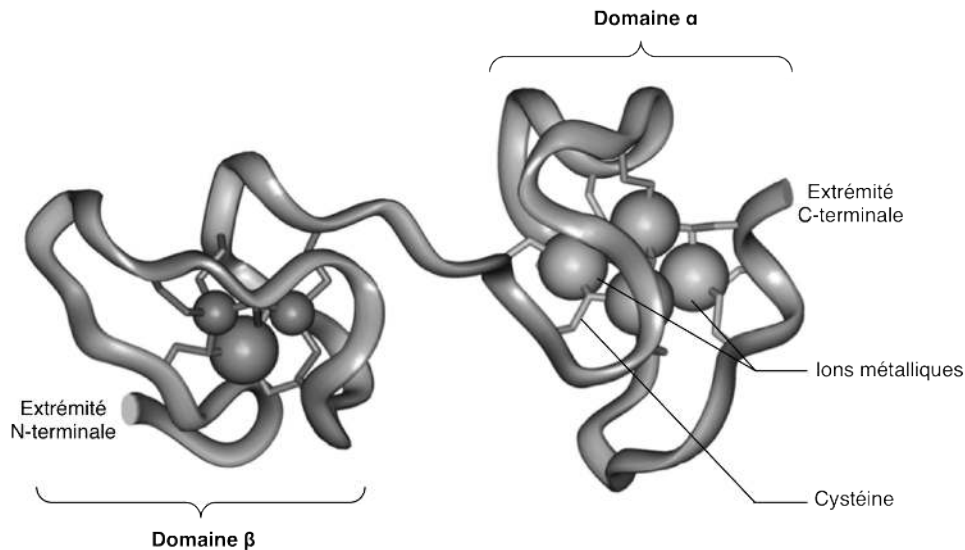


FIGURE 1.13 – Représentation en trois dimensions d'une métallothionéine avec ses deux domaines (α et β) liant les éléments traces grâce aux groupements thiols des cystéines la composant, modifiée d'après Romero-Isart et Vašák (2002).

quel que soit le niveau de maturité de la glande digestive, est également inconnue. Il a cependant été mis en évidence que les paramètres relatifs à l'accumulation (i.e. efficacité d'assimilation et temps de rétention) de certains éléments comme le Co et le Zn présentent des valeurs différentes entre le stade adulte et le stade juvénile. En effet, le Co est assimilé de manière beaucoup plus importante par le juvénile par la voie trophique, tandis que son temps de rétention dans l'organisme est plus long chez l'adulte. En revanche, le temps de rétention du Zn est plus long chez le juvénile (Bustamante *et al.*, 2002b). Ces expériences suggèrent des processus relatifs à la détoxification et à la gestion des éléments traces différents entre ces deux stades de vie (Bustamante *et al.*, 2002b, 2004). En raison du développement important de la glande digestive, et notamment de son système lysosomal, entre la naissance et le premier mois de vie, cette différence de métabolisation peut être liée à la disponibilité en ligands spécifiques ainsi qu'à des sites d'accumulation différents, comme déjà suggéré entre Sepiidae et Loliginidae, dont le système lysosomal de la glande digestive est moins développé chez ces derniers (Bustamante *et al.*, 2002a). Il a également été proposé que les différences d'efficacité d'assimilation entre les stades adulte et juvénile peuvent être liées aux natures différentes de la digestion à ces deux périodes (majoritairement extracellulaire *vs* majoritairement intracellulaire).

Concernant l'étude de la toxicité des éléments traces sur les céphalopodes, les principaux

travaux ont été menés sur le stade embryonnaire. Ils ont mis en évidence une toxicité du Cd et du Cu à des concentrations supérieures à $100 \mu\text{g L}^{-1}$, se traduisant par la mort de l'embryon (Establier et Pascual, 1983; Sen et Sunlu, 2007). Des expositions prolongées d'œufs de *S. officinalis* à des concentrations environnementales ont souligné l'importante capacité protectrice de la capsule de l'œuf jusqu'à la fin de l'embryogenèse (i.e. les deux tiers du temps nécessaire au développement). Les propriétés de cette enveloppe changent ensuite et permettent la pénétration de certains éléments (i.e. Ag, Zn, Hg, Mn, Co, Cd, Cs) jusqu'à l'éclosion, avec de potentiels effets délétères sur l'embryon (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2008b, 2009d, 2010b). Lacoue-Labarthe *et al.* (2010a) ont montré une inhibition par le Cd des activités d'enzymes liées à la digestion du vitellus (i.e. les phosphatases acides et les cathepsines), après 18 jours d'exposition à des concentrations supérieures ou égales à 31 ng L^{-1} (phosphatases acides), et 48 jours d'exposition à 610 ng L^{-1} (cathepsines). Une potentielle perturbation du système immunitaire (i.e. activités POs) sur ce stade de vie a été également mise en évidence suite à 50 jours d'exposition à $1,2 \mu\text{g Ag L}^{-1}$ ou $230 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2009a). Ces études ont souligné l'effet toxique de ces métaux sur le développement et l'immunité de l'embryon malgré la protection des enveloppes de l'œuf. De plus, des pertes de poids des juvéniles à l'éclosion ont été remarquées après 50 jours d'exposition à $0,06 \text{ ng Ag L}^{-1}$, 305 ng Cd L^{-1} et $23 \mu\text{g Cu L}^{-1}$, mettant clairement en évidence une sensibilité importante de ce stade de vie vis-à-vis de ces éléments (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2010a). Enfin, il a été récemment montré qu'une exposition pré- et post-éclosion de cet animal à un composé antidépresseur (la fluoxétine) peut perturber le comportement des juvéniles à partir d'une concentration de 1 ng L^{-1} (Di Poi *et al.*, 2013, 2014).

Ainsi, malgré l'étape critique que représente potentiellement le stade juvénile de *S. officinalis* et celui d'autres céphalopodes holobenthiques, l'induction de perturbations physiologiques par les métaux a fait l'objet de peu d'études. Bien que couramment utilisé sur les mollusques bivalves pour étudier l'impact de divers paramètres, le stress oxydatif (déséquilibre entre les systèmes prooxydants et antioxydants en faveur des premiers, source d'effets toxiques potentiels; Sies, 1997) commence simplement à être exploré chez les céphalopodes. Seules trois études ont rapporté l'influence de divers paramètres sur les activités d'enzymes impliquées dans la gestion du stress oxydatif sur ces animaux. Il a été mis en évidence que la température d'incubation des œufs, la teneur en oxygène dissous du milieu, et les concen-

trations tissulaires de différents métaux (i.e. Cd, Cu, Pb, Zn) peuvent induire un stress oxydatif (Rosa *et al.*, 2012; Trübenbach *et al.*, 2013; Semedo *et al.*, 2012). Certains métaux sont connus pour induire directement ou indirectement une production de ROS (e.g. Ag, Cd, Cu, Fe). Cette synthèse ayant lieu dans l'ensemble des cellules des organismes aérobies, de nombreux mécanismes de régulation existent, parmi lesquels 1) l'élimination des catalyseurs de la formation de ROS, et 2) l'élimination des ROS eux-mêmes.

Par exemple, l'enzyme glutathion S-transférase (GST) catalyse la conjugaison du GSH avec des composés électrophiles comme les formes ioniques des éléments traces, empêchant ainsi leur réaction avec d'autres composés cellulaires pouvant induire la formation de ROS (fig. 1.14). Les superoxydes dismutases (SOD) et les catalases agissent en cascade sur deux types de ROS : l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les SOD cytosoliques sont des métalloenzymes à Cu et Zn qui catalysent la réduction d' $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 , tandis que les catalases, qui sont des oxydoréductases à quatre hèmes, réduisent l' H_2O_2 en H_2O et O_2 (fig. 1.15).

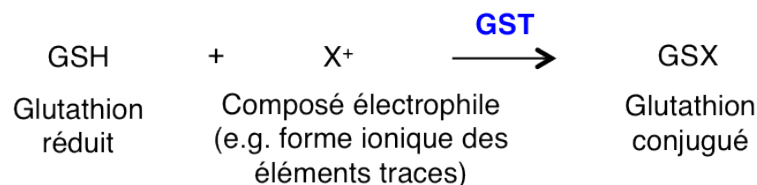


FIGURE 1.14 – Réaction catalysée par la glutathion S-transférase.

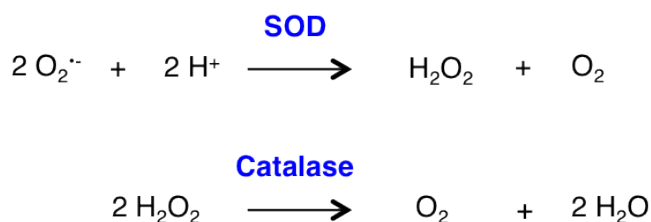


FIGURE 1.15 – Réactions catalysées par la superoxyde dismutase et la catalase.

Ainsi, ces deux enzymes permettent de limiter l'interaction de ces radicaux avec d'autres composés (e.g. protéines, lipides, polysaccharides, acides nucléiques). Une surproduction de ROS et/ou une perturbation des systèmes de régulation peut induire une toxicité qui se traduit la plupart du temps par des dommages tissulaires, notamment au niveau des membranes biologiques (appelés lipoperoxydation (LPO) ou peroxydation lipidique). Ce phénomène de

dégradation est couramment quantifié afin d'estimer le déséquilibre entre actions liées aux ROS et défenses antioxydantes.

Chez les céphalopodes, les processus permettant la régulation du stress oxydatif (e.g. GST, SOD, catalase) ainsi que les éventuelles conséquences de ce stress (e.g. LPO) induits par des contaminants n'ont jamais été suivis en conditions contrôlées.

1.4 Objectifs de l'étude et organisation du manuscrit

Dans le cadre du projet CHRONEXPO, les travaux effectués pendant cette thèse ont visé à étudier, d'une part, les perturbations physiologiques engendrées par le Zn sur le stade juvénile de la seiche *S. officinalis* au cours de sa vie côtière, et d'autre part, à développer les connaissances relatives aux cellules responsables de l'immunité chez cet animal, dans le but de mettre en place des tests de toxicité *in vitro*.

Dans le contexte présenté précédemment, les questions abordées dans cette étude sont les suivantes :

- Quelle est la sensibilité du stade juvénile de *Sepia officinalis* vis-à-vis du Zn dissous ?
- Quelles sont les perturbations induites par le Zn dissous à des concentrations non létales sur le développement du juvénile exposé un à deux mois ? La maturation de la glande digestive induit-elle des modifications de sensibilité et/ou de régulation du Zn ? Le système immunitaire est-il affecté ? Certains marqueurs sont-ils plus pertinents ?
- L'accumulation du Zn dissous par la seiche juvénile peut-elle induire une modification de l'homéostasie métallique globale ? Les MTs sont-elles impliquées dans cette gestion à ce stade de vie ? L'exposition au Zn induit-elle un stress oxydatif ? Si oui, à quel niveau et par quel mécanisme ?
- Dans quelle mesure est-il possible de réaliser une contamination trophique prolongée ?
- Quelle est la formulation hémocytaire de *S. officinalis* ? Est-il envisageable d'utiliser ces cellules dans le cadre d'études *in vitro*, notamment en écotoxicologie ?

Ce manuscrit sera organisé de la façon suivante :

1. La partie II présente un travail préliminaire qui nous a permis de mieux appréhender le rôle de trois enzymes classiquement utilisées pour étudier le système immunitaire des invertébrés (i.e. les phénoloxydases, lysozymes et inhibiteurs de protéases) chez la seiche.
2. La partie III développe l'étude des effets toxiques du Zn sur différents processus physiologiques du juvénile :
 - Le chapitre 3 décrit les travaux menés afin d'estimer la sensibilité de ce stade de vie vis-à-vis du Zn et d'étudier de potentiels impacts, létaux ou non, d'expositions prolongées sur la croissance, le comportement, et les systèmes immunitaires et digestifs ;
 - Le chapitre 4 s'intéresse à l'impact d'expositions d'une durée de un à deux mois, à des concentrations non létales en Zn, sur l'homéostasie des métaux dans les juvéniles, le stress oxydatif et la synthèse de MTs ;
 - Le chapitre 5 présente des essais préliminaires d'élevage et d'accumulation du Zn dans un crustacé adapté à l'alimentation des premiers stades de vie du juvénile de seiche.
3. La partie IV rapporte les études menées sur la composante cellulaire du système immunitaire de *Sepia officinalis* :
 - Le chapitre 6 présente la caractérisation des hémocytes de seiche ;
 - Le chapitre 7 décrit les essais de mise en culture des hémocytes et la réalisation de quelques tests de toxicité.

Deuxième partie

Distribution du système
prophénoloxydase, des lysozymes et des
inhibiteurs de protéases dans les tissus
de la seiche commune *Sepia officinalis*

Préambule

Cette partie s'inscrit dans une démarche de développement de nos connaissances relatives à l'immunité de la seiche et plus globalement à celle des céphalopodes. Il s'agit de travaux préliminaires visant à 1) déterminer la localisation de trois enzymes classiquement impliquées dans le système immunitaire des invertébrés (i.e. les phénoloxydases, les lysozymes et les inhibiteurs de protéases), et 2) mieux appréhender leurs rôles en tant qu'acteurs du système immunitaire de *Sepia officinalis*, afin de 3) déterminer la pertinence de l'utilisation de ces enzymes dans l'étude de l'impact du Zn sur le système immunitaire de la seiche juvénile.

En raison de leurs très petites tailles, il est difficile de réaliser des dosages enzymatiques sur les organes de juvéniles de seiche au cours des premières semaines de vie post-éclosion sans recourir à un très grand nombre d'individus. Les dosages enzymatiques sont donc couramment réalisés sur individu entier. Cette démarche ne pose pas de problèmes en ce qui concerne la quantification d'enzymes digestives car leurs rôles et zones de synthèse sont connus. En revanche, les enzymes dites "immunitaires" ont une spécificité d'action moindre, c'est pourquoi leur dosage est généralement réalisé sur des compartiments spécifiques (e.g. sang chez les vertébrés, hémolymph chez les invertébrés). Le prélèvement de tels compartiments étant particulièrement difficile à mettre en œuvre sur la seiche juvénile, nous sommes partis du postulat selon lequel le système immunitaire de ce stade de vie fonctionne de façon similaire à celui de l'adulte, et nous avons donc choisi de doser les activités des phénoloxydases, lysozymes et inhibiteurs de protéases sur treize compartiments de *S. officinalis* adulte. Les méthodes de dosage des lysozymes et des inhibiteurs de protéases étant connus au laboratoire, nous nous sommes consacrés au développement du dosage des phénoloxydases ainsi qu'à leurs formes inactives, les prophénoloxydases.

Chapitre 2

Prophenoloxidase system, lysozyme and protease inhibitor distribution in the common cuttlefish *Sepia officinalis*

Charles Le Pabic^{*a,b,c}, Georges Safi^{*a,b,c}, Antoine Serpentine^{a,b,c}, Jean-Marc Lebel^{a,b,c}, Jean-Paul Robin^{a,b,c}, Noussithé Koueta^{a,b,c}

Comparative Biochemistry and Physiology - part B : Biochemistry & Molecular Biology 172-173 (2014) 96-104

^a Normandie Université, F-14032 Caen, France

^b UMR BOREA, MNHN, UPMC, UCBN, CNRS-7028, IRD-207, IBFA Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la Paix, CS 14032, 14032 Caen cedex, France

^c Centre de Recherches en Environnement Côtier, Université de Caen Basse-Normandie, 54 rue du Docteur Charcot, 14530 Luc-sur-Mer, France

* These authors contributed equally to the study

Abstract

The immune system of cephalopods remains poorly understood. The aim of this study was to determine the specific activity of immune enzymes in epithelial barriers, circulatory and digestive systems of the common cuttlefish *Sepia officinalis*. Three enzyme groups with putative functions in immunity were investigated : phenoloxidases (POs), lysozymes and protease inhibitors (PIs). Consistent with role in immunity, highest PO activities were found in the integument as well as the respiratory and circulatory organs under zymogenic (proPO) and active form. Surprisingly, high PO activities were also found in the digestive gland and its appendages. Similarly, high lysozyme activities were detected in the integument and circulatory organs, but also in the posterior salivary glands, highlighting the implication of this antibacterial enzyme group in most tissues exposed to the environment but also within the circulatory system. Albeit highest in digestive organs, the ubiquitous detection of PI activity in assayed compartments suggests immune function(s) in a wide range of tissues. Our study reports proPO/PO, lysozyme and PI distributions in *S. officinalis* body compartments for the first time, and thus provides the fundamental basis for a better understanding of the humoral immune system in cephalopods as well as invertebrates.

Keywords : Immune system ; Lysozymes ; Prophenoloxidase system ; Protease inhibitors ; *Sepia officinalis*.

2.1 Introduction

Most aquatic organisms inhabit environments rich in bacteria and other microorganisms. Unlike air, water functions as a medium for both transport and growth of microbes (Gomez *et al.*, 2013; Hansen et Olafsen, 1999; McFall-Ngai *et al.*, 2010). Thus a critical function of the immune system of aquatic organisms is to provide a protection against this constant pathogenic threat (Iwanaga et Lee, 2005). What adaptations of the immune system allow aquatic species to thrive in these conditions? Unlike vertebrates, invertebrates rely on innate immunological mechanisms alone as defense against pathogens (Loker *et al.*, 2004). Cell-mediated defense mechanisms are mainly carried out by hemocytes, which behave like macrophages (Heath-Heckman et McFall-Ngai, 2011), while humoral factors take part in various functions such as pathogen recognition, signaling pathway activation, and invader elimination (Wang *et al.*, 2013b). Among them, we chose to focus on (1) one of the most effective signaling pathway of invertebrates - the melanization cascade, (2) one well-known hydrolytic enzyme group involved in pathogen elimination - the lysozymes, and (3) components of the immune proteolytic cascade, the protease inhibitors (PIs) (Amparyup *et al.*, 2013; Cerenius *et al.*, 2008; Fiolka *et al.*, 2012; Herreweghe et Michiels, 2012; Rowley et Powell, 2007; Wang *et al.*, 2013b; Xue *et al.*, 2009).

While a major immune mechanism among many invertebrate taxa, melanization remains understudied in mollusks. It is involved in (1) non-self recognition, (2) production of toxic compounds against pathogens, (3) wound healing and (4) cellular-defense factor synthesis (e.g. Cerenius *et al.*, 2008; Luna-Acosta *et al.*, 2010; Siddiqui *et al.*, 2006). Phenoloxidases (POs), a family of copper (Cu) proteins catalyse the rate-limiting step in melanin production : oxidation or hydroxylation of phenols into quinones. Importantly, POs are synthesized as zymogenic form called prophenoloxidases (proPO) and activated by serine protease cleavage (Amparyup *et al.*, 2013; Cerenius et Söderhäll, 2004; Masuda *et al.*, 2012). Because of their immune functions highest PO levels are usually found in association with epithelial barriers, respiratory and circulatory systems in arthropods and bivalves (Asano et Ashida, 2001; Franssens *et al.*, 2008; Luna-Acosta *et al.*, 2011a; Masuda *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012).

Lysozymes cleave the 1,4- β -glycosidic linkage between N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid of bacteria cell walls in order to lyse the cell – a process used in both immune

defense and gastric digestion (Herreweghe et Michiels, 2012). Apart from this antimicrobial property, lysozymes interact with immune system compounds (e.g. complement pathway, lectins, proPO) to modulate or enhance humoral immune response (Goto *et al.*, 2007; Herreweghe et Michiels, 2012; Park *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2010; Wang et Zhang, 2010). Their chitinase activity is also used to ward off fungal infection (Herreweghe et Michiels, 2012). Consistent with these properties they are mainly associated with the epithelial barriers, respiratory and circulatory systems of numerous aquatic organisms such as bivalves and fish, and in some cases digestive tracts of bivalves because of their use of bacteria as food (Herreweghe et Michiels, 2012; Saurabh et Sahoo, 2008).

Finally, PIs aid in the defense of various organisms by regulating or inhibiting bacterial protease activities through interaction with their reaction sites or entrapment. PIs also play a central role in the regulation of a wide variety of immune processes including (1) hemolymph coagulation, (2) proPO activation and (3) synthesis of cytokines and antimicrobial peptides (Xue *et al.*, 2009). However, PIs also take part in other processes such as digestion, where protease regulation is necessary and are consequently not concentrated in tissues with immune functions.

Cephalopods are a highly derived group in the molluscan clade, with a complex nervous system allowing elaborate body patterning and behaviour, a deeply modified body plan organization, and highly diverse modes of life (Bassaglia *et al.*, 2013; Hanlon et Messenger, 1988). However little is known about their immune system (Castellanos-Martínez et Gestal, 2013; Ford, 1992). Furthermore, cephalopods possess anatomical peculiarities within mollusks such as a closed circulatory system with a central systemic heart (SH) and two branchial heart (BH) complexes (Schipf, 1987a), as well as clearly identified hematopoietic organs – the white bodies (WB) (Claes, 1996), suggesting immune pathway modifications. Yet, immune involvement of POs has never been studied in cephalopods, only one study reported lysozyme repartition in the octopod *Eledone cirrhosa* (Malham *et al.*, 1998b), and PI activity was mostly described in the plasma (Armstrong, 1992; Thøgersen *et al.*, 1992; Vanhoorelbeke *et al.*, 1994), and the digestive gland of several species (Ishikawa *et al.*, 1966; Kishimura *et al.*, 2010, 2001; Sof'ina *et al.*, 1988).

Based on previously described enzyme repartitions and roles, we hypothesized that (1) higher proPO/PO- and lysozyme-activities would be found in the circulatory system and

tissues directly exposed to the outer environment in *Sepia officinalis* : plasma, BH and their appendages (BHA), SH, WB, integument, mantle and gill, and (2) that PIs would be ubiquitous in *S. officinalis* compartments because of the general need to regulate proteases.

Here, we report the distribution of proPO/PO, lysozymes and PIs in 13 body compartments selected for their functions in circulation, respiration, immunity, digestion or as physical barriers in adult common cuttlefish : respiratory and circulatory compartments (gill, plasma, SH, BH, BHA, and WB), digestive organs (posterior salivary glands (PSG), stomach (Stc), cecum, digestive gland (DG) and its appendages (DGA)), and integument and mantle, as first epithelial barrier and underlying muscle tissue, respectively. Higher activated PO (APO)- and lysozyme-activities were mainly found in the integument, circulatory and respiratory organs consistent with a role in immunity. In addition, we found high PO-activities in the DG, potentially highlighting its role(s) in protection of the digestive tract against infections and/or hemocyanin (Hcy) metabolism. Lastly, higher PI-activities were mostly found in digestive system organs despite their presupposed ubiquitous repartition.

2.2 Material and methods

2.2.1 Animals and tissue samples

Ten adult common cuttlefish *S. officinalis* (mean $\pm$ standard deviation ; weight = 1.03 ± 0.38 kg ; dorsal mantle length = 21.3 ± 3.5 cm) were obtained from traps deployed along the Calvados coast (Basse-Normandie, France) during summer 2012. Prior to experimentation, the animals were maintained in 4500-liter tanks in an open seawater circuit and starved for 24 h at 15°C at the Centre de Recherches en Environnement Côtier (C.R.E.C., Luc-sur-Mer, Basse-Normandie, France).

In order to study basal enzymatic activities in cuttlefish tissue, we used animals without visible wounds, with normal swimming behavior and predatory behavior display upon prey presentation. We also carefully visually checked for the absence of macroscopic parasites in animals and organs sampled. Following ethical procedures (Directive 2010/63/EU), cuttlefish were anesthetized as described by Andrews *et al.* (2013) through placement for 10 min in seawater containing 2 % ethanol. Five milliliter hemolymph was then withdrawn from anterior mantle vein (King *et al.*, 2005) using syringe with 18-gauge needle and kept in ice, and animals

killed by rapid decapitation. Digestive gland, DGA, PSG, Stc, cecum, WB, SH, gill, BHs and BHA were then harvested and placed on ice. In addition, pieces of mantle and integument (with associated mucus) were sampled (Figure 2.1). At the end of the dissection, tissues were rinsed in cold extraction buffers and kept at -80°C until enzyme extraction. Hemolymph samples were centrifugated at 500 *g* to separate plasma and hemocyte fractions, and cell-free plasma was stored at -80°C until analysis.

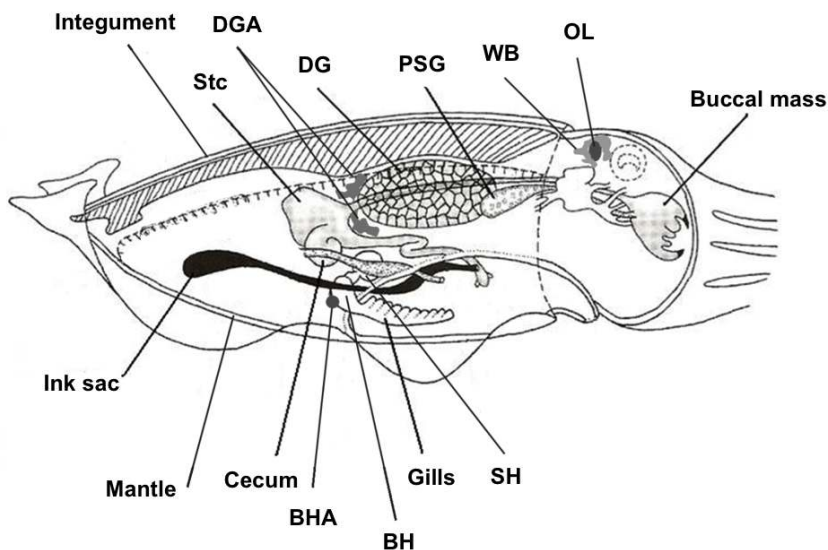


FIGURE 2.1 – Internal anatomy of cuttlefish *Sepia officinalis*, with studied tissues. BH : branchial hearts, BHA : branchial heart appendages, SH : systemic heart, DG : digestive gland, DGA : digestive gland appendages, PSG : posterior salivary glands, Stc : stomach, WB : white bodies (modified after Boyle et Rodhouse, 2005).

2.2.2 Chemicals

Aprotinin, $\text{N}\alpha$ -benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA), bovin serum albumin (BSA), Bradford reagent, calcium chloride (CaCl_2), citric acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), dimethyl sulfoxide (DMSO), hen egg white (HEW) lysozyme, 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA), magnesium chloride (MgCl_2), freeze-dried *Micrococcus lysodeikticus*, Protease Inhibitor Cocktail, sodium chloride (NaCl), sodium phosphate dibasic dihydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), trizma base, trizma hydrochloride (Tris-HCl), tropolone and trypsin TPCK (N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone) were obtained from Sigma-Aldrich (France). Halt Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free (100X) was obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA).

2.2.3 Enzyme extraction

Tissue samples were weighed before to be ground in liquid nitrogen. Once a fine powder was obtained, the sample was homogenised in a known amount (10 mL to 1 g) of cold Tris buffer pH 8 (10 mM Tris-HCl and 150 mM NaCl) for lysozyme and PI assays (Safi, 2013) or Tris buffer pH 7 (0.1 M Tris-HCl, 0.45 M NaCl, 26 mM MgCl₂ and 10 mM CaCl₂) for PO assay (Luna-Acosta, 2010). The mixture was homogenized, stored at 4°C for 1 h, and then centrifuged for 10 min at 15,000 *g* and 4°C. The resulting supernatant containing Tris soluble proteins was collected for enzymatic studies.

2.2.4 Biochemical analysis

2.2.4.1 Protein assay

All activities were expressed in relation to protein concentration measured according to the Bradford method (1976) using BSA as standard.

2.2.4.2 PO assay

In order to partly discriminate PO synthesis and activation site, we took care to avoid unwanted activation of proPO during each step of experiment. PO-like activity was measured spectrophotometrically by recording the formation of *o*-quinones, as described by Luna-Acosta (2010) with slight modifications to distinguish artificially activated PO (APO) (corresponding to PO-like activity resulting from zymogenic PO (proPO) activation plus already ‘active’ form) and *in vivo* ‘active’ PO form. PO assays were conducted in triplicate in 96-well flat bottom plates (BD, USA). L-DOPA was used as substrate, at a final concentration of 10 mM (Luna-Acosta, 2010), and prepared extemporaneously in Tris buffer pH 7 described above (section 2.2.3). Tropolone (10 mM) and trypsin TPCK (1 g L⁻¹) were used respectively as PO inhibitor and elicitor as described by Lacoue-Labarthe *et al.* (2009a) on *S. officinalis* embryo. To avoid uncontrolled proPO activation by tissue endogenous proteases, several wide spectrum PIs were tested : aprotinin (1 g L⁻¹), Protease Inhibitor Cocktail (D/100) and Halt Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free (1X). For each sample, non-enzymatic sample autoxidation, ‘basal’, ‘inhibited’ and ‘activated’ PO-like activities were measured. For non-enzymatic sample autoxidation, 10 μ L of sample was mixed with Tris buffer pH 7. For ‘basal’

PO-like activity, 10 μL of sample was firstly mixed during 10 min with 1.4 μL PI (100X), followed by adapted volume of Tris buffer pH 7 and 80 μL L-DOPA. Similarly, for inhibited or APO-like activity, 10 μL of sample was mixed with 10 μL of tropolone (140 mM) or trypsin TPCK (14 g L^{-1}), Tris buffer pH 7 and 80 μL L-DOPA. Each measurement was systematically controlled by replacing sample by buffer, always in a final reaction volume of 140 μL . Immediately after L-DOPA addition, PO-like activities were monitored at 25°C for 5 h using Mithras LB 940 luminometer (Berthold, Thoiry, France) at 490 nm (Luna-Acosta, 2010). When an inhibited PO-like activity was measured, this value was subtracted from APO and PO-like activities. Tropolone, with its Cu chelator and peroxidase substrate properties, ensured that PO-like activity alone was detected (and not peroxidase). Results were also systematically corrected for non-enzymatic autoxidation of the substrate and were expressed in enzyme unit (1 U) per mg of total protein. One U corresponded to an increase of 0.001 in the absorbance per min at 25°C (Thomas-Guyon *et al.*, 2009).

Preliminary assays showed similar effects on PO-like activity with aprotinin (1 g L^{-1}), Protease Inhibitor Cocktail (D/100) and Halt Protease Inhibitor Cocktail - EDTA-Free (1X), with concentrations inhibiting 1 g L^{-1} elicitor trypsin TPCK, which is much higher than maximal tissue intrinsic serine protease concentrations found in these compartments (not shown). Consequently, Halt Protease Inhibitor Cocktail - EDTA-Free was used in our study. The use of a PI Cocktail to avoid unwanted in vitro proPO activation by tissue endogenous proteases allowed to distinguish PO-like activities from already activated form when sampling occurred, and those from inactive zymogenic form proPO at the same moment. Therefore, in addition to activity levels, PO and APO-like activities informed us about proPO location and compartments where proPO activation occurs most often, i.e. compartments most submitted to uncontrolled elicitors (intern or extern).

2.2.4.3 Lysozyme assay

Lysozyme-like activity (EC 3.2.1.17) was quantified according to Malham *et al.* (1998) with slight modifications. Fifty microliters of HEW lysozyme (85 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in Tris buffer pH 8 described in section 2.2.3) standard was serially diluted and placed in triplicate in 96-well flat bottom plates (BD, USA), as well as 50 μL of each sample and 50 μL of Tris buffer pH 8, as blank. One hundred and fifty μL of the substrate, *M. lysodeikticus* [0.075

g/100 mL of phosphate/citrate buffer pH 5.8 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.45 g/250 mL distilled H_2O ; $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, 2.1 g/100 mL distilled H_2O ; NaCl , 0.09 g/100 mL buffer)], was then added to each well. The reductions in turbidity in the wells were read on Mithras LB 940 luminometer (Berthold, Thoiry, France) at 25°C for 5 minutes at 10 second intervals at 450 nm using negative kinetics. Lysozyme concentrations were calculated from the standard curve (μg HEW lysozyme equivalent mL^{-1}). Final lysozyme-like activity was thus expressed as μg HEW lysozyme eq. mg protein^{-1} .

2.2.4.4 PI assay

As described by Malham et al. (1998) and Thompson et al. (1995), PI activity was measured by transferring 20 μL of sample and 10 μL of trypsin TPCK (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of 0.05 M Tris buffer pH 8) in 96-well flat bottom plates (BD, USA), and mixed at room temperature for 5 minutes. In parallel, intrinsic trypsin activity was measured by replacing 10 μL of trypsin by Tris buffer pH 8 described in section 2.2.3. A positive control was used by replacing the sample with Tris buffer pH 8. Two hundred microliters of BAPNA substrate solution (5.2 mg BAPNA mL^{-1} DMSO in 10 mL of 0.01 M trizma base buffer pH 7.4) was added to each well and incubated for 15 minutes at room temperature. Absorbance was read at 405 nm using Mithras LB 940 luminometer (Berthold, Thoiry, France), and PI activity was expressed as the percentage of sample trypsin inhibition (TI) compared to the positive control. As most proteinaceous PIs specifically inhibit proteolytic enzymes of one of four mechanistic classes (i.e., aspartic proteases, cysteine proteases, metalloproteases and serine proteases) by interacting with their reactive sites, this assay allowed quantifying serine PIs (Xue et al., 2009). PI activity = $[\text{O.D.}_{405\text{nm}} (\text{sample} + \text{trypsin} + \text{S}) - \text{O.D.}_{405\text{nm}} (\text{sample} + \text{S})] / \text{O.D.}_{405\text{nm}} (\text{trypsin} + \text{S}) \times 100$. Final activity was expressed as TI % μg of protein $^{-1}$.

2.2.5 Statistical analysis

All results are given as mean $\pm$ standard error (SE) for adult organs. Residual distribution was tested for normality (Shapiro test) and homogeneity of variances (Levene test). In some cases, logarithmic (Log_{10}) or reciprocal transformations were used to meet the underlying assumptions of normality and homogeneity of variances. For normal values, one-way analysis of variance (ANOVA) were used followed by non parametric pairwise permutational t -tests

($N < 30$). Significant differences between PO-like and APO-like activities were tested for each organ with a Student's t -test. Statistical significance threshold was set at $p < 0.05$. R software was used for statistics and graphics.

2.3 Results and discussion

2.3.1 APO- and PO-like activity distribution and potential functions

Based on previously described enzyme repartitions and roles (i.e. non-self recognition, production of toxic compounds against pathogens, wound healing and cellular-defense factor synthesis), we hypothesized that higher proPO/PO-activity would be found in the circulatory system and tissues directly exposed to the outer environment in *S. officinalis*.

The highest APO-like activity was measured in the integument (12.2 ± 1.5 U mg prot⁻¹), consistent with its role as first epithelial barrier (Figure 2.2). A role of POs in cuttlefish wound healing was suggested by tissue thickening and darkening (Harms *et al.*, 2006) similar to the proPO induced sclerotization and pigmentation process of the insect cuticle (Arakane *et al.*, 2005; Pryor, 1940). Apart from their roles in immunity, POs may be involved in cuttlefish body patterning by chromatophore melanogenesis although melanin presence as pigment in the cephalopod integument remains controversial (see Messenger, 2001). Future studies will have to determine PO implication in one or both processes in *S. officinalis* integument as already shown in vertebrates (Haffner et Wieser, 1981; Mackintosh, 2001; Zanna *et al.*, 2009). It is also noteworthy that the mantle, the main body part in direct contact with the integument did not present any PO activity, suggesting local proPO synthesis. Similar PO repartition was recently reported in bivalve mollusks with high and low activities in mantle and muscle, respectively (Luna-Acosta *et al.*, 2011b; Zhou *et al.*, 2012).

In the plasma, POs and Hcy share a structurally and functionally equivalent active site (Campello *et al.*, 2008), yet POs are synthesized as inactive zymogenic form while Hcy is not. In addition, Hcy constitutes more than 90 % of the total plasma protein content (D'Aniello *et al.*, 1986; Ghiretti, 1966; Mangold et Bidder, 1989a). Consequently, parallel assays of APO- and PO-activities allowed to distinguish between Hcy- and non-Hcy-associated PO activities, as PO-activity mostly resulted from Hcy oxidation (Siddiqui *et al.*, 2006). The plasma was

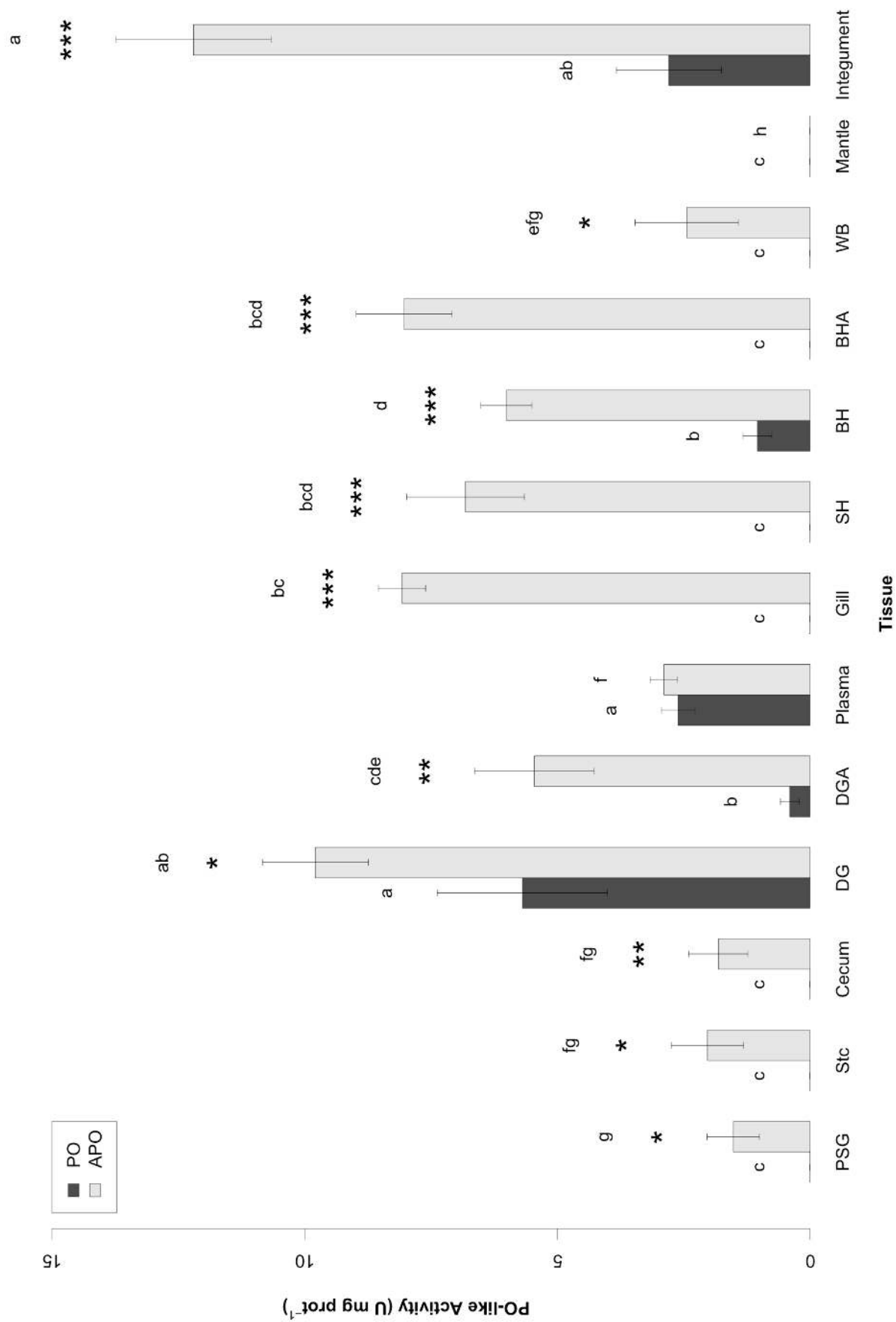


FIGURE 2.2 – PO-like and APO-like activities (U mg prot⁻¹) in 13 body compartments of cuttlefish *Sepia officinalis*. BH : branchial hearts, BHA : branchial heart appendages, SH : systemic heart, DG : digestive gland, DGA : digestive gland appendages, PSG : posterior salivary glands, Stc : stomach, WB : white bodies. The bars represent the means ($\pm$ SE) of 10 animals. Subscript letters indicate one-way ANOVA results within each activity group (PO- or APO-like) : bars with same subscript letter are not significantly different ($p < 0.05$). *, **, and ***, indicate significant PO- and APO-like activity differences in each organs for $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

indeed the only compartment where PO- and APO-like activities were similar (2.6 ± 0.3 U mg prot⁻¹), strongly suggesting that (1) plasma PO-activity was mostly Hcy-associated and that (2) PO-activity from other compartments is mostly associated with PO enzymes. It is thus interesting to note that, except for the mantle, all studied compartments presented some APO-like activity, consistent with a wide role of POs in cuttlefish immunity (Figure 2.2). The previously suggested lectin role of Hcy and the Hcy-derived PO activity found in our study, as well as in other cephalopods, are consistent with recently reviewed roles of Hcy as an integral component of invertebrate innate immunity and suggest a function in immune response trigger (Alpuche *et al.*, 2010; Amparyup *et al.*, 2013; Campello *et al.*, 2008; Coates et Nairn, 2014; Rögner *et al.*, 1985; Siddiqui *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2013b).

Organs of the respiratory and circulatory systems presented similar APO-like activities around 7 U mg prot⁻¹ (except WB) with only PO-like activity found in BH (1.0 ± 0.3 U mg prot⁻¹). Such results are consistent with PO role(s) associated with the immune system : non-self recognition, antibacterial compound synthesis and production of factors stimulating cellular defense (Cerenius *et al.*, 2008; Söderhäll et Cerenius, 1998). The low PO-like activity measured in BH could not be ascribed to either Hcy or POs, because of the role of BH cells (i.e. rhogocytes and adhesive hemocytes) in hemolymph epuration of xenobiotics and allogenic substances (Beuerlein et Schipp, 1998; Beuerlein *et al.*, 2002a), and their involvement in Hcy catabolism suggested by Beuerlein *et al.* (1998). Finally, high APO-activity with lack of ‘basal’ PO-like activity in BHA was consistent with the Hcy extracellular storage suggested by Beuerlein *et al.* (2000). WB APO-like activity (2.4 ± 1.0 U mg prot⁻¹) suggested proPO presence in hemocytes before their release in cuttlefish plasma.

As expected, APO- and PO-like activities measured in the digestive system were lower than in other systems, except for the DG-DGA complex (9.8 ± 1.0 and 5.5 ± 1.2 U mg prot⁻¹, respectively), which presented higher APO-like activities than Stc, cecum and PSG (2.0 ± 0.7 , 1.8 ± 0.6 and 1.5 ± 0.5 U mg prot⁻¹, respectively). DGA are known to carry out 2 main roles in *S. officinalis* ; absorption of small molecules from digestion (Boucaud-Camou et Boucher-Rodoni, 1983; Boucaud-Camou, 1973), and osmoregulation via salts and water absorption to maintaining the internal hyperosmotic status of cephalopods (Schipp et von Boletzky, 1976; Wells et Wells, 1989). Since no known link exists between PO function and digestion, DGA-associated proPO may reflect a role in the immune response, perhaps by

providing protection against pathogen exposure from oral or rectal uptake of seawater, which occurs without exposure to digestive enzymes. In the case of the DG, PO-like activities were previously detected in mollusk DGs but no tissue-specific function was proposed (Blaschko et Hawkins, 1952; Blaschko, 1941; Luna-Acosta *et al.*, 2011b,a). In cephalopods, most of reported parasite infections (i.e. coccidians of the genus *Aggregata*, cestodes, trematodes, nematodes) were found in the digestive tract (reviewed in Castellanos-Martínez et Gestal, 2013; Hochberg, 1990). Because of (1) the high efficiency of melanization against parasites (Rao *et al.*, 2010), (2) the important secretory ability of the DG and (3) its central position in the digestive tract, we propose that the DG may serve as proPO reservoir to fight this type of infection. In addition, the ability of some POs (i.e. laccases) to catalyze aromatic oxidation (Dodor *et al.*, 2004; Luna-Acosta *et al.*, 2011a) and the high PO-like activities found in the DG may also be linked to the detoxification of these compounds known to be highly accumulated in cephalopods (e.g. Ansari *et al.*, 2012; Won *et al.*, 2009; Yamada *et al.*, 1997). In contrast, high PO-like activity (5.7 ± 1.7 U mg prot⁻¹) reflects a potential role in Hcy Cu-metabolism. Because of its high Cu content (Bustamante *et al.*, 2006a; Miramand et Bentley, 1992; Miramand et Guary, 1980; Schipp et Hevert, 1978), many studies suggested a DG implication in Hcy metabolism in *S. officinalis* (Costa *et al.*, 2014; Decleir *et al.*, 1978; Lemaire *et al.*, 1977; Martoja et Marcaillou, 1993; Schipp et Hevert, 1978), as demonstrated in DG relatives (i.e. hepatopancreas and midgut gland) of arthropods, gastropods, and cephalopods (Burmester, 2002; Manubens *et al.*, 2010; Ruth *et al.*, 1996). In *S. officinalis*, Cu-free Hcy synthesis takes place mainly in branchial glands (Schipp et Hevert, 1978; Schipp *et al.*, 1973), but the organ where Cu-binding takes place has not been clearly determined (Decleir *et al.*, 1976; Schipp et Hevert, 1978). Based on (1) low free form Cu concentration found in the hemolymph (D’Aniello *et al.*, 1986), (2) the association of Cu with Hcy-size proteins in the DG (Bustamante *et al.*, 2006a; Rocca, 1969), and (3) the Hcy exchanges taking place across the DG basal membrane (Martoja et Marcaillou, 1993), our data (PO-like activity) add up to this mounting evidence that the DG may function as Cu-binding site for Hcy.

Our results are consistent with role(s) of POs in cuttlefish immunity with high activities found in circulatory system organs and integument as tissue directly exposed to environment. High activities found in DG complex organs will need further investigations to better define PO role(s) at this location, with potential links with detoxification and Hcy metabolism.

2.3.2 Lysozyme distribution

As with PO/proPO, we hypothesized that higher lysozyme-activities would be found in the circulatory system and tissues directly exposed to the outer environment in *S. officinalis* : plasma, BH and their appendages (BHA), SH, WB, integument, mantle and gill. All compartment samples indicated some lysozyme-like activities, except for the DGA (Figure 2.3). Our results support our hypothesis and highlight the importance of lysozymes in circulatory system organs and epithelial barriers, but also in one organ involved in digestive processes, the PSG. As with APO activity, one of the highest levels was found in the integument with lower activity in the mantle (2.2 ± 0.9 and $0.9 \pm 0.3 \mu\text{g HEW lysozyme eq. mg prot}^{-1}$, respectively). This high level is likely linked to the constant integument exposure to high numbers of opportunistic pathogens in water as described in fish skin (Hikima *et al.*, 2001; Saurabh et Sahoo, 2008; Ghafoori *et al.*, 2014). Similarly, important lysozyme activity or mRNA expression have been detected in mantle of gastropod *Halotis discus discus* (Bathige *et al.*, 2013) and bivalve mollusks *Venerupis philippinarum* (Zhao *et al.*, 2010), *Crassostrea virginica* (Itoh et Takahashi, 2007) and *C. gigas* (Itoh *et al.*, 2010). This localization is thus consistent with previous descriptions in fish and bivalve mollusks and may reflect lysozyme activity in neutralizing pathogens after injuries or bacterial infection.

In the circulatory system, lysozyme-like activity was found in SH, WB, BHA and BH (1.7 ± 0.5 , 1.4 ± 0.4 , 1.3 ± 0.5 and $0.8 \pm 0.2 \mu\text{g HEW lysozyme eq. mg protein}^{-1}$, respectively), but not in the plasma (<0.1). These results parallel lysozyme-like activities found in the BH complex of the cephalopod *E. cirrhosa* (Malham *et al.*, 1998b) and the role of endocytotic-active cells made up BH complex in purifying the hemolymph from allogenic compounds (Beuerlein et Schipp, 1998; Beuerlein *et al.*, 2002a; Schipp et Hevert, 1981). The absence of lysozyme-like activity found in the plasma supports our previous finding of hemolymph lysozyme in hemocytes alone (Le Pabic *et al.*, 2012), but contrast with those found in the octopods *E. cirrhosa* and *Octopus vulgaris* (Grimaldi *et al.*, 2013; Malham, 1996). The high activity found in WB – the site of hemocyte formation, is consistent with the previously suggested association of mature hemocytes (80 % of adult cuttlefish WB) with lysozyme-like enzymes (Claes, 1996). Globally, the high lysozyme activities found in cuttlefish circulatory organs suggested not only intracellular action after endocytosis but also secretion in plasma as previously described in bivalves (Cheng *et al.*, 1977, 1975). Apart from its bactericidal

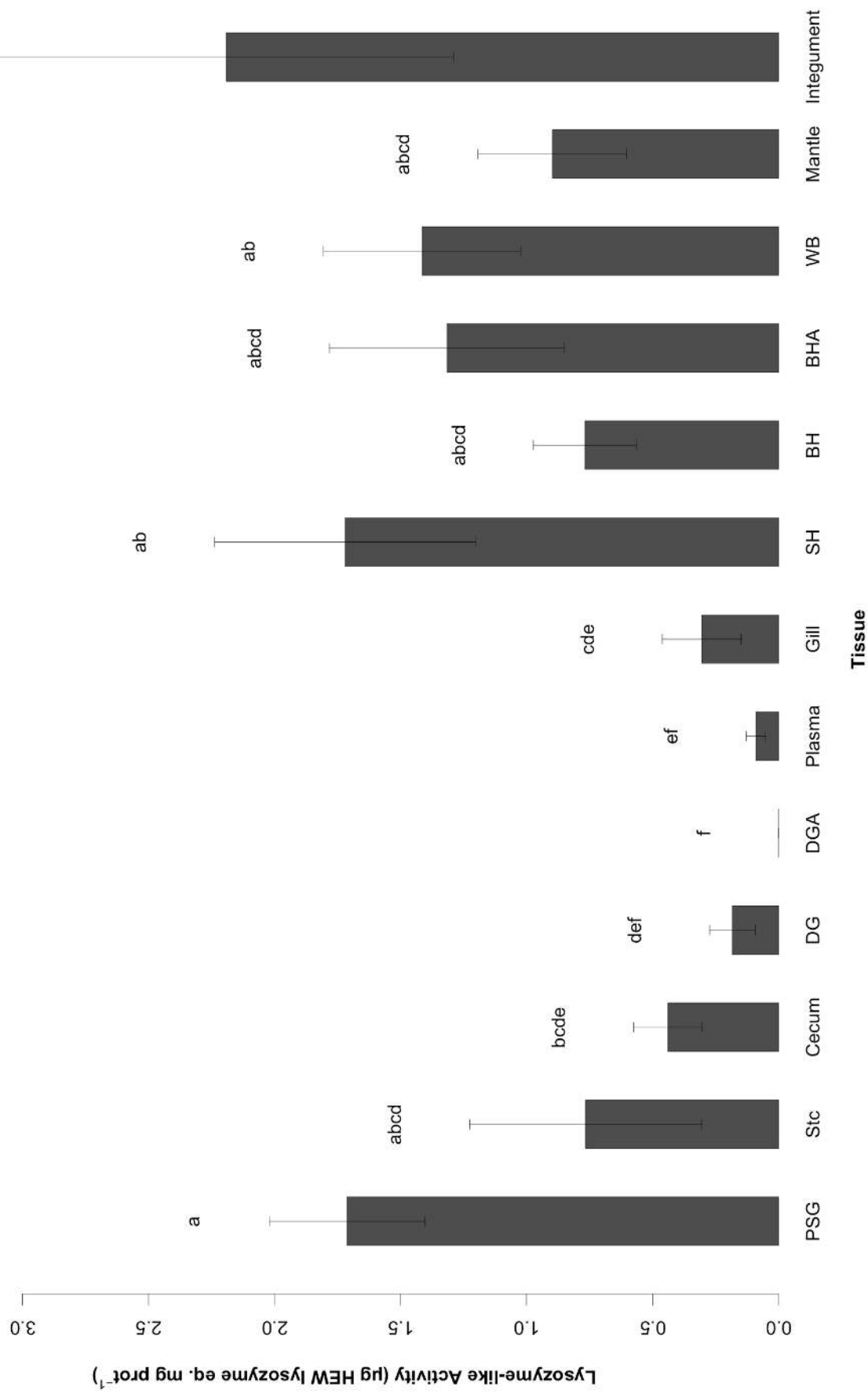


FIGURE 2.3 – Lysozyme-like activity ($\mu\text{g HEW Lysozyme eq. mg prot}^{-1}$) in 13 body compartments of cuttlefish *Sepia officinalis*. BH : branchial hearts, BHA : branchial heart appendages, SH : systemic heart, DG : digestive gland, DGA : digestive gland appendages, PSG : posterior salivary glands, Stc : stomach, WB : white bodies. The bars represent the means ($\pm \text{SE}$) of 10 animals. Bars with same subscript letter are not significantly different ($p < 0.05$).

activity, some studies highlighted the lysozyme property as modulator of the immune response by interacting with compounds such as the complement pathway or lectins (e.g. Park *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2010; Wang et Zhang, 2010; Wilson et Ratcliffe, 2000). In order to investigate more deeply lysozyme roles in cuttlefish immunity, it will be interesting to confirm such secretion in plasma and to determine its triggering parameters (e.g. infection, stress).

Surprisingly gill activity ($0.3 \pm 0.2 \mu\text{g HEW lysozyme eq. mg prot}^{-1}$) was among the lowest activity found whereas it is an organ (1) constantly exposed to water and therefore potential pathogens and (2) with inner folded epithelia suggesting some excretory function (Schippe et von Boletzky, 1975; Schippe *et al.*, 1979, 1971). This low activity may result from the healthy state of sampled cuttlefish. It could be thus interesting to follow potential increase of lysozyme-like activity in cuttlefish gill following an exposure to bacterial contamination, as shown in fish (Larsen *et al.*, 2009; Mai *et al.*, 2014) and abalone (Bathige *et al.*, 2013).

Among digestive system organs, highest activity was found in the PSG ($1.7 \pm 0.3 \mu\text{g HEW lysozyme eq. mg prot}^{-1}$), which was significantly higher than in cecum, DG (0.4 ± 0.1 and $0.2 \pm 0.1 \mu\text{g HEW lysozyme eq. mg prot}^{-1}$, respectively) and DGA. Such results are consistent with lytic lysosomal enzyme activities reported in the cephalopod *E. cirrhosa* anterior salivary glands (Malham *et al.*, 1998b), and octopod and oegopsid squid paralarvae PSG (Boucaud-Camou et Roper, 1995). PSG-associated lysozyme-like enzymes may be involved in (1) venom diffusion, (2) “external” digestive processes (Boucaud-Camou et Roper, 1995), (3) plasma depuration (Stuart, 1968), and/or (4) to prevent digestive duct infection. This last possibility is consistent with the decreasing lysozyme-like activity found between the PSG and the cecum, which may result from PSG excretions from uncompleted digestion due to the short time period between cuttlefish fishing and dissection, the low holding temperature (15°C), and the few secretion ability of Stc (Boucaud-Camou, 1973). Moreover, due to their known chitinase property in certain invertebrates, lysozymes from PSG could also contribute to shell digestion of crustaceans –the most important cuttlefish meal (Goto *et al.*, 2007; Herreweghe et Michiels, 2012).

2.3.3 PI distribution

Because of the general need to regulate proteases, we hypothesized a ubiquitous distribution of PIs in *S. officinalis* compartments. Our results support this hypothesis as PI activity

was found in all studied compartments, albeit significant differences were found (Fig. 2.4). As previously described in the squid *Loligo vulgaris* (Tschesche et von Rücker, 1973), PI activity was highest in digestive system organs – DG, DGA, Stc and cecum, where proteolytic enzymes (as serine proteases) play a major role in *S. officinalis* (Perrin, 2004; Balti *et al.*, 2012, 2009; Boucaud-Camou, 1974). Consistent with its role in digestive enzyme synthesis (proteases)(Boucaud-Camou, 1974), highest PI activity was found in the DG (2.2 ± 0.2 TI % $\mu\text{g prot}^{-1}$), as previously shown in cephalopods (Ishikawa *et al.*, 1966; Kishimura *et al.*, 2010, 2001; Sof'ina *et al.*, 1988). PI activities found in the DGA, Stc and cecum (1.8 ± 0.3 , 1.7 ± 0.4 , 1.5 ± 0.4 TI % $\mu\text{g prot}^{-1}$) might mostly result mainly from DG enzymatic excretions. Indeed, among these three organs, protease synthesis was clearly highlighted in cecum epithelial cells alone, but in much lower amounts than in the DG (Boucaud-Camou, 1974). The absorption function of the cecum implies a prolonged contact with digestive fluids enriched in DG proteases (Boucaud-Camou, 1973). Therefore, a need to control and/or protect cecum epithelia against proteases may constitute a role for associated PI-activity. Lastly, it was previously argued that DGA-associated proteolytic activity is likely to result from extrinsic sources because to its function (1) as excretory route for enzymes and digestive fluids between DG, Stc and cecum (Boucaud-Camou, 1974; Boucaud-Camou et Boucher-Rodoni, 1983), but also (2) as main absorption site for small molecules from protease rich digestive fluid (Boucaud-Camou, 1973). Finally, no digestive enzymatic activity has been found in Stc epithelium by Boucaud-Camou (1973), but this organ involved in mechanical digestion collects enzyme excretion from DG and probably from PSG (Boucaud-Camou et Boucher-Rodoni, 1983). Concerning PSG, the detected activity may be involved in the regulation of proteases present in the cephalopod saliva (Malham *et al.*, 1998b) such as chymotrypsin, which is concentrated in this tissue (Perrin, 2004). However cephalopod salivary glands are also known to contain biologically active amines and toxins (Boucaud-Camou et Boucher-Rodoni, 1983; Boyle et Rodhouse, 2005; Fry *et al.*, 2009; Nagai, 2012; Undheim *et al.*, 2010), and PIs may have a synergistic effect with toxins as described for proteases in *E. cirrhosa* saliva (Grisley et Boyle, 1987). This suggests the presence of different PIs in this tissue than in other digestive organs.

PI activities were lower in remaining compartments. Similar PI activities averaging at 0.5 TI % $\mu\text{g prot}^{-1}$ were found in all respiratory and circulatory compartments as previously

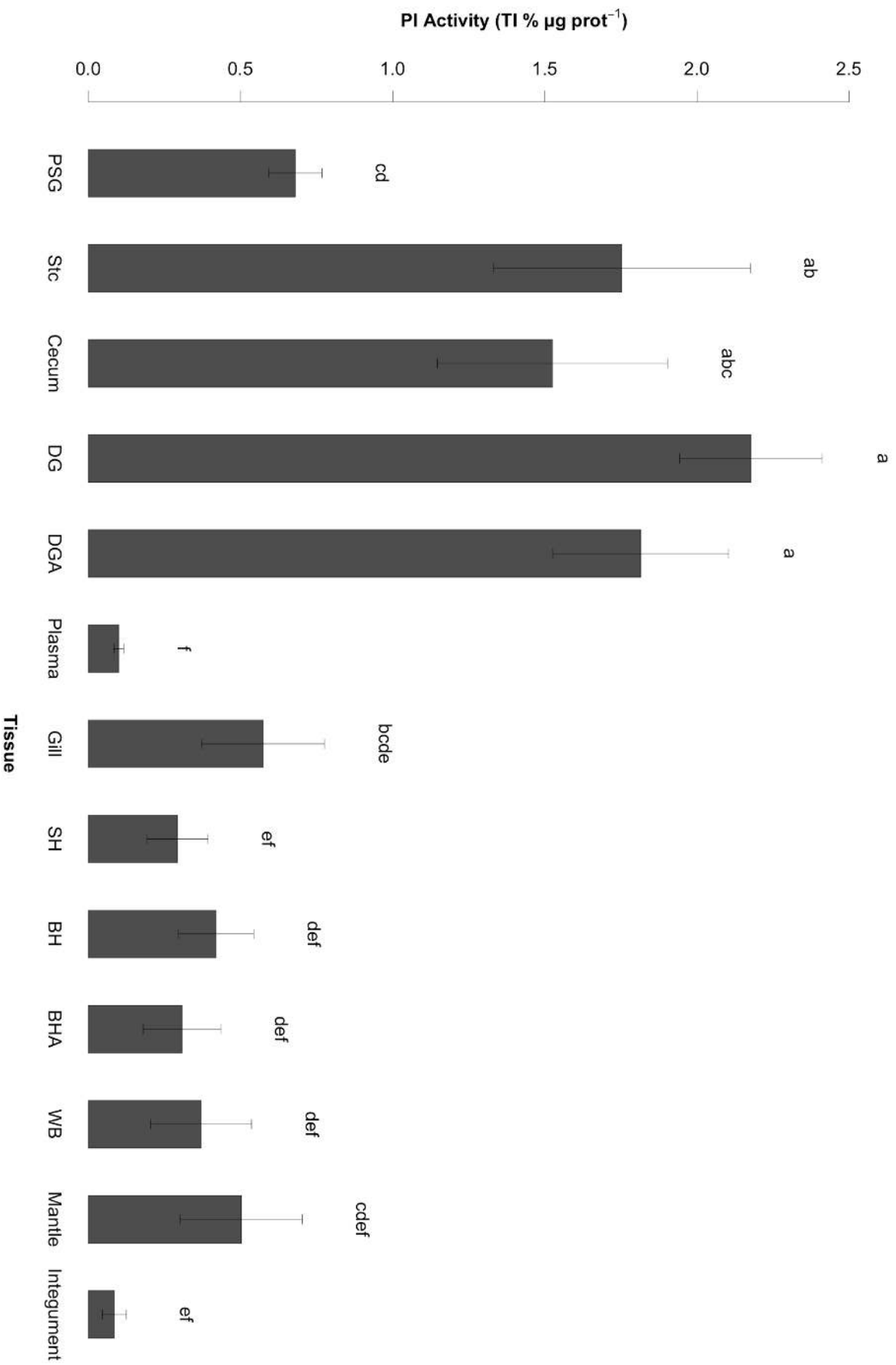


FIGURE 2.4 – PI activity (TI % $\mu\text{g prot}^{-1}$) in 13 body compartments of cuttlefish *Sepia officinalis*. BH : branchial hearts, BHA : branchial heart appendages, SH : systemic heart, DG : digestive gland, DGA : digestive gland appendages, PSG : posterior salivary glands, Stc : stomach, WB : white bodies. The bars represent the means ($\pm$ SE) of 10 animals. Bars with same subscript letter are not significantly different ($p < 0.05$).

reported in *E. cirrhosa* (Malham *et al.*, 1998b), except in the plasma. However, a PI – α_2 -macroglobulin, was described as the second-most abundant protein found in the *S. officinalis* plasma (Armstrong, 1992; Thøgersen *et al.*, 1992; Vanhoorelbeke *et al.*, 1994). α_2 -macroglobulin acts by surrounding a wide range of protease molecules - including trypsin, to prevent enzyme-substrate reaction, but does not prevent reaction with low molecular weight substrates such as the BAPNA used in our study. Therefore, the low PI activity found in our plasma assays (<0.1 TI % $\mu\text{g prot}^{-1}$) did not reflect α_2 -macroglobulin activity. Other studies on tissues of terrestrial gastropod *Helix pomatia* and cephalopod *L. vulgaris* evidenced at least two different groups of PIs. A heat- and acid-stable group (I) and a group sensitive to denaturation (II) differently located in both mollusks. Whereas *H. pomatia* presented group I PIs only in its external organs, almost all sampled tissues (organ of the digestive tract, gills, epithelial barriers) of the squid presented PIs of this group, except sexual organs which contained group II PIs in both mollusks (Tschesche et Dietl, 1972; Tschesche et von Rücker, 1973). Each group was able to inhibit a wide range of serine proteases involved in digestive and immune processes (trypsin, chymotrypsin, plasmin, kallikrein) with different yields. These observations suggested that PIs assessed in our study belong to the same PI group (I), to the exception of the plasma. Thus, while our results highlight the presence of PI activity in cuttlefish respiratory and circulatory compartments, they also demonstrate the need for more detailed approaches to dissect out which specific PIs are associated with individual organs.

Acknowledgments

This work was supported by the European, Interreg IV-A CRESH and CHRONEXPO projects. This study was partly conducted in the CREC (Centre de Recherche en Environnement Côtier) at Luc-sur-mer (Normandie, France). We would like to thank Doctors Pierre Le Pabic and Thomas Lacoue-Labarthe for advice and help in English.

Troisième partie

Etude des effets d'expositions prolongées
au zinc sur la physiologie du stade
juvénile de la seiche commune *Sepia*
officinalis au cours de sa vie côtière

Préambule

Cette partie présente les principaux résultats obtenus suite aux expositions de juvéniles de seiche à différentes concentrations en Zn dissous. En dehors du temps d'exposition utilisé pour l'estimation d'un seuil de mortalité (i.e. deux semaines), les expositions à des concentrations en Zn non létales des autres études ont été réalisées sur des durées du même ordre que celles passées près des côtes en milieu naturel par les juvéniles de seiche en Manche (i.e. un à deux mois).

La sensibilité du juvénile de *S. officinalis* au Zn étant peu documentée, le chapitre 3 rapporte les résultats issus d'expositions au Zn dont les objectifs étaient de 1) déterminer à partir de quelle concentration le Zn devenait léthal pour ce stade de vie, et 2) étudier les potentiels effets délétères sur différents marqueurs (i.e. digestifs, immunitaires, comportemental, croissance). Dans un premier temps, des juvéniles de seiches ont donc été exposés, pendant deux semaines, à une large gamme de concentrations permettant d'estimer un seuil de mortalité. Des dosages d'enzymes impliquées dans les systèmes digestif (i.e. phosphatases acides, cathepsines, trypsine) et immunitaire (i.e. phénoloxydases) ont également été réalisés afin d'étudier les perturbations induites par le Zn, à des concentrations létales et non létales, sur des temps d'exposition allant de une à cinq semaines. De plus, le comportement de prédation et la croissance, en tant que marqueurs intégrés, ont été suivis à des concentrations non létales.

Le chapitre quatre détaille les travaux réalisés afin de 1) décrire l'accumulation du Zn dans le juvénile et ses effets sur l'homéostasie d'autres éléments traces, ainsi que sur des protéines impliquées dans ce processus (i.e. les MTs), et 2) évaluer l'impact d'une telle exposition sur la régulation du stress oxydatif. Ce chapitre présente donc les effets d'un à deux mois d'expositions à deux concentrations en Zn non létales, l'une proche des concentrations retrouvées en Manche ($50 \mu\text{g L}^{-1}$), et l'autre, proche du seuil induisant la mortalité ($200 \mu\text{g L}^{-1}$), sur l'accumulation et le fractionnement subcellulaire du Zn et de douze autres éléments traces (i.e. Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se, V). En parallèle, des marqueurs de la gestion du stress oxydatif (i.e. GST, SOD, catalase, LPO) ont été étudiés au niveau des branchies (premier organe exposé au Zn et potentielle voie d'entrée), ainsi qu'au niveau de la glande digestive (principal organe d'accumulation et de détoxification de cet élément)

des juvéniles. Ce chapitre débute par la description de l'évolution de tous ces paramètres au cours des deux mois post-éclosion dans des juvéniles non exposés au Zn.

Le chapitre cinq relate les travaux visant à étudier la faisabilité d'une contamination prolongée au Zn par la voie trophique en conditions contrôlées. Il décrit, dans un premier temps, la démarche effectuée pour choisir l'espèce la plus adaptée en tant que proie à cette expérimentation : le mysidae *Neomysis integer* ; dans un second temps, le développement nécessaire à l'élevage de cette espèce ; enfin des essais d'accumulation du Zn dans cet animal, et les perspectives apportées pour de futurs travaux.

Chapitre 3

Physiological perturbations in juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* induced by subchronic exposure to dissolved Zn

Charles Le Pabic^{a,b,c}, Christelle Caplat^{a,b,c}, Jean-Paul Lehodey^{a,b,c}, Lorna Dallas^d,
Noussithé Koueta^{a,b,c}

en cours de soumission dans *Marine Pollution Bulletin*

^a Normandie Université, F-14032 Caen, France

^b UMR BOREA, MNHN, UPMC, UCBN, CNRS-7028, IRD-207, IBFA Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la Paix, CS 14032, 14032 Caen cedex, France

^c Centre de Recherches en Environnement Côtier, Université de Caen Basse-Normandie, 54 rue du Docteur Charcot, 14530 Luc-sur-Mer, France

^d School of Biological Sciences, Plymouth University, Drake Circus, Plymouth, PL4 8AA, UK

Abstract

Physiological perturbations induced by contaminants have been rarely investigated in cephalopod early life stages (i.e. eggs and juveniles). Yet, their development often occurs in coastal areas, where anthropogenic contamination is important. In this study, we focused on zinc as it is one of the trace metals most concentrated in coastal areas, worldwide. As zinc-tolerance limits were unknown in *Sepia officinalis*, the aim of this study was 1) to estimate the threshold inducing mortality during the 2-first weeks post-hatching, and 2) to determine juvenile cuttlefish sensitivity using digestive and immune enzymatic assays, as well as growth and behavior follow-up during the first 5 weeks post-hatching. Non-lethal zinc-concentrations induced various effects on digestion, immunity, behavior and growth after different exposure times. According to our results, the juvenile cuttlefish appears to be an interesting model for ecotoxicology on account of its sensitivity and the possibility for use of a wide diversity of biomarkers.

Keywords : *Sepia officinalis* ; Zinc ; Juvenile stage ; Subchronic exposure ; Physiological perturbations ; Cephalopod mollusk

3.1 Introduction

Cephalopods are known for their sensitivity (reviewed in Pierce *et al.*, 2008) and high capacity to accumulate contaminants such as metals (e.g. Bustamante *et al.*, 2002a,b, 2000, 1998b,a; Miramand et Bentley, 1992; Napoleão *et al.*, 2005; Raimundo *et al.*, 2010b,a; Rossi *et al.*, 1993; Seixas et Pierce, 2005; Seixas *et al.*, 2005a,b; Semedo *et al.*, 2012). In addition, cephalopod early life stages (i.e. eggs and juveniles) often occur in coastal areas, where anthropogenic contaminants are highly concentrated due to urban, agricultural and industrial effluents (Colas, 2011; Pierce *et al.*, 2010). To date, few studies have investigated the physiological perturbations caused by long-term contaminant exposure on cephalopod first life stages (Di Poi *et al.*, 2014, 2013; Lacoue-Labarthe *et al.*, 2010b, 2009d; Sen et Sunlu, 2007), despite their growing worldwide economic importance in fisheries as well as aquaculture (e.g. Berger, 2010; Payne *et al.*, 2006; Jereb *et al.*, 2005; Sykes *et al.*, 2006b; Uriarte *et al.*, 2011).

In the expanding field of marine ecotoxicology, the effects of long-term exposure to contaminants is rarely investigated in controlled conditions, and mollusks used in this type of study are mainly bivalves (e.g. for 2-week exposures and longer : Anandraj *et al.*, 2002; Bebianno et Langston, 1991; Blackmore et Wang, 2002; Calabrese *et al.*, 1984; Chan, 1988; Devos *et al.*, 2012; Geret *et al.*, 2002; Liu et Wang, 2013; Mao *et al.*, 2011; Miramand *et al.*, 1980; Mottin *et al.*, 2012; Serafim et Bebianno, 2010, 2007; Shi et Wang, 2005, 2004a; Smolarz et Berger, 2009).

In this study, the common cuttlefish *Sepia officinalis* was selected to estimate the sensitivity of cephalopod early life stages towards anthropogenic contamination. The *S. officinalis* English Channel stock is an important fisheries resource and its life cycle is characterized by inshore migration during summer months to mate and spawn (reviewed in Bloor *et al.*, 2013). Eggs and juveniles are, therefore, potentially impacted by anthropogenic contaminants during this « critical » period. Recent studies highlighted metal uptake by embryos mainly at the end of development because of eggshell shielding properties (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2010a, 2009c, 2008b). Despite this protection, the same authors also showed loss of weight in hatchlings and perturbations of immune and digestive enzyme activities in embryos after dissolved cadmium (Cd), copper (Cu) or silver (Ag) exposures (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2010b, 2009d). Accumulation and depuration kinetic experiments on *S. officinalis* juveniles highlighted efficient accumulation in soft tissues of dissolved Ag, Cd, and zinc (Zn) followed

by relatively long-term retention (Bustamante *et al.*, 2004, 2002b). However, the effect(s) of long-term xenobiotic exposure on the physiology of cuttlefish juveniles is unknown, even though they profit from coastal prey abundance by staying inshore for 1 to 2 months. This early exposure could be potentially devastating as important physiological processes occur during the first weeks of life : maturation of (1) the hemocyanin (respiratory pigment) system, (2) the central nervous system and (3) the digestive gland – the major organ involved in detoxification and bioaccumulation of metals in cephalopods (Bustamante *et al.*, 2008, 2006a, 2004, 2002b; Chichery, 1976; Decleir *et al.*, 1971; Dickel *et al.*, 1997; Hanlon et Messenger, 1988; Koyama *et al.*, 2000; Lacoue-Labarthe *et al.*, 2009b; Miramand et Bentley, 1992; Miramand et Guary, 1980; Raimundo *et al.*, 2004; Strobel *et al.*, 2012; Yim et Boucaud-Camou, 1980).

In this study, we focused on the trace metal Zn. Zn is an essential nutrient for living organisms, being a component of more than 300 enzymes and other proteins (McCall *et al.*, 2000). Studies have highlighted its toxicity in marine organisms starting at approximately $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (e.g. Amado Filho *et al.*, 1997; Brereton *et al.*, 1973; Nadella *et al.*, 2013; Tellis *et al.*, 2014; Watling, 1982). In the English Channel, Zn is one of the most concentrated dissolved metals, regularly measured at $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (Lachambre et Fisson, 2007c; Sheahan *et al.*, 2007), and worldwide, some studies reported concentrations reaching several mg L^{-1} in coastal areas (Amado Filho *et al.*, 1997; Liu et Wang, 2013; Srinivasa Reddy *et al.*, 2005). Moreover, the majority of dissolved Zn in seawater is in a bioavailable physico-chemical form (i.e. $\text{Zn}(\text{OH})_2$) (Rainbow, 1995). Zn is also one of the most concentrated metals in the cuttlefish digestive gland (Bustamante *et al.*, 2006a; Miramand et Bentley, 1992; Miramand *et al.*, 2006).

As Zn-tolerance limits were unknown in juvenile *S. officinalis*, we first conducted 2-week exposures to a wide range of concentrations to determine Zn-sensitivity, followed by 5-week exposures to non-lethal concentrations to study the impact of chronic Zn-exposure on this life stage. In respect of digestive gland maturation, we assessed Zn-exposure effects on digestive enzymes. This process has been described in cephalopods as the progressive development of extracellular digestion ensured by alkaline enzymes initiated by the first juvenile meal until around 3 week post-hatching. Concomitantly with this development of extracellular digestion, nutrition is also ensured by acid intracellular enzymes located in lysosomes during the first week post-hatching. Moreover, these enzymes are involved in the yolk consumption oc-

curing from the beginning of embryogenesis (i.e. in the egg) to the first week post-hatching. Consequently, intracellular acidic digestion is crucial at this period. Among enzymes involved in this process, acid phosphatases (EC 3.1.3.2, ACP) are known to be involved in yolk digestion in cuttlefish and are also reliable biomarkers of metal pollution (Blasco *et al.*, 1993; Jing *et al.*, 2006; Mazorra *et al.*, 2002; Rajalakshmi et Mohandas, 2008; Lacoue-Labarthe *et al.*, 2010a). As key players in cephalopod digestion, 2 protease types were also studied : intracellular cathepsins (mainly aspartic and cysteine endopeptidases according to Balti *et al.* (2010); Gildberg (1987); Hameed et Haard (1985) and Morishita (1972)), and extracellular trypsin (EC 3.4.21.4). As Zn has known immuno-depressive properties, we studied Zn-exposure impacts on phenoloxidases (including tyrosinase EC 1.14.18.1, catecholase EC 1.10.3.1, and laccase 1.10.3.2, POs) (Luna-Acosta *et al.*, 2010; Shankar et Prasad, 1998).

In the present study, differently Zn-exposed *S. officinalis* hatchlings were used for analysis of biochemical parameters (ACP, cathepsins, trypsin, POs). Concurrently, mortality, growth (weight and mantle length (ML)) and predatory behavior were monitored. The research aims to (1) determine survival rate of juvenile cuttlefish during 2-week Zn-exposure post-hatching, (2) assess the effects of sublethal Zn exposures on the physiological metabolism (using biochemical indices, behavior, and growth) in developmental juvenile *S. officinalis*, and (3) evaluate biomarker sensitivity towards Zn in whole juvenile cuttlefish. This research is the first attempt to understand contaminant chronic exposure effects on the juvenile physiology of a cephalopod.

3.2 Materials and methods

3.2.1 Animals

Cuttlefish eggs were collected from traps set along the Calvados coast (Basse-Normandie, France) during summer 2011 and 2012. All rearing procedures were held at the Centre de Recherches en Environnement Côtier (Luc-sur-Mer, France). At the laboratory, eggs were separated for optimal oxygenation, acclimatized at $17 \pm 1^\circ\text{C}$, and maintained in open-circuit tanks until hatching. Between 1 and 2 day post-hatching, juveniles were randomly selected and acclimatized in experimental structures and fed 24 h later according to hatchling yolk consumption period (Yim et Boucaud-Camou, 1980). During all experiments, cuttlefish were

fed once a day with live brown shrimp *Crangon crangon* of adapted size. Special attention was taken daily to feed all animals with shrimp of the same size range.

3.2.2 Experimental design

3.2.2.1 Experimental system and seawater quality follow-up

To allow individual follow-up, constant exposure, as well as long-term water quality (particularly considering nitrogen compounds), we set up experimental units presented in figure 3.1. In a 40-L tank (corresponding to one experimental unit), seawater mixing and oxygenation were provided by 2 water pumps (NJ400, Aquarium systems, France) and 2 air stones. A constant water renewal was provided in each experimental unit by peristaltic pump (521F/D2, Watson-Marlow Pumps Group, France), supplied with frequency converter and pumpheads (312X2, Watson-Marlow Pumps Group, France), at a rate of 30 mL min^{-1} from 60-L reservoirs. Water used during all experiments was decanted charcoal-filtered natural seawater to minimize particles and other dissolved metals presence. Depending on renewal rate, reservoirs were refilled each day with seawater (either Zn-contaminated or control). In order to avoid animal interactions and to allow individual follow-up, a compartmentalized sieve was used. Each compartment had an area of 104 cm^2 , which is enough space for juvenile development according to Forsythe *et al.* (1994). During all experiments, water parameter monitoring was checked daily. Global parameter variations for all experimental structures were : temperature = $17.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$; salinity = 32.5 ± 1 ; ammonia $< 0.5 \text{ mg L}^{-1}$, nitrite $< 0.5 \text{ mg L}^{-1}$, and nitrate-nitrogen $< 80 \text{ mg L}^{-1}$ (according to Oestmann *et al.*, 1997); pH = 8.0 ± 0.1 ; and dissolved oxygen $> 9 \text{ mg L}^{-1}$. Experiments were realized under a natural photoperiod. To keep high water quality, faeces were siphoned every 3 days, making sure not to disturb juveniles.

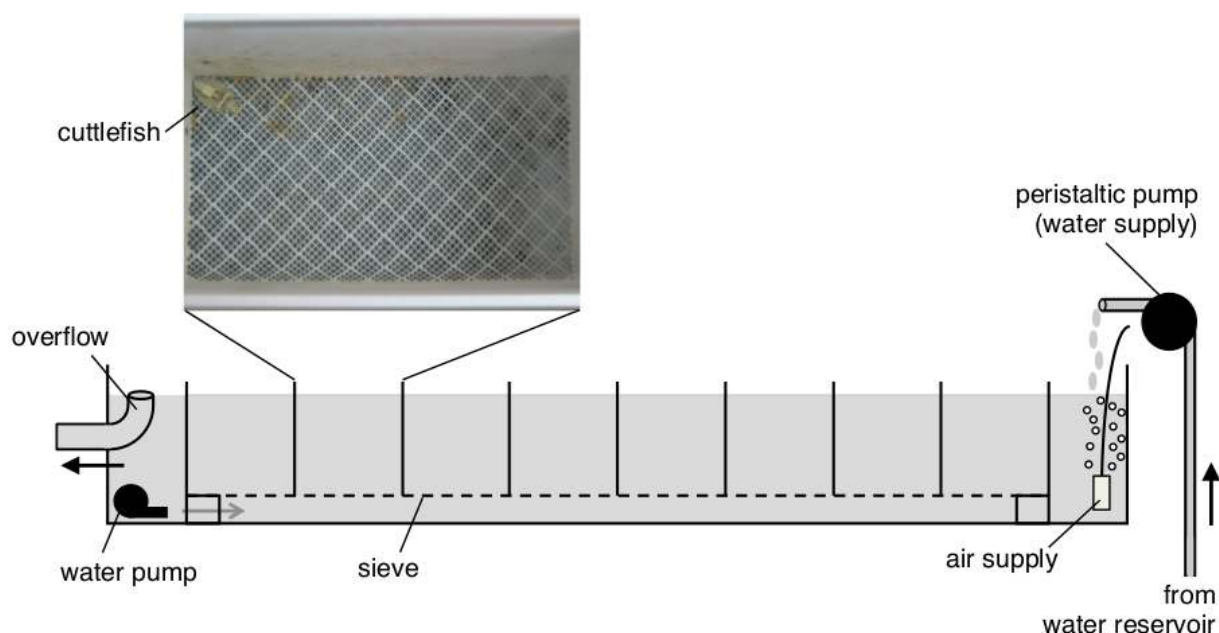


FIGURE 3.1 – Side view of the experimental system and top view of a compartmentalized sieve allowing individual follow-up of juvenile cuttlefish. Black arrows indicate the circulating direction of water renewal and grey arrow indicates water pump mixing direction inverted on the other side tank.

3.2.2.2 Zn-exposures and measurements

The experiments were repeated twice, during summer 2011 ($N = 1$) and 2012 ($N = 1$). Each time, juvenile cuttlefish were exposed to 50, 100, 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ Zn (Z1, Z2 and Z3) and 250, 500, 750, 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ Zn concentrations (Z4, Z5, Z6 and Z7) for 5- and 2-week exposures, respectively, alongside a control. The exposure media were spiked daily just after reservoir water renewal, using 20.84 g L^{-1} ZnCl_2 (i.e. 10.0 g L^{-1} Zn) stock solution (ZnCl_2 reagent grade, $\geq 98\%$), prepared in 0.22 μm -filtered artificial seawater (25.5 g NaCl, 6.4 g MgSO_4 , 5.2 g HEPES, 1.5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.75 g KCl in 1 liter Milli-Q water, pH 7.4). According to preliminary trials (data not shown), each reservoir was spiked weekly with the nominal concentration plus 10 % in order to keep constant concentrations and compensate for animal absorption and experimental unit adsorption.

For all 8 batches (control + 7 conditions), 20 mL of control and contaminated seawaters were sampled daily, immediately acidified with 1 % nitric acid (HNO_3 69.5 %, Normapur grade), and conserved at 4°C until analyses. Zn concentration in the seawater was measured by air-acetylene flame atomic absorption spectrometry (F-AAS; AA240F – Varian) at a wavelength of 213.9 nm and with a slit of 1 nm. The apparatus was equipped with deuterium

lamp (coded hollow-cathode lamp from Photron Lamps) to correct for nonspecific absorption. All calibration solutions were diluted from a stock standard (Zn calibration solution $1.000 \pm 0.005 \text{ g L}^{-1}$ Analytika Ltd., Prague, Czech Republic) in saline medium (30 g L^{-1} NaCl, Normapur, 99 %). Triplicate analyses were performed for each sample and the mean values were used for evaluation. The limit of detection, defined as the background plus three times the standard deviation of the blank (3σ), for the determination of the Zn concentration in seawater was $6.2 \mu\text{g L}^{-1}$.

3.2.2.3 Sampling procedure

Before exposure began, weight and ML of 20 hatchlings were measured. During exposures, dead animals were counted and removed each day. All individuals were sampled after 24-h fasting. Samplings were performed after 1- and 2-week exposures in all tested concentrations. For longer exposures (i.e. Z1, Z2 and Z3), sampling was performed in the same conditions after 3 and 5 weeks. Each time, control individuals were concomitantly sampled. Each year, between 3 and 6 animals were randomly removed from each exposure condition at each sampling time. They were then anesthetized in a solution of 2 % ethanol (Carlo erba, Milan, Italy) with 17.5 mg L^{-1} MgCl_2 in seawater for 5 min, to be measured (weight and ML), and immediately frozen in liquid nitrogen to be stored at -80°C for enzymatic assays (Di Poi *et al.*, 2014). Biochemical analyses were carried out on all animals for the 2-week exposure (Z4, Z5, Z6, and Z7), and on animals exposed to Z2 during 5 weeks (Z1 and Z3 batches were kept for other analyses).

3.2.3 Predatory behavior study

The cuttlefish is an active predator and normally captures mobile living prey such as shrimp by ejection of the two prehensile tentacles for a strike (Messenger, 1968). In order to study potential juvenile predatory behavior perturbation during our experiment, a simple test was developed. Between day 8 and 16 of exposure, we observed during food supply the number of tentacle strikes necessary to capture one live *C. crangon* shrimp of size ($14 \pm 2 \text{ mm}$) adapted to cuttlefish on the same cuttlefish batches in different Zn-exposure conditions. One tentacle strike was considered as a success and more than one as a failure. Based on previous observations, this study was performed for control and Z3-exposure using 10 animals

per condition. Animals presenting no reactivity towards shrimp during 10 min following its introduction were not counted in the study.

3.2.4 Enzymatic assays

Sampled juveniles were individually weighed before being ground in liquid nitrogen. Powder obtained was then homogenized in cold Tris buffer pH 8 (10 mM Tris-HCl and 150 mM NaCl) for ACP, cathepsin and trypsin assays (Safi, 2013) or Tris buffer pH 7 (0.1 M Tris-HCl, 0.45 M NaCl, 26 mM MgCl₂ and 10 mM CaCl₂) for PO assay (Luna-Acosta, 2010) with a ratio of 10 mL to 1 g of juvenile material. The mixture was then stored at 4°C for 1 h, before centrifugation for 10 min at 15,000 × *g* and 4°C. The resulting supernatant containing Tris-soluble proteins was collected for enzymatic assays as well as protein concentration measurement.

All activities were expressed in relation to protein concentration measured according to the Bradford method (1976) using bovine serum albumin (BSA) as standard, and adapted for microplate reading. Results were then expressed as percentage of control to minimize variability due to differences in activity between studied years.

3.2.4.1 Digestive enzymes (ACP, cathepsins and trypsin)

ACP activities were determined following Moyano *et al.* (1996) using 2 % *p*-nitrophenylphosphate as substrate in a 1 M Tris buffer pH 3. Ten µL of supernatant sample were added to 10 µL of substrate in 96-well flat bottom plates (BD, USA). For blank, supernatant was replaced by extraction Tris buffer pH 8. After 30 min of incubation at 25°C, 100 µL of NaOH 1 M were added to stop the reaction. The absorbance was measured at 405 nm using Mithras LB 940 luminometer (Berthold, Thoiry, France), and each sample was tested in triplicate.

Cathepsin activities were measured following Bonete *et al.* (1984) method, using haemoglobin 2 % (w:v) solution as substrate. The first step consisted of mixing 100 µL sample supernatant with 50 µL of acetate 0.4 M buffer pH 4, and 50 µL of substrate. In parallel, intrinsic proteolytic end products were measured by replacing 50 µL of substrate with Milli-Q water. Blanks had sample replaced by extraction Tris buffer pH 8, with and without substrate. Samples and blanks were then incubated at 37°C for 1h, before adding 1 mL of cold 3 % (w:v) trichloroacetic acid solution to stop the reaction. After 10 min in ice, the reaction

mixtures were centrifuged for 10 min at $800 \times g$ and 4°C . Finally, the reaction products were assessed by the Bradford (1976) method with BSA as standard and using Mithras LB 940 luminometer (Berthold, Thoiry, France).

Trypsin activity was measured according to Tsunematsu *et al.* (1985) using 1 mM N α -benzoyl-Arg-*p*-nitroanilide as substrate in a 0.1 M Tris buffer at pH 9. Briefly, 20 μL of supernatant (or extraction Tris buffer pH 8 for blank) were mixed to 100 μL of substrate, before incubation for 1 h at 25°C . The final absorbance was recorded at 410 nm using Mithras LB 940 luminometer (Berthold, Thoiry, France).

3.2.4.2 Immune enzyme (total POs)

According to previous studies on PO repartition in cuttlefish tissues (Le Pabic, 2014), total POs (i.e. *in vivo* active + artificially activated) were assayed because it is more relevant considering immunity at the whole-individual level. Total PO activities were measured by recording the formation of *o*-quinones as described by Luna-Acosta (2010) with slight modifications to activate artificially proPO fraction and thus measure *in vivo* active plus inactive PO forms (Le Pabic, 2014). L-DOPA was used as substrate, at a final concentration of 10 mM, and prepared extemporaneously in Tris buffer pH 7 described above (section 3.2.4). Troponone (10 mM) and trypsin TPCK (1 g L^{-1}) were used respectively as PO inhibitor and elicitor as described by Lacoue-Labarthe *et al.* (2009d) on *S. officinalis* embryo. For each sample, non-enzymatic sample autoxidation, inhibited, and total PO-like activities were measured. For non-enzymatic sample autoxidation, 10 μL of sample was mixed with Tris buffer pH 7. For inhibited or total PO-like activity, 10 μL of sample was mixed with 10 μL of troponone (140 mM) or trypsin TPCK (14 g L^{-1}), followed by adapted volume of Tris buffer pH 7 and 80 μL L-DOPA. Each measurement was systematically controlled by replacing sample by buffer, always in a final reaction volume of 140 μL . Immediately after L-DOPA addition, PO-like activities were monitored at 25°C for 5 h using Mithras LB 940 luminometer (Berthold, Thoiry, France) at 490 nm (Luna-Acosta, 2010). When an inhibited PO-like activity was measured, this value was subtracted from total PO-like activity. Troponone, with its copper chelator and peroxidase substrate properties, ensured that PO-like activity alone was detected (and not peroxidase). Results were also systematically corrected for non-enzymatic autoxidation of the substrate (Le Pabic, 2014).

3.2.5 Chemicals

All chemicals with no specified supplier were obtained from Sigma-Aldrich (France).

3.2.6 Statistical analysis

Concerning Zn measurements in seawater, mean Zn concentrations were compared using Student's *t*-test to determine if they were different between time exposure (i.e. 2 and 5 weeks) as well as between years of experimentation. A likelihood ratio test was first performed to estimate influence of Zn concentration on mortality rate, before to do a pairwise comparisons for mortality analysis to distinguish between concentrations those significantly impacted. Mortality rates were calculated for each concentration from a 40 individual pool (20 per year). Behavior statistic analyses were performed using a generalized linear mixed model fitted on a binomial distribution to compare failure attack proportions between Z3-exposed and control individuals, including day of test as random factor. A Wald chisquare were calculated using a type-III analysis of variance to determine Zn-exposure significance. At each time-point, after check of normality (Shapiro test) and variance homogeneity (Levene test), raw enzyme activity and growth data were analyzed with a Wald test using a linear mixed model (with treatment as factor and year as random factor) to determine Zn-exposure significance. Afterwards, multiple comparisons were realized using contrast analysis to determine each Zn concentration effects. R software was used for statistics and graphics.

3.3 Results

3.3.1 Zn measurements in seawater

In order to facilitate comparisons with literature data, the Zn concentrations measured in seawater in all 8 experimental batches are expressed in $\mu\text{g L}^{-1}$ and μM (Table 3.1). For long-term exposures (i.e. Z1, Z2 and Z3), no significant differences were detected between mean Zn concentration of 2-week and 5-week exposures as well as between the two years of experimentation (p -values > 0.05). Consequently, Zn concentrations indicated in results correspond to 5-week exposure means (which include 2-week exposure concentrations) of both years. These concentrations have been used to analyze and present our results.

TABLE 3.1 – Zinc concentrations (mean $\pm$ standard deviation in $\mu\text{g L}^{-1}$ and μM) in seawater during the experiments.

Zn concentration	Control	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7
$\mu\text{g L}^{-1}$	< 6.2	53 ± 2	108 ± 5	185 ± 11	230 ± 19	442 ± 17	703 ± 21	1479 ± 21
μM	< 0.1	0.81 ± 0.03	1.65 ± 0.08	2.83 ± 0.17	3.51 ± 0.29	6.76 ± 0.26	10.75 ± 0.32	22.62 ± 0.32

3.3.2 Mortality

Statistical analysis of survival probability function of Zn exposure during the 2 first weeks post-hatching separated non-lethal concentrations (i.e. control, Z1, Z2 and Z3) to those reducing survival probability (i.e. Z4 to Z7; p -value < 0.001 ; Fig. 3.2). As in control, Zn concentrations of Z1, Z2 and Z3 did not show a decrease in survival over the entire exposure time (2 or 5 weeks). In Z4, survival probability began to decrease after 7 days exposure reaching 81 % after 14 days, whereas decrease was observed from day 4 in Z5, reaching 0 % survival probability after 12 days. The highest Zn concentrations, Z7 and Z6, caused rapid mortality of all animals studied between 2 - 3 days, and 3 - 4 days, respectively. In Z7, animals never fed, while Z6-exposed animals showed difficulty feeding during the first 2 days of exposure before stopping. Z3, Z4 and Z5 concentrations also induced prey capture difficulties (quantified in table 3.2 for Z3).

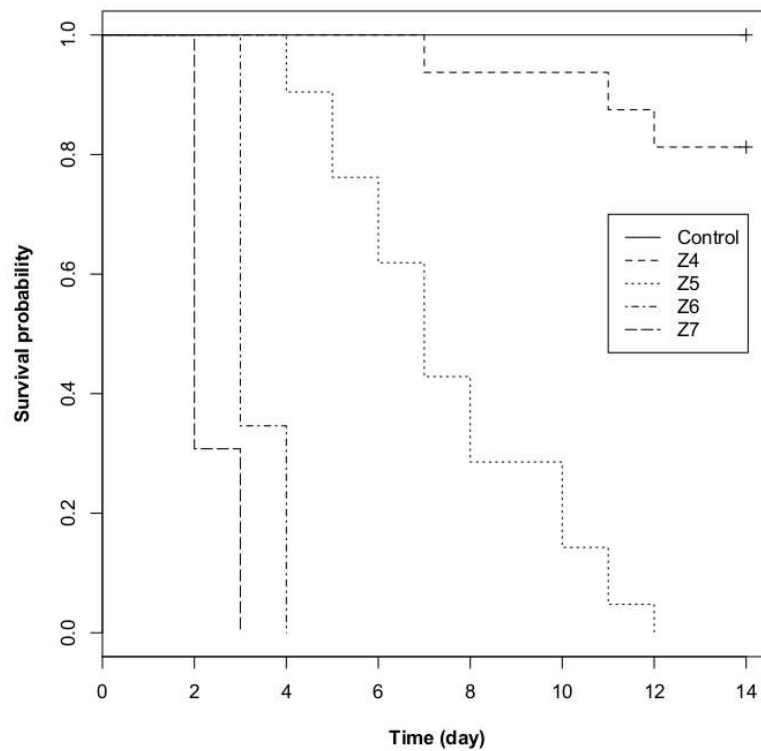


FIGURE 3.2 – Survival probability function of Zn exposure-time at all concentration tested. Only concentrations which induced survival probability decrease are presented here. Z1 to Z3 survival probabilities were similar to control ($n = 40$ per condition).

3.3.3 Predation behavior

The predatory efficiency in control and Z3-exposed cuttlefish between day 8 and 16 of exposure are shown in table 3.2. Z3-exposed individuals presented a significantly higher number of failures (13.5 %, $n = 111$), i.e. more than one tentacle strike necessary to catch their prey, compared to the control (1.8 %, $n = 109$). Notably, this disruption was not modified by exposure time, appeared randomly between juveniles studied during the experiment period, and disappeared a few days after animal introduction to uncontaminated seawater (data not shown).

TABLE 3.2 – Predation behavior efficiency in control and Z3-exposed conditions. N correspond to the number of feeding behavior observations made on 10 juvenile cuttlefish batches.

Condition	N	success	failure	failure proportion (%)	p -value
Control	13	107	2	1.8	-
Z3 exposed	13	96	15	13.5**	0.0062

3.3.4 Enzymatic responses to Zn exposure in juvenile

Changes in ACP activity in *S. officinalis* juveniles during Zn-exposure are shown in table 3.3. ACP activity significantly increased after 1-week Zn exposure at Z2 concentrations and higher. However, ACP activity became comparable to control levels after 2-week exposure to Z1, Z2, Z3 or Z4 concentration or after 3- and 5-week exposure to Z2 concentration.

Cathepsin activities for different Zn concentrations showed no significant effects in cuttlefish juveniles after 1 week (p -value > 0.05 ; Table 3.4). Significant decreases (≥ 25 %) in cathepsin activity were observed after 2-week exposures to Z3 and Z4 concentrations (p -values < 0.01), whereas significant decreases of 39 and 55 % were observed after 3- and 5-week exposure to Z2 concentration (p -values < 0.05).

No significant effects on trypsin activity was observed in cuttlefish juveniles after 1 week regardless of Zn concentration (p -value > 0.05 ; Table 3.5). After 2-week exposure to Z4, trypsin activity significantly decreased by approximately 25 % compared to the control (p -values < 0.05). Afterwards, no difference was observed following either 3- or 5-week exposure to Z2 concentration (p -value > 0.05).

Total PO-like activity at different concentrations showed significant decreases of ca 40 %

TABLE 3.3 – ACP activity (% of control) measured during Zn-exposures (expressed as mean $\pm$ SD (n)). * and *** indicate significant ACP activity differences between control and respective Zn concentrations for $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively.

Zn concentration	ACP activity (control %)					
	1 week	p-value	2 weeks	p-value	3 weeks	p-value
Control	100.0 $\pm$ 15.6 (10)	-	100.0 $\pm$ 11.1 (12)	-	100.0 $\pm$ 12.3 (6)	-
Z1	113.9 $\pm$ 18.8 (6)	0.2484	102.4 $\pm$ 15.5 (10)	0.6880	-	-
Z2	114.1 $\pm$ 5.2* (6)	0.0280	92.2 $\pm$ 19.6 (6)	0.5650	103.4 $\pm$ 34.9 (6)	0.8280
Z3	136.6 $\pm$ 9.4* (6)	0.0222	105.8 $\pm$ 15.6 (10)	0.6399	-	-
Z4	145.0 $\pm$ 26.1* (6)	0.0143	114.7 $\pm$ 30.7 (6)	0.4504	-	-
Z5	157.1 $\pm$ 32.4* (6)	0.0336	-	-	-	-

TABLE 3.4 – Cathepsin activity (% of control) measured during Zn-exposures (expressed as mean $\pm$ SD (n)). *, ** and *** indicate significant cathepsin activity differences between control and respective Zn concentrations for $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

Zn concentration	Cathepsin activity (control %)					
	1 week	p-value	2 weeks	p-value	3 weeks	p-value
Control	100.0 $\pm$ 42.6 (10)	-	100.0 $\pm$ 23.3 (12)	-	100.0 $\pm$ 29.3 (6)	-
Z1	80.6 $\pm$ 25.6 (6)	0.2947	84.0 $\pm$ 16.4 (10)	0.0662	-	-
Z2	105.2 $\pm$ 35.9 (6)	0.8252	66.0 $\pm$ 27.2 (6)	0.1484	61.1 $\pm$ 26.8* (6)	0.0375
Z3	103.5 $\pm$ 32.6 (6)	0.8619	75.0 $\pm$ 13.5** (10)	0.0096	-	-
Z4	84.3 $\pm$ 59.4 (6)	0.6533	43.6 $\pm$ 18.9*** (6)	0.0004	-	-
Z5	93.7 $\pm$ 25.3 (6)	0.7260	-	-	-	-

TABLE 3.5 – Trypsin activity (% of control) measured during Zn-exposures (expressed as mean $\pm$ SD (n)). * indicates significant trypsin activity differences between control and respective Zn concentrations for $p < 0.05$.

Zn concentration	Trypsin activity (control %)					
	1 week	<i>p</i> -value	2 weeks	<i>p</i> -value	3 weeks	<i>p</i> -value
Control	100.0 $\pm$ 18.3 (10)	-	100.0 $\pm$ 8.2 (12)	-	100.0 $\pm$ 35.4 (6)	-
Z1	123.6 $\pm$ 36.7 (6)	0.2329	102.3 $\pm$ 10.6 (10)	0.05774	-	-
Z2	104.7 $\pm$ 16.0 (6)	0.6519	80.8 $\pm$ 14.8 (6)	0.1458	102.4 $\pm$ 35.7 (6)	0.9089
Z3	115.0 $\pm$ 10.0 (6)	0.0616	95.0 $\pm$ 11.7 (10)	0.4462	-	-
Z4	105.9 $\pm$ 2.4 (6)	0.3437	74.2 $\pm$ 14.3* (6)	0.0146	-	-
Z5	100.6 $\pm$ 26.1 (6)	0.9637	-	-	-	-

TABLE 3.6 – Total PO-like activity (% of control) measured during Zn-exposures (expressed as mean $\pm$ SD (n)). * and ** indicate significant PO-like activity differences between control and respective Zn concentrations for $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

Zn concentration	Total PO-like activity (control %)					
	1 week	<i>p</i> -value	2 weeks	<i>p</i> -value	3 weeks	<i>p</i> -value
Control	100.0 $\pm$ 28.0 (10)	-	100.0 $\pm$ 17.6 (10)	-	100.0 $\pm$ 12.5 (6)	-
Z1	99.6 $\pm$ 11.1 (6)	0.9748	69.9 $\pm$ 11.5** (6)	0.0023	-	-
Z2	80.6 $\pm$ 19.4 (6)	0.1698	68.9 $\pm$ 10.8* (5)	0.0159	106.8 $\pm$ 12.1 (6)	0.3836
Z3	102.6 $\pm$ 13.9 (6)	0.8252	65.9 $\pm$ 16.0** (6)	0.0010	-	-
Z4	62.0 $\pm$ 19.0* (6)	0.0144	63.6 $\pm$ 19.1** (6)	0.0028	-	-
Z5	57.4 $\pm$ 24.4* (6)	0.0168	-	-	-	-

after 1-week exposure to Z4 concentration and above, or 2-week exposure to all concentrations (p -values < 0.05 ; Table 3.6). In contrast no difference was observed after 3- and 5-week exposures to Z2 concentration (p -value > 0.05).

3.3.5 Zn exposure impacts on juvenile cuttlefish growth

No changes in weight or ML were observed following 2-week exposures to a wide range of Zn-concentrations (data not shown). Five-week growth (weight and ML) of juveniles exposed to control, Z1, Z2 and Z3 are presented in figure 3.3. Similarly, weight and ML at different concentrations during the same exposure time showed no significant differences with the control after 1-, 2- and 3-week exposures (p -values > 0.05). After 5-weeks exposure, individuals exposed to Z2 and Z3 presented significant decrease in weight (p -values < 0.05) and ML (p -values < 0.05 and < 0.001 , respectively). These decreases appeared similar between both concentrations, with a decrease of ca 16-17 % of weight and 9 % of ML.

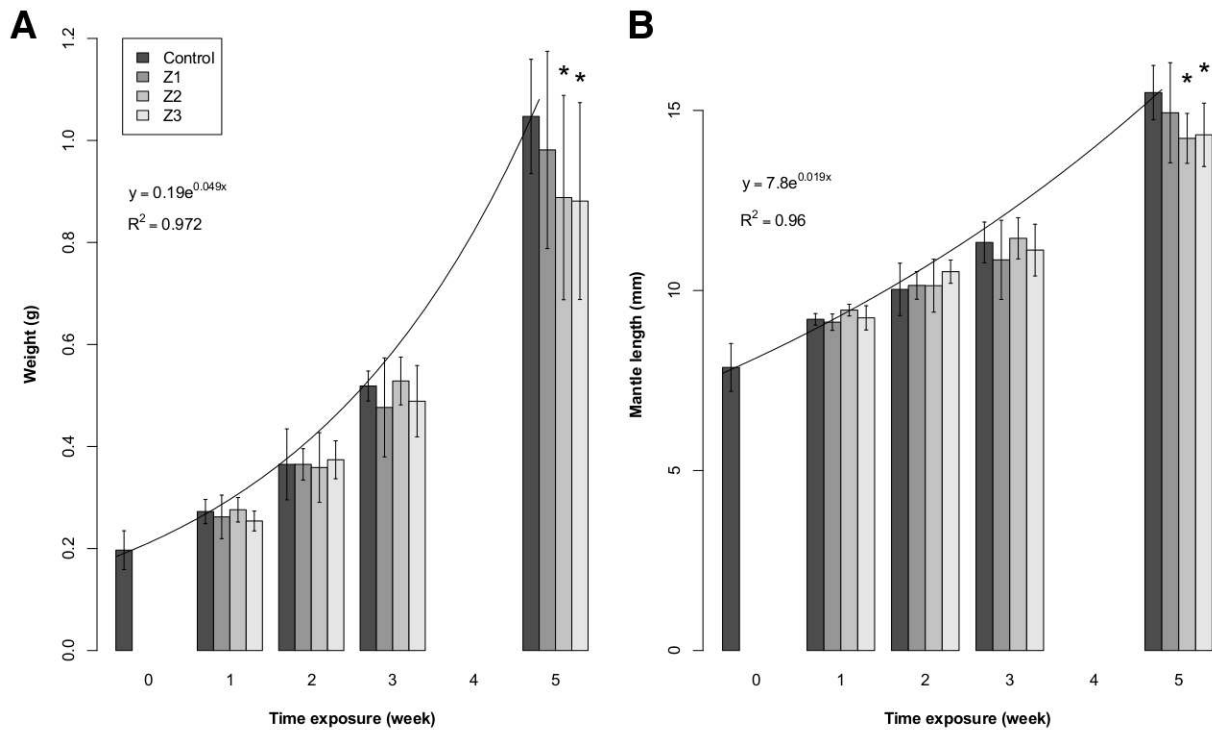


FIGURE 3.3 – Growth in weight (A) and mantle length (B) during 5-week post-hatching in control, Z1, Z2 and Z3 conditions. Results are represented as mean $\pm$ SD ($n = 16$ per condition for each exposure time). The exponential curves were adjusted to the average weights and mantle lengths of control.

3.4 Discussion

This study aimed to determine juvenile cuttlefish Zn-lethality during the initial 2-weeks post-hatching. Behavior, biochemical analysis, and growth were also studied to assess Zn-exposure effects on *S. officinalis* juvenile physiology after 1-, 2-, 3- and 5-week exposures.

3.4.1 Mortality

First, our study highlights the high sensitivity of juvenile cuttlefish towards Zn in terms of lethal dose. Even though our data do not allow us to calculate accurate 50 % lethal concentration (i.e. concentration that induced 50 % mortality of studied population, LC_{50}), they indicate a 96-h LC_{50} lower than $703 \mu\text{g L}^{-1}$ (Z6), which is lower than most literature values. Indeed, most 96-h LC_{50} 's for fish lay between 1 and 10 mg L^{-1} (e.g. Bengtsson, 1974; Cairns *et al.*, 1982; Ciji et Bijoy Nandan, 2014; Holcombe *et al.*, 1979; Malik *et al.*, 1998; Sinley *et al.*, 1974; Spear, 1981). Similarly, in marine bivalve mollusks *Mytilus edulis*, *Crassostrea gigas*, *Perna viridis* and *Perna perna* 96-h LC_{50} values are also above 1 mg L^{-1} (Ahsanullah, 1976; Amiard-Triquet *et al.*, 1986; Chan, 1988; D'Silva et Kureishy, 1978; Franco *et al.*, 2006).

Our 2-week exposure data give an LC_{50} between 230 (Z4) and $442 \mu\text{g L}^{-1}$ (Z5). This result further supports the high sensitivity of juvenile cuttlefish in comparison to the fresh water crustacean *Daphnia magna* (3-week $LC_{50} = 840 \mu\text{g L}^{-1}$; Enserink *et al.*, 1991), and to adult and juvenile stages of *C. gigas* which 7-week exposure at concentrations above $500 \mu\text{g L}^{-1}$ did not induce mortality (Devos *et al.*, 2012; Mottin *et al.*, 2012).

Although, in terms of contaminant sensitivity, molluskan and sea urchin embryo-larval development assay (frequently used to assess seawater quality) remain the reference with concentrations inducing 50 % development abnormality after 48h exposure laying around $150 \mu\text{g L}^{-1}$ (e.g. Brereton *et al.*, 1973; Calabrese et Nelson, 1974; Calabrese *et al.*, 1973; Castagna *et al.*, 1981; Fathallah *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 1981; Nadella *et al.*, 2013; Phillips *et al.*, 1998; Tellis *et al.*, 2014; Watling, 1982), the Zn-sensitivity of juvenile cuttlefish reported here suggests that they could be an interesting model to study metal management in the early life stages of marine organisms.

Our data suggest the existence of a Zn lethality threshold in juvenile cuttlefish. Indeed, whereas 19 % of animals exposed to $230 \mu\text{g L}^{-1}$ (Z4) died within 2 weeks (Fig. 3.2), no

mortality was recorded after 5-week exposure to $185 \mu\text{g L}^{-1}$ (Z3). This result may be indicative of changes in Zn management physiology during this stage of cuttlefish development. The cuttlefish digestive gland becomes mature around 3 weeks after first feeding resulting in a well-developed lysosomal system likely implicated in Zn-management (Boucaud-Camou *et al.*, 1985; Bustamante *et al.*, 2006a; Yim et Boucaud-Camou, 1980). Further studies of this developmental stage are needed to precisely determine if juvenile Zn-sensitivity is dependent upon digestive gland maturation.

3.4.2 Predatory behavior impairment

Our results highlight predatory behavior disruption (i.e. increase in tentacle strike number necessary to catch a shrimp) induced by sublethal Z3-exposure (i.e. $185 \mu\text{g L}^{-1}$, Table 3.2). After observation of the 3 phases necessary to successfully catch its prey – attention, positioning and seizure (described by Messenger, 1968), the disruption seemed to result from attacking distance misestimation (few mm or less), i.e. from the positioning phase. This behavior disruption is consistent with strong Zn-accumulation in the head previously highlighted in adult cuttlefish by Bustamante *et al.* (2002b), and suggests a Zn-induced disruption of the central nervous system and /or vision organs. We hypothesize that this phenomenon is linked to calcium ion dysregulation because of Zn^{2+} ability to mimic this element and inhibit its pump (Ballatori, 2002; Hughes et Barritt, 1989). According to previously described head Zn-tropism (Bustamante *et al.*, 2002b), it will also be interesting to determine if Zn plays a role in the cuttlefish nervous system similar to that reported for mammal neuronal excitability (Frederickson *et al.*, 2000).

3.4.3 Digestive system perturbations

For a few days after hatching, juvenile cuttlefish continue to consume yolk through acidic intracellular enzymes (Boucaud-Camou *et al.*, 1985; Yim et Boucaud-Camou, 1980). In cuttlefish embryo, ACP activity has been closely linked to yolk digestion (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2010b). Here, Zn-exposure (Z2 and higher concentrations) induced a dose-dependent ACP activity increase after 1-week exposure, but not at later timepoints (Table 3.3). This increase suggests a Zn-activation effect on ACP or at least one of its isoforms. The Zn-dependent activity of several of these metallohydrolases was shown in vertebrates (Fujimoto *et al.*, 1993;

Panara, 1997; Panara *et al.*, 1993). The shortness of the Zn-exposure response suggested either 1) the presence of Zn-sensitive ACP during the first week post-hatching alone, or 2) the arising of a Zn-protective process during the second week post-hatching. However, such a protective process would have to originate from the digestive gland, which is not mature until approximately 3-weeks post-hatching. Moreover, the decrease in activity of cathepsins (Table 3.4) – enzymes also contained in lysosomes – was measured from 2- and until 5-week exposure. According to Fagotto (1995) who highlighted that yolk digestion was dependent on developmental stage because of enzymatic activation regulation (e.g. yolk granule acidification), Zn may 1) specifically activate embryonic ACP (synthesized until a period comprise between 1- and 2-week post-hatching, as suggested by Lacoue-Labarthe *et al.*, 2010b), or 2) accelerate maternal ACP activation in yolk granules by acidification due to Zn ion accumulation (Bock *et al.*, 1999; McCall *et al.*, 2000). Either possibility would perturb Zn-induced yolk digestion perturbation and negatively impact the first post-hatching days of cuttlefish.

Cathepsins were the only enzymes with activity affected beyond 2 weeks of Zn-exposure (Table 3.4). These data are consistent with previous exposures of cuttlefish digestive gland cell cultures (Le Bihan *et al.*, 2004), and highlighted cathepsin assay as an interesting biomarker for Zn-exposed cuttlefish. A similar inhibitory effect on cathepsins was demonstrated after 48-day exposure of cuttlefish embryos to Cd – an element known for its Zn^{2+} mimicry properties (Bridges et Zalups, 2005; Lacoue-Labarthe *et al.*, 2010b; Nieboer et Richardson, 1980). The progressive effect of Zn in our study (from 2-week Z3-exposure to 3- and 5-week Z2-exposure; Table 3.4) suggests Zn accumulation during early maturation stages of juvenile digestive gland (Bustamante *et al.*, 2002b). Because of the lysosomal location of cathepsins in the cuttlefish digestive gland, Zn accumulation likely occurs in this organ, as already described in mollusks for metal contaminants (e.g. Bustamante *et al.*, 2006a, 2002b; Lacoue-Labarthe *et al.*, 2010b; Marigómez *et al.*, 2002; Nicholson, 2003; Tanaka *et al.*, 1983). A direct Zn inhibitory effect on lysosomal cathepsins could result from Zn affinity for cysteine and aspartate amino acids, their catalytic residues (McCall *et al.*, 2000). However, further studies will have to determine if the effect of Zn on cathepsin activity does not result instead from early perturbations of cathepsin synthesis or activation.

Lastly, our study showed inhibition of trypsin activity after 2-week exposure to $230 \mu\text{g L}^{-1}$ (Z4; Table 3.5). This effect is consistent with the recent characterization of trypsin from

S. officinalis digestive gland showing that Zn^{2+} ions had the most powerful inhibitory effect on this enzyme among 9 essential metals (Balti *et al.*, 2009). Such Zn effect on trypsin was not reported in cuttlefish digestive gland cells exposed *in vitro* for 24 h to 1.3 mg L^{-1} (Le Bihan *et al.*, 2004). As trypsin is located in specific excretory organelles of digestive gland cells in cuttlefish (Costa *et al.*, 2014), cell culture conditions may have obscured this function. In contrast, our *in vivo* data suggest a negative effect of Zn on this organelle type. Notably, this process was measured only at a lethal concentration, suggesting more serious consequence of Zn when extracellular digestive process was impacted (compare to intracellular one).

3.4.4 Immune system perturbations

High Zn concentration is known for its negative effects on the immune system in mammals (Chandra, 1984; Ibs et Rink, 2003), but very few studies report its action on the invertebrate immune system. Phenoloxidases, as important melanization precursors, are involved in (1) non-self recognition, (2) production of toxic compounds against pathogens, (3) wound healing and (4) cellular-defense factor synthesis (e.g. Cerenius *et al.*, 2008; Luna-Acosta *et al.*, 2010; Siddiqui *et al.*, 2006).

Our study highlighted a progressive inhibitory effect of Zn-exposure on total PO activities during the first 2 weeks post-hatching (Table 3.6). To the best of our knowledge, the only study focused on the Zn-impact on PO in a mollusk *in vivo* reported a similar decrease in *C. gigas* plasma after 1-week exposure to non-lethal and lethal Zn-concentrations of 530 and $10,200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectively (Mottin *et al.*, 2012). However, in the same study the authors reported an activity increase from 2- until 7-week exposure at $530 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, which was not observed in our study. This lack of PO activity change beyond 2-weeks exposure suggests a Zn adaptative response between 2- and 3-week post-hatching that may be linked to digestive gland maturation. Our data show that PO activity is the most Zn-sensitive biomarker assayed at 2-weeks post-hatching. According to PO functions previously described (Le Pabic, 2014), the decrease in PO-activity observed in this study likely reflects a weakening of juvenile cuttlefish towards environmental stressors (Coles et Pipe, 1994; Cheng *et al.*, 2004).

3.4.5 Growth loss induced by Zn exposures

In ecotoxicology, growth is a major parameter because it results from all deleterious effects induced by xenobiotic exposure. Because of their fast-growth, cephalopods appeared as a good indicator of negative effects induced by long-term non-lethal exposure to Zn. Our study highlighted a size (i.e. ML and weight) decrease after 5-week exposure to non-lethal Zn concentrations : 108 and 185 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Z2 and Z3 ; Fig. 3.3). Notably, and unlike other markers used in this study, effects on size appeared only after 5-week exposure. This growth decrease was subsequent to the cathepsin activity decrease measured after 3-week exposure to 108 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Z2), underlining Zn impact on digestive system even when digestive gland is mature, i.e. when extracellular digestion is fully functional. Consistently, Balti *et al.* (2012) recently showed a strong inhibitory effect of Zn on lysosomal chymotrypsin from adult cuttlefish digestive gland *in vitro*. This size loss likely resulted also from Zn perturbations of other parameters including, but not restricted to those studied here (ACP and PO activities). Considering the link between growth loss and behavior impairment occurring in Z3, it is important to point out that experimental conditions (i.e. closed compartment) always allowed prey capture and consumption (i.e. ‘failure’ to catch a shrimp did not result in a reduced food intake, only more attempts). Moreover, similar growth decrease was observed in Z2 where no behavior impairment occurred, suggesting negligible additional energy loss due to repeated catching trials.

Few studies have reported Zn effects on bivalve and gastropod mollusk growth because of the low growth rates exhibited by most of these species. Recently, Devos *et al.* (2012) measured a 50 % effect concentration for growth (i.e. concentration that induced 50 % reduction of parameter studied, EC_{50}) on oyster spat, *C. gigas*, after 1-week exposure to 497 $\mu\text{g L}^{-1}$ Zn, whereas Dorgelo *et al.* (1995) reported an EC_{50} value of 103 $\mu\text{g L}^{-1}$ after more than 10-weeks Zn exposure to freshwater snail *Potamopyrgus jenkinsi*. Other studies on Zn-impact on growth reported 96-h EC_{50} s on *C. gigas* larval stage below 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Brereton *et al.*, 1973; Watling, 1982). Regarding our results, it seems difficult to estimate such parameter for juvenile cuttlefish because of 1) the set up of processes modifying organism physiology during the first month post-hatching, and 2) the relatively long interval of time between first perturbation observed and growth decrease. Accordingly, it appears necessary to study the main changes in Zn-regulation between hatching and the third week post-hatching.

3.5 Conclusions

This study is the first to report multiple physiological perturbations induced by a contaminant on a cephalopod juvenile stage. We highlighted that mortality during the first 2 first weeks post-hatching was recorded at Zn concentrations at and above $230 \mu\text{g L}^{-1}$. According to our results, the first 2 weeks post-hatching appeared to be the most sensitive period towards Zn, suggesting a weaker capacity to regulate this element before maturity of the digestive gland. These observations were consistent with the major detoxification role of the digestive gland lysosomal system, which is developing during its maturation. Biochemical perturbations were recorded at concentrations already reported in the environment (e.g. Di Salvatore *et al.*, 2013) and close to Environmental Quality Standards (EQS) values considering long-term Zn-exposure in saltwater ($40 \mu\text{g L}^{-1}$). We highlighted perturbations occurring throughout exposure times of the same order than those passed inshore by juveniles. Non-lethal Zn-concentrations induced various effects on digestion, immunity, behavior and growth. According to these data, the question of polluted coastal area impact on juvenile cuttlefish arises. A recent study highlighted the lower recruitment to the English Channel stock of *S. officinalis* born in contaminated areas compare to less anthropically impacted areas (Gras, 2013). Although further studies are needed to determine other contaminant effects on this cuttlefish stage of life, our study suggests that spawning site contamination could be an important variable for cuttlefish recruitment.

According to our results, juvenile cuttlefish appears as an interesting model for ecotoxicology on account of its sensitivity and the possibility for use of a wide diversity of biomarkers. However, detoxification processes of this cephalopod juvenile stage have been rarely investigated. An additional part of this experiment has been dedicated to exploration of this topic and will soon be presented.

Acknowledgments

This work was supported by the European, Interreg IV-A CHRONEXPO project. This study was partly conducted in the CREC (Centre de Recherche en Environnement Côtier) at Luc-sur-mer (Normandie, France). The authors thank Dr Pierre Le Pabic for advice and help in English.

Chapitre 4

Metal homeostasis in the juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* and consequences of dissolved zinc exposure

Charles Le Pabic^{a,b,c}, Christelle Caplat^{a,b,c}, Jean-Paul Lehodey^{a,b,c}, Thomas Milinkovitch^d, Richard Philippe Cosson^e, Noussithé Koueta^{a,b,c}

en préparation en vue d'une soumission à la revue *Aquatic Toxicology*

^a Normandie Université, F-14032 Caen, France

^b UMR BOREA, MNHN, UPMC, UCBN, CNRS-7028, IRD-207, IBFA Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la Paix, CS 14032, 14032 Caen cedex, France

^c Centre de Recherches en Environnement Côtier, Université de Caen Basse-Normandie, 54 rue du Docteur Charcot, 14530 Luc-sur-Mer, France

^d Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 7266, CNRS-Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France

^e Mer Molécules Santé (MMS), Université de Nantes, EA 2663, 2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes, France

Abstract

In this study, we investigated the evolutions of 13 trace metal and metalloid concentrations (i.e. Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se, V, Zn) and their subcellular fractionation in juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* reared in controlled conditions between hatching and 2-months post-hatching. In parallel, metallothionein concentrations were determined. Our results highlighted contrasting evolution of studied metals. Indeed, As and Fe concentrations measured in hatchlings suggested a maternal transfer of these elements in cuttlefish. The non-essential elements Ag and Cd presented the highest uptake during our study, correlated with the digestive gland maturation. During the 6 first weeks of study, soluble fractions of most of essential trace metals (i.e. Co, Cr, Cu, Fe, Se, Zn) slowly increased consistently with the progressive needs of cuttlefish metabolism during this period.

In order to determine for the first time in a cephalopod how metal homeostasis is impacted when trace metal exposed, we studied previously described parameters in juveniles exposed to dissolved Zn at environmental (i.e. $50 \mu\text{g L}^{-1}$) and sublethal (i.e. $200 \mu\text{g L}^{-1}$) levels. Moreover, oxidative stress was assessed (using glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), catalase and lipid peroxidation (LPO)) in digestive gland and gills after 1 and 2 months exposures. Our results highlighted no or low ability of this stage of life to regulate dissolved Zn uptake during all studied period, consistently with high sensitivity of this organism. Notably, Zn exposures caused a dose-dependent Mn depletion in juvenile cuttlefish, and an increase of soluble fraction of Ag, Cd, Cu without uptake modifications, suggesting substitution of these elements (i.e. Mn, Ag, Cd, Cu) by Zn. In parallel, metallothionein concentrations decreased in individuals the most exposed to Zn. Finally, no perturbations in oxidative stress management were detected in gills, whereas level modifications of GST, SOD and catalase activities were recorded in digestive gland, resulting in LPO content increase after 6-week exposure at low Zn concentration. Altogether, these perturbations are consistent with previously described high sensitivity of juvenile cuttlefish towards Zn. Our results underlined the need to study deeply contamination impact on this animal at this stage of life.

Keywords : Mollusk cephalopod ; Juvenile stage ; Zinc ; Metal homeostasis ; Oxidative stress ; *Sepia officinalis*

4.1 Introduction

Mollusk cephalopods are known for their importance in trophic marine ecosystems both as predator and prey (Clarke, 1996; Chouvelon *et al.*, 2011). The economic importance of their fisheries has recently grown worldwide to compensate for finfish stock depletion (Jereb *et al.*, 2005), whereas abundant literature underlines their sensitivity to a wide range of environmental parameters (reviewed in Pierce *et al.*, 2008). Despite constant anthropic pressures on marine ecosystems, few studies investigated the potential physiological impacts of contaminants on these organisms (Di Poi *et al.*, 2013, 2014; Lacoue-Labarthe *et al.*, 2009a, 2010a; Sen et Sunlu, 2007). Yet, early life stages (i.e. eggs and juveniles) of economically important cephalopods are likely to be impacted by anthropogenic contaminants because they develop in coastal areas where these compounds are found at high concentrations (Colas, 2011; Pierce *et al.*, 2010). This is the case of the common cuttlefish *Sepia officinalis*, which is characterized by inshore migration during summer months to reproduce and spawn, and juvenile residence in coastal areas from 1 to 2 months post-hatching to take advantage of prey abundance (Bloor *et al.*, 2013; Boucaud-Camou et Boismery, 1991; Le Goff et Daguzan, 1991). In spite of the shielding properties of the eggshell against metals (Bustamante *et al.*, 2006c, 2004, 2002b; Lacoue-Labarthe *et al.*, 2011, 2010b, 2009c, 2008b), cuttlefish embryos are impacted by low metal concentration exposure (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2010a, 2009a). In addition, accumulation in soft tissues of dissolved Ag, Cd, and Zn followed by relatively long-term retention was reported in juveniles (Bustamante *et al.*, 2004, 2002b). Little is known about the effects of such xenobiotic exposure on juvenile cuttlefish physiology (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2010a, 2009a).

Despite a short life cycle of 1 to 2 years, *Sepia officinalis* (as other cephalopods) is known to accumulate various contaminants (e.g. Ansari *et al.*, 2012; Danis *et al.*, 2005; Miramand et Bentley, 1992; Bustamante *et al.*, 1998a, 2006a,b). Accumulation of trace metals such as Ag, Cd, Cu, Fe and Zn has been reported in the digestive gland, sometimes at very high concentrations (e.g. Martin et Flegal, 1975; Schipp et Hevert, 1978; Decleir *et al.*, 1978; Miramand et Bentley, 1992; Bustamante *et al.*, 2006a). Notably, trace metal accumulation starts after hatching and takes place through the entire life cycle, yet tissue-specific accumulation depends on digestive gland maturation (Miramand *et al.*, 2006). While several studies highlighted the essential role of the digestive gland in the detoxification of trace metal elements in *Sepia*

officinalis and other cephalopods (Bustamante *et al.*, 2002a, 2004, 2008; Lacoue-Labarthe *et al.*, 2009d; Martin et Flegal, 1975; Miramand et Bentley, 1992; Raimundo *et al.*, 2010b, 2014), no study investigated metal homeostasis at juvenile stages during maturation of this organ (i.e. first month post-hatching).

Detoxification mechanisms of marine invertebrates mainly involve the precipitation of metals into insoluble concretions and the binding to cytosolic proteins, both being interconnected (Wallace *et al.*, 2003; Wang et Zhang, 2010). Metallothioneins (MTs) are one class of these metal-binding proteins, characterized by low molecular weight, high cystein content and heat stability. They play a role in the homeostasis of the essential metals, Cu and Zn, but can be induced by various other metals (e.g. Ag, Cd, Hg) (Cosson, 1991; Amiard *et al.*, 2006; Wang et Zhang, 2010). In cephalopods, subcellular distribution of metals in the digestive gland appears to be species- and element-specific, but most studies reported mainly association of Ag, Fe, Mn, Pb and Zn with the insoluble fraction, while Cd, Co and Cu are mainly associated with the cytosolic fraction (Tanaka *et al.*, 1983; Finger et Smith, 1987; Bustamante *et al.*, 2002a, 2006a). Cu is also the main element found associated with MTs in the digestive gland of several cephalopod species (Tanaka *et al.*, 1983; Finger et Smith, 1987; Bustamante *et al.*, 2006a), whereas results about Ag- and Cd-MT association remain controversial (Tanaka *et al.*, 1983; Finger et Smith, 1987; Bustamante *et al.*, 2002a, 2006a). To date, the MT involvement in the homeostasis of the cephalopod juvenile stage has not been investigated.

Although Zn is an essential nutrient of living organisms – it is a component of more than 300 enzymes and other proteins (McCall *et al.*, 2000), some studies highlighted its toxicity in marine organisms at concentrations of 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ and above (e.g. Amado Filho *et al.*, 1997; Brereton *et al.*, 1973; Nadella *et al.*, 2013; Tellis *et al.*, 2014; Watling, 1982). In European marine waters, Zn is one of the most highly concentrated dissolved metals, regularly measured near 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Lachambre et Fisson, 2007c; Sheahan *et al.*, 2007), and worldwide, some studies reported concentrations reaching several mg L^{-1} in coastal areas (Amado Filho *et al.*, 1997; Liu et Wang, 2013; Srinivasa Reddy *et al.*, 2005). Zn is also one of the most concentrated metals in the digestive gland of cuttlefish (Bustamante *et al.*, 2006a; Miramand et Bentley, 1992; Miramand *et al.*, 2006; Rjeibi *et al.*, 2014). Its effects on the uptake of other metals, their subcellular distribution, and MT concentrations have been highlighted

in bivalve mollusks (Liu et Wang, 2013; Shi et Wang, 2004b; Blackmore et Wang, 2002; Lemoine *et al.*, 2000; Hennig, 1986). For instance, Zn exposure induced an increase in Zn uptake as well as Cd and Cu in the bivalve *Crassostrea hongkongensis* (Liu et Wang, 2013). To the best of our knowledge, such responses have not been assayed in cephalopods. Finally, trace metals are known for their ability to induce reactive oxygen species (ROS) production, causing oxidative stress as previously described in bivalves (e.g. Funes *et al.*, 2006; Company *et al.*, 2004; Geret et Cosson, 2002; Geret *et al.*, 2002, gastropods (Radwan *et al.*, 2010; Chandran *et al.*, 2005; Malanga *et al.*, 2004) and the cephalopod *Octopus vulgaris* (Semedo *et al.*, 2012). To avoid or counteract ROS effects, organisms use a set of enzymes including glutathione S-transferases (EC 2.5.1.18, GST), superoxide dismutase (EC 1.15.1.1, SOD) and catalase (EC 1.11.1.6). Their activities have been extensively used as biomarkers of oxidative stress, and correlated to the presence of metals in invertebrates (e.g. Regoli et Principato, 1995; Vlahogianni *et al.*, 2007; Semedo *et al.*, 2012). The imbalance between production and removal of ROS may result in lipid peroxidation (LPO), a biomarker often used to evaluate the degree of oxidative stress (e.g. Vlahogianni *et al.*, 2007; Di Salvatore *et al.*, 2013; Radwan *et al.*, 2010; Zielinski et Pörtner, 2000).

In order to better describe and understand metal homeostasis in juvenile cuttlefish and point to the effect of physiological modifications on the bioaccumulation and detoxification processes associated with digestive gland maturation, we quantified the presence, concentration evolution and subcellular distribution of 13 elements (Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se, V, Zn) in whole-juveniles during their coastal life stage (i.e. first 2 months post-hatching). The concentration of MTs was also assayed and correlated with metal concentration evolution. Concurrently, these parameters were measured under Zn-exposure, in addition to oxidative stress parameters (GST, SOD, catalase, LPO) in the digestive gland and in the gills.

4.2 Materials and methods

4.2.1 Animals

Cuttlefish eggs were collected from traps set along the Calvados coast (Basse-Normandie, France) during summer 2012. All rearing procedures were held at the Centre de Recherches

en Environnement Côtier (Luc-sur-Mer, France). At the laboratory, the eggs were separated for optimal oxygenation, acclimatized at $17 \pm 1^\circ\text{C}$, and maintained in open-circuit tanks until hatching. Between 1 and 2 day post-hatching, juveniles were randomly acclimatized in experimental structures and fed 24 h later according to hatchling yolk consumption period (Yim et Boucaud-Camou, 1980). During all experiment, cuttlefish were fed once a day with alive brown shrimp *Crangon crangon* of adapted size. Special attention was payed daily to feed all animals with shrimps of the same size range.

4.2.2 Experimental design

4.2.2.1 Experimental system and seawater quality follow-up

To allow individual follow-up, constant exposure, as well as long-term water quality (particularly considering nitrogen compounds), we set up experimental units presented in figure 4.1. In a 40-L tank (corresponding to one experimental unit), seawater mixing and oxygenation were provided by 2 water pumps (NJ400, Aquarium systems, France) and 2 air stones. A constant water renewal was provided in each experimental unit by peristaltic pump (521F/D2, Watson-Marlow Pumps Group, France), supplied with frequency converter and pumpheads (312X2, Watson-Marlow Pumps Group, France), at a rate of 30 mL min^{-1} from 60-L reservoirs. Seawater used during all experiments was decanted charcoal-filtered natural seawater to minimize particles and other dissolved metals attendance. Depending on renewal rate, reservoirs were refilled each day with seawater (either Zn-contaminated or control). In order to avoid animal interactions and to allow individual follow-up, a compartmentalized sieve was used. Each compartment had an area of 104 cm^2 , which is enough space for juvenile development according to Forsythe *et al.* (1994). During all experiments, seawater parameter monitoring was checked daily. Global parameter variations for all experimental structures were : temperature = $17.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$; salinity = 32.5 ± 1 ; ammonia-, nitrite-, and nitrate-nitrogen $< 0.5 \text{ mg L}^{-1}$, $< 0.5 \text{ mg L}^{-1}$ and $< 80 \text{ mg L}^{-1}$ (according to Oestmann *et al.*, 1997); pH = 8.0 ± 0.1 ; and dissolved oxygen $> 9 \text{ mg L}^{-1}$. Experiments were realized under a natural photoperiod. To keep high water quality, feces were siphoned every 3 days, making sure not to disturb juveniles.

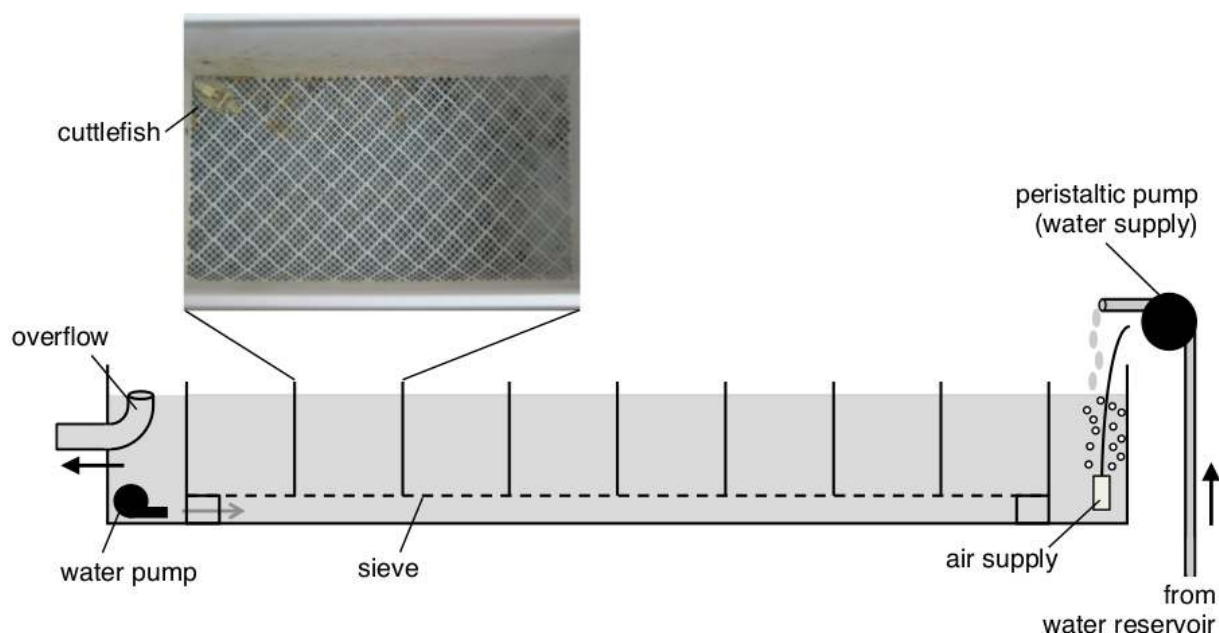


FIGURE 4.1 – Side view of the experimental system and top view of a compartmentalized sieve allowing individual follow-up of juvenile cuttlefish. Black arrows indicate the circulating direction of water renewal and grey arrow indicates water pump mixing direction inverted on the other side tank.

4.2.2.2 Zn-exposures and measurements

During summer 2012, and according to previous studies on mortality induced by dissolved Zn on juvenile cuttlefish (unpublished data), juvenile cuttlefish were exposed to 50 and 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Z1 and Z2, respectively) Zn concentrations for 8- and 6-weeks, respectively, alongside a control. Both Zn concentrations were environmentally realistic, with Z2 corresponding to concentrations close to the previously determined 2-week LC_{50} value for juvenile cuttlefish (unpublished data). The exposure media were spiked daily just after reservoir water renewal, using 20.84 g L^{-1} ZnCl_2 (i.e. 10.0 g L^{-1} Zn) stock solution (ZnCl_2 reagent grade, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, France), prepared in 0.22 μm -filtered artificial seawater (25.5 g NaCl, 6.4 g MgSO_4 , 5.2 g HEPES, 1.5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.75 g KCl in 1 liter Milli-Q water, pH 7.4). According to preliminary trials, each reservoir was spiked weekly with respective nominal concentrations plus 10 % in order to keep constant concentrations and compensate animal absorption and experimental unit adsorption.

For all 3 batches (control and the 2 exposure conditions), 20 mL of seawater was sampled daily, immediately acidified with 1 % nitric acid (HNO_3 69.5 %, Normapur grade), and stored at 4°C until analyses. Zn concentrations in the seawater were determined by air-acetylene

flame atomic absorption spectrometry (F-AAS; AA240F – Varian) at a wavelength of 213.9 nm and with a slit of 1 nm. AAS is equipped with deuterium lamp (coded hollow-cathode lamp from Photron Lamps) to correct for nonspecific absorption. All calibration solutions were diluted from a stock standard (Zn calibration solution 1.000 ± 0.005 g L⁻¹ Analytika Ltd.) in saline medium (30 g L⁻¹ NaCl, Normapur, 99 %). Triplicate analyses were done on each sample and the mean values were used for evaluation. The limit of detection, defined as the background plus three times the standard deviation of the blank (3σ), for the determination of the Zn concentration in seawater was $6.2 \mu\text{g L}^{-1}$.

4.2.2.3 Sampling procedure

All samplings were performed on 24-h fasting animals. Considering the elemental concentration assays, 9 animals were sampling at the beginning of the experiment thereafter 5 animals from each batches were randomly removed every 2-weeks exposure (i.e. after 2-, 4-, 6- and 8-weeks). According to organ size, samplings dedicated to enzymatic assays were realized with 5 animals per conditions after 4-week exposure in Z2, and 4-, 6- and 8-week exposure in control and Z1 conditions. All animals sampled were anesthetized in solution of 2 % ethanol with 17.5 mg L^{-1} MgCl₂ in seawater for 5 min, afterwards they were measured (weight and mantle length). Individuals dedicated to elemental analysis were immediately frozen in liquid nitrogen, whereas the digestive gland and the gills were sampled on preliminary beheaded animals (Di Poi *et al.*, 2014). Tissues were then frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for enzymatic assay, whereas whole animals were freeze-dried and individually ground for MTs and trace metal analysis.

4.2.3 Subcellular fractionation and MT determination

Whole cuttlefish were analysed for their global MT levels. Between 30 and 100 mg of ground dry tissue were homogenized on ice in 4-6 mL (depending of aliquot size) 100 mM Tris buffer with β -mercaptoethanol at pH 8.1 and then centrifuged ($30\,000 \times g$; 30 min; 4°C). Around 100 μL of supernatants were used for MT assay, while pellets (i.e. the insoluble fraction) and the rest of supernatant (i.e. the soluble fraction) were freezed for trace element analysis. Before MT dosage, the supernatant aliquot was submitted to heat denaturation (95°C; 15 min), placed on ice 10 min and centrifuged ($10\,000 \times g$; 10 min, 4 °C) to separate

the heat-stable proteins from the denatured proteins. The supernatant stemming from the second centrifugation was frozen (-20°C) until MT quantification.

Differential pulse polarographic analysis (DPP) was used to determine the amount of MTs in the heat-denatured soluble fraction. DPP is a technique based on $-\text{SH}$ compound determination according to Brdička reaction (Brdička, 1933) as described by Thompson et Cosson (1984). Model 303A static mercury drop electrode was used. Certified rabbit liver MTs (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) were used to carry out the calibration according to the method of standard additions. The system consisted of a bevelled capillary Hg working electrode, a Pt counter electrode, and an Ag/AgCl reference electrode. Results are expressed in μg of MTs per g of dry homogenized tissue ($\mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$).

4.2.4 Trace element analysis in respective soluble and insoluble fractions

For analysis of all elements (i.e. Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se, V and Zn), from 50 to 300 mg of each subcellular fractions were digested using a 3:1 (v:v) nitric-hydrochloric acid mixture with 65 % ultrapure HNO_3 and ultrapure 37 % HCl. The acidic digestion was performed overnight under ambient temperature and then heated in a microwave for 30 min, increasing the temperature up to 105°C , and 15 min at 105°C (1200 W). After the mineralization process, each sample was diluted to 30 or 50 mL with milli-Q quality water, according to the volume of acid added to the mineralization (3 and 4.5 mL, respectively).

Trace elements were analysed by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (Varian Vista-Pro ICP-OES) and Mass Spectrometry (ICP-MS II Series Thermo Fisher Scientific). Reference tissues – dogfish liver DOLT-4 (NRCC), lobster hepatopancreas TORT-2 (NRCC) – were treated and analysed in the same way as the samples. Results were in line with the certified values, and the standard deviations were low, proving good repeatability of the method. The results for standard reference materials displayed recovery of the elements ranging from 73 % to 114 %. The detection limits ($\mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$) were 0.015 (Cd), 0.017 (Ag), 0.02 (Co, Cr, Pb), 0.03 (Ni), 0.08 (Mn), 0.1 (Cu, Se), 0.2 (As), 0.3 (V) and 3.3 (Fe and Zn). Element concentrations are expressed in $\mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$.

4.2.5 Biochemical analysis

Sampled digestive gland and gills of one animal were separately weighed before to be homogenized with a Potter-Elvehjem homogeniser in ice-cold phosphate buffered saline (500 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ and 3.1 mM KH₂PO₄, pH 7.4, PBS) containing 1 % Halt Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free (100X, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Weight:volume ratio of 1:2 and 1:1 was used respectively for digestive gland and gills. Homogenates were then centrifuged at $12\,500 \times g$ for 15 min at 4°C (S9 fraction), and supernatants used for determining protein content, LPO, as well as enzymatic activities (GST, SOD, catalase).

4.2.5.1 Protein assay

Total protein concentration was determined according the Bradford method (1976) using bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Chemicals, France) as standard. Enzymatic activities and LPO content were expressed in relation to protein concentration measured in S9 fraction.

4.2.5.2 GST assay

GST activity was measured for each individual in triplicate according to Habig *et al.* (1974) (adapted for microplate). Briefly, 50 μ L of S9 fraction adjusted to 250 μ g prot mL⁻¹ in PBS were mixed in a microplate wells with 200 μ L of reagent solution (1 mM reduced glutathione (GSH), 10 mM Hepes, 125 mM NaCl, and 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), pH 6.5). For the blank, S9 fraction was replaced by PBS. The enzymatic reaction kinetic was spectrophotometrically monitored at 340 nm for 20 min at 25°C, and blank value systematically subtracted. The results were expressed as μ mol of glutathione-CDNB conjugates per min and mg of proteins (μ mol min⁻¹ mg⁻¹ prot).

4.2.5.3 SOD assay

SOD activity was measured using the assay developed by Paoletti *et al.* (1986) and adapted for microplate. A SOD standard (Sigma-Aldrich Chemicals, France) range from 2.5 to 10 U mL⁻¹ was made in PBS. The inhibition of β -NADH (Sigma-Aldrich Chemicals, France) oxidation was then monitored at 340 nm for 90 min at 25°C using 20 μ L of PBS (blank), SOD standard, or S9 fraction adjusted to 150 μ g prot mL⁻¹, mixed with 173 μ L of 0.4 mM

β -NADH, 6 mM EDTA and 3 mM MnCl_2 and 10 mM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich Chemicals, France). The results were expressed in U mg^{-1} of protein.

4.2.5.4 Catalase assay

Catalase activity was monitored for each individual in triplicate using the method previously described by Babo et Vasseur (1992) and modified for microplate reading. A catalase standard (Sigma-Aldrich Chemicals, France) range from 1 to 6 U mL^{-1} was made in PBS. Then, 100 μL of S9 fraction (adjusted respectively to 1.5 and 1.0 mg prot mL^{-1} in PBS for digestive gland and gills) or catalase standard were mixed with 100 μL of hydrogen peroxyde 28 mM. The hydrogen peroxyde degradation kinetics were assessed at 240 nm for 15 min at 25°C in UV microplate (Greiner Bio-One, Germany), and the results were expressed in U mg^{-1} of protein.

4.2.5.5 LPO determination

LPO level was assessed via malondialdehyde (MDA) content determined using a commercially available MDA assay kit (Oxis International, USA). The method was based on the reaction of a chromogenic reagent, N-methyl-2-phenylindole, with MDA at 45°C. The blue product was quantified by measuring absorbance at 586 nm (Gérard-Monnier *et al.*, 1998). The results were expressed in nmol MDA g^{-1} of protein.

4.2.6 Statistical analysis

To study the evolution of each variables function of time, their homogeneity of variances (Levene test) and normal residual distributions (Shapiro test) were first tested. According to the results, ANOVA or permutational ANOVA (in case of non normal residuals) followed by non parametric pairwise permutational t -test ($N < 30$) were realized. In case of variance non-homogeneity, Kruskal-Wallis test followed by the Wilcoxon signed-rank were used. In some cases, logarithmic (Log; As total concentration) or reciprocal (Fe total concentration) were used to meet the underlying assumptions of normality and homogeneity of variances. Pearson and Spearman correlations, respectively between soluble and insoluble concentrations of trace metals, were analyzed according to data binormality assumption. Comparisons between variables from control and Zn exposed individuals were realized using ANCOVA

when data evolutions were linear (i.e. MTs, Mn total concentration, GST activity). In the case of MT comparison, a square transformation was used to realized this test. Otherwise, comparison with control was assessed at each time-point using Student's t -test. R software was used for statistics and graphics.

4.3 Results

No mortality occurred during this experiment.

4.3.1 Trace metal homeostasis in juvenile cuttlefish

In this study, the soluble and insoluble amounts of trace metals as well as the MT content were measured in each animal.

4.3.1.1 Variation of the trace metal concentration

In order to define metal homeostasis in healthy juveniles, the concentration of 13 trace metals and metalloids was assayed in whole *S. officinalis* directly after hatching and at 2-, 4-, 6 and 8-week post-hatching (Table 4.1). Trace element concentrations were grouped together according to their evolution in whole juvenile cuttlefish between hatching time and 8 weeks. During this period, the total concentration of 5 elements decreased (As, Cr, Fe, Mn and Ni), while it increased for 4 elements (Ag, Cd, Cu and Se), remained constant for 3 elements (Co, Pb and Zn) and stayed below the detection limit for V. Among decreasing elements, As and Fe displayed the highest concentrations found in hatchlings (176 ± 76 and $103 \pm 71 \mu\text{g g}^{-1}$ dw, respectively), whereas Cr, Mn and Ni displayed lower concentrations of 1.87 ± 0.36 , 2.67 ± 0.36 and $1.71 \pm 0.46 \mu\text{g g}^{-1}$ dw, respectively. This decreasing phase mainly occurred between hatching time and the 6th week for all these elements, reaching 55.8 ± 9.4 , less than 0.28, 25.3 ± 4.1 , 1.95 ± 0.1 and $1.06 \pm 0.08 \mu\text{g g}^{-1}$ dw, respectively for As, Cr, Fe, Mn and Ni. Among increasing elements, the Cu increase occurred during the 2 first weeks (from 47.2 ± 5.0 to $59.3 \pm 3.1 \mu\text{g g}^{-1}$ dw) afterwards its concentration remained constant. Although increasing, Se concentration did not present clear pattern of evolution during the period (ranging between 1.81 ± 0.21 and $2.64 \pm 0.05 \mu\text{g g}^{-1}$ dw). During the first month of study, the non-essential elements Ag and Cd presented an important accumulation from values lower than $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ dw in hatchlings for both elements to 2.09 ± 0.22 and $0.39 \pm 0.06 \mu\text{g g}^{-1}$ dw, respectively, afterwards their concentrations remained stable. During all the studied period, Co, Pb and Zn concentrations remained constant around 0.21 ± 0.04 , 0.41 ± 0.12 and $88.3 \pm 7.8 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively.

TABLE 4.1 – Total trace element concentration (mean $\pm$ SD ; $\mu\text{g g}^{-1}$ dw) in whole juvenile *Sepia officinalis* during its two first months of life.

Life stage	Mantle length (mm)	Age	N	Ag	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe
Hatchlings	9.2 $\pm$ 0.5 8.4-9.8	0 days	9	< 0.14 ^c < 0.10-0.15	176 $\pm$ 76 ^a 113-346	< 0.10 ^c < 0.06-0.21	0.20 $\pm$ 0.06 0.14-0.35	1.87 $\pm$ 0.36 ^a 1.35-2.28	47.2 $\pm$ 5.0 ^b 41.7-57.7	103 $\pm$ 71 ^a 30.5-218.4
Juveniles	10.3 $\pm$ 0.1 10.1-10.5	14 days	5	1.57 $\pm$ 0.18 ^b 1.37-1.86	139 $\pm$ 33 ^a 112-192	0.25 $\pm$ 0.03 ^b 0.22-0.30	0.20 $\pm$ 0.02 0.18-0.24	1.58 $\pm$ 0.46 ^a 0.93-2.11	59.3 $\pm$ 3.1 ^a 54.8-62.8	49.1 $\pm$ 9.6 ^{ab} 35.9-59.5
	11.7 $\pm$ 0.7 10.9-12.7	1 month	5	2.09 $\pm$ 0.22 ^a 1.79-2.34	95.2 $\pm$ 17.1 ^b 73.2-112.7	0.39 $\pm$ 0.06 ^a 0.33-0.46	0.24 $\pm$ 0.03 0.20-0.27	0.45 $\pm$ 0.12 ^b 0.34-0.63	67.2 $\pm$ 6.7 ^a 57.7-75.5	34.8 $\pm$ 4.0 ^b 28.6-38.7
	16.4 $\pm$ 0.9 15.0-17.4	1.5 months	5	1.92 $\pm$ 0.21 ^a 1.74-2.27	55.8 $\pm$ 9.4 ^c 42.2-68.1	0.28 $\pm$ 0.06 ^{ab} 0.23-0.37	0.21 $\pm$ 0.02 0.19-0.24	< 0.28 ^c < 0.20-0.28	60.7 $\pm$ 7.6 ^a 50.0-71.1	25.3 $\pm$ 4.1 ^c 21.0-31.2
	22.3 $\pm$ 1.3 21.3-22.6	2 months	5	1.97 $\pm$ 0.09 ^a 1.85-2.09	50.4 $\pm$ 4.0 ^c 46.0-55.0	0.36 $\pm$ 0.01 ^a 0.35-0.37	0.21 $\pm$ 0.01 0.19-0.23	0.44 $\pm$ 0.17 ^b 0.31-0.73	65.2 $\pm$ 5.1 ^a 56.6-70.1	25.0 $\pm$ 8.0 ^{bc} 20.2-39.2
Life stage	Mantle length (mm)	Age	N	Mn	Ni	Pb	Se	V	Zn	
Hatchlings	9.2 $\pm$ 0.5 8.4-9.8	0 days	9	2.67 $\pm$ 0.36 ^a 2.20-3.49	1.71 $\pm$ 0.46 ^a 1.24-2.74	< 0.46 < 0.23-0.68	1.81 $\pm$ 0.21 ^b 1.53-2.09	< 1.84 -	90.2 $\pm$ 8.1 79-100	
Juveniles	10.3 $\pm$ 0.1 10.1-10.5	14 days	5	2.29 $\pm$ 0.14 ^{ab} 2.15-2.52	1.36 $\pm$ 0.20 ^{ab} 1.25-1.71	0.33 $\pm$ 0.06 0.25-0.34	2.08 $\pm$ 0.11 ^{ab} 1.94-2.20	< 0.99 -	82.3 $\pm$ 6.8 76.8-93.6	
	11.7 $\pm$ 0.7 10.9-12.7	1 month	5	2.14 $\pm$ 0.23 ^{bc} 1.87-2.46	1.23 $\pm$ 0.15 ^{bc} 1.01-1.42	0.43 $\pm$ 0.13 0.28-0.58	2.64 $\pm$ 0.05 ^a 2.58-2.69	< 0.60 -	88.2 $\pm$ 4.6 85.0-96.0	
	16.4 $\pm$ 0.9 15.0-17.4	1.5 months	5	1.95 $\pm$ 0.10 ^c 1.87-2.09	1.06 $\pm$ 0.08 ^c 0.95-1.13	0.43 $\pm$ 0.11 0.34-0.60	2.04 $\pm$ 0.28 ^{ab} 1.76-2.40	< 0.78 -	87.3 $\pm$ 12.3 73.9-104.9	
	22.3 $\pm$ 1.3 21.3-22.6	2 months	5	1.85 $\pm$ 0.26 ^{bc} 1.59-2.28	1.05 $\pm$ 0.09 ^c 0.97-1.20	0.36 $\pm$ 0.08 0.25-0.45	2.26 $\pm$ 0.08 ^a 2.16-2.36	< 1.0 -	92.3 $\pm$ 2.2 88.5-94.0	

4.3.1.2 Variation of the subcellular distribution

To better understand the evolution of subcellular fractions of trace metals in juveniles during the first 2 months post-hatching, soluble trace metals were assayed as proportion of total content between hatching and 2 month post-hatching in whole animals (Table 4.2). During this period, the subcellular distributions of As, Cd, Mn, Ni and Pb remained constants at around 93.0 ± 1.5 , 28.2 ± 4.2 , 36.5 ± 7.8 , 75.9 ± 6.0 and 77.9 ± 5.5 % in the soluble fraction, respectively. Soluble Ag distribution alone decreased from 10.4 ± 1.7 to 7.4 ± 0.6 % between 2 and 6 weeks. In contrast, the distribution of soluble Co, Cu, Fe and Zn increased mainly between hatching and 6 weeks from 49.2 ± 5.9 to 74.9 ± 2.0 , 27.3 ± 11.8 to 55.1 ± 5.1 , 14.0 ± 12.8 to 48.6 ± 7.7 and 14.8 ± 5.8 to 26.6 ± 4.0 %, respectively. Our study highlighted that Ag, Cd, Fe, Mn and Zn were mainly associated to the insoluble fraction while As, Co, Cr, Ni, Pb and Se were mainly found in the soluble fraction in the whole juvenile cuttlefish. Notably, Cu was the only element displaying a major proportion as insoluble form in the hatchlings, subsequently switching to a majority as soluble form at the end of the study period. The positive correlations between the soluble fractions of all trace elements (Table 4.3) as well as the insoluble fractions (Table 4.4) allowed at distinguishing 2 groups of elements : Ag, Cd, Co, Cu, Zn and As, Cr, Fe, Mn, Ni. Soluble and insoluble Pb and Se concentrations were differently correlated in both fractions.

TABLE 4.2 – Soluble metal proportions (% $\pm$ SD) in whole *Sepia officinalis* during its two first months of life.

Life stage	Mantle length (mm)	Age	N	Ag	As	Cd	Co	Cr	Cu
Hatchlings	9.2 $\pm$ 0.5 8.4-9.8	0 days	9	n.d. n.d.	92.8 $\pm$ 1.8 89.5-95.5	n.d. n.d.	49.2 $\pm$ 5.9 ^c 43.1-60.8	62.1 $\pm$ 14.6 ^b 43.6-83.7	27.3 $\pm$ 11.8 ^b 11.0-39.8
Juveniles	10.3 $\pm$ 0.1	14 days	5	10.4 $\pm$ 1.7 ^a	93.9 $\pm$ 1.4	27.6 $\pm$ 5.5	68.1 $\pm$ 3.2 ^b	50.0 $\pm$ 17.2 ^b	41.3 $\pm$ 7.5 ^b
	10.1-10.5			8.5-12.9	92.2-95.3	19.7-34.5	63.8-72.0	33.0-77.4	31.2-51.9
	11.7 $\pm$ 0.7	1 month	5	8.4 $\pm$ 1.3 ^{ab}	93.6 $\pm$ 1.4	25.4 $\pm$ 4.7	68.5 $\pm$ 3.5 ^b	68.0 $\pm$ 9.7 ^{ab}	40.8 $\pm$ 6.2 ^b
	10.9-12.7			7.1-10.2	91.3-94.9	18.5-30.1	64.2-72.1	57.9-79.1	33.8-49.7
	16.4 $\pm$ 0.9	1.5 months	5	7.4 $\pm$ 0.6 ^b	92.4 $\pm$ 0.9	30.7 $\pm$ 3.3	74.9 $\pm$ 2.0 ^a	n.d.	55.1 $\pm$ 5.1 ^a
	15.0-17.4			6.8-7.9	91.2-93.6	27.1-34.8	72.1-76.7	n.d.	47.3-61.0
	22.3 $\pm$ 1.3	2 months	5	7.8 $\pm$ 0.9 ^{ab}	92.7 $\pm$ 1.5	29.2 $\pm$ 1.6	70.3 $\pm$ 2.1 ^b	83.2 $\pm$ 9.9 ^a	55.8 $\pm$ 0.7 ^a
	21.3-22.6			6.6-8.9	90.3-94.3	28.2-31.2	66.8-72.5	67.0-92.3	55.1-56.8

Life stage	Mantle length (mm)	Age	N	Fe	Mn	Ni	Pb	Se	Zn
Hatchlings	9.2 $\pm$ 0.5 8.4-9.8	0 days	9	14.0 $\pm$ 12.8 ^c 2.4-37.4	35.6 $\pm$ 6.7 22.5-44.4	73.5 $\pm$ 9.7 56.9-82.6	n.d. n.d.	51.4 $\pm$ 3.6 ^b 46.5-56.3	14.8 $\pm$ 5.8 ^b 6.0-23.6
Juveniles	10.3 $\pm$ 0.1	14 days	5	31.9 $\pm$ 7.4 ^b	41.6 $\pm$ 3.7	73.5 $\pm$ 5.2	79.3 $\pm$ 2.8	62.0 $\pm$ 3.6 ^a	18.4 $\pm$ 2.9 ^b
	10.1-10.5			25.6-42.8	37.1-45.0	67.9-81.9	76.8-83.6	55.8-65.1	15.6-22.3
	11.7 $\pm$ 0.7	1 month	5	34.9 $\pm$ 4.8 ^b	41.3 $\pm$ 8.5	77.0 $\pm$ 3.3	83.4 $\pm$ 4.5	64.0 $\pm$ 2.0 ^a	20.2 $\pm$ 4.5 ^b
	10.9-12.7			31.3-43.1	28.0-50.1	74.3-80.9	79.0-87.5	62.1-66.9	14.9-25.0
	16.4 $\pm$ 0.9	1.5 months	5	48.6 $\pm$ 7.7 ^a	36.6 $\pm$ 7.9	78.6 $\pm$ 2.4	74.8 $\pm$ 6.7	63.5 $\pm$ 1.5 ^a	26.6 $\pm$ 4.0 ^{ab}
	15.0-17.4			37.8-55.9	22.8-41.4	75.7-81.5	69.1-85.8	60.9-65.1	23.4-32.3
	22.3 $\pm$ 1.3	2 months	5	35.7 $\pm$ 7.2 ^{ab}	28.2 $\pm$ 6.1	78.4 $\pm$ 0.9	75.1 $\pm$ 3.9	63.6 $\pm$ 2.0 ^a	30.0 $\pm$ 1.2 ^a
	21.3-22.6			26.4-44.0	21.0-37.1	77.3-79.2	69.4-80.2	60.5-66.0	28.6-31.7

TABLE 4.3 – Positive correlations between soluble concentrations of trace elements and metallothioneins measured in control juvenile cuttlefish between 2- and 8-week post-hatching. Upright and italic scripts correspond to Pearson and Spearman correlations, respectively. Underlined : p -value<0.001 ; other : p -value<0.05.

Trace element and MTs	
Ag	Cd <u>Co</u> <u>Cu</u> <u>Zn</u>
As	<i>Cr</i> <i>Fe</i> <i>Mn</i> <i>Ni</i>
Cd	Ag Co <u>Cu</u> <u>Zn</u>
Co	<u>Ag</u> Cd Cu Fe <i>Ni</i> Pb Se <i>Zn</i>
Cr	<i>As</i>
Cu	<u>Ag</u> <u>Cd</u> Co <u>Zn</u> MTs
Fe	<i>As</i> Co <u>Mn</u> <u>Ni</u>
Mn	<i>As</i> <u>Fe</u> <u>Ni</u>
Ni	<i>As</i> <i>Co</i> <u>Fe</u> <u>Mn</u> Se
Pb	Co
Se	Co Ni
Zn	Ag <u>Cd</u> <i>Co</i> <u>Cu</u> <i>MTs</i>
MTs	Cu <i>Zn</i>

TABLE 4.4 – Positive correlations between insoluble concentrations of trace elements measured in control juvenile cuttlefish between 2- and 8-week post-hatching. Upright and italic scripts correspond to Pearson and Spearman correlations, respectively. Underlined : p -value<0.001 ; other : p -value<0.05.

Trace element	
Ag	<u>Cd</u> Co Pb
As	<u>Cr</u> <u>Fe</u> <i>Ni</i> <i>Pb</i> <u>Se</u>
Cd	<u>Ag</u> <i>Co</i> <i>Cu</i> <u>Zn</u>
Co	<u>Ag</u> <i>Cd</i> Cu <i>Mn</i> <u>Zn</u>
Cr	<u>As</u> <u>Fe</u> <i>Ni</i> <i>Se</i>
Cu	<u>Cd</u> Co <u>Zn</u>
Fe	<u>As</u> <u>Cr</u> <u>Mn</u>
Mn	<i>Co</i> <u>Fe</u> <u>Ni</u>
Ni	<i>As</i> <i>Cr</i> <u>Mn</u>
Pb	<u>Ag</u> <i>As</i>
Se	<u>As</u> <u>Cr</u>
Zn	<u>Cd</u> <u>Co</u> <u>Cu</u>

4.3.1.3 Variation of MT concentration and correlation with soluble element concentrations

The MT concentrations were assayed in the heat-stable soluble fraction of whole juveniles during the first 2 months post-hatching (Fig. 4.2). Its concentrations increased dramatically along the experiment, highlighting an important MT synthesis occurred at this period, particularly during the 6 first weeks post-hatching, which increased from 686 ± 93 to $5551 \pm 631 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$. During this period, MT concentrations and size (weight and mantle length) had a positive linear correlation ($\text{cor}=0.93$ and 0.90 , respectively, and $p\text{-values} < 0.001$). After the 6th week, MT concentrations decreased back to 4-week levels (i.e. $3617 \pm 417 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$).

Positive correlations were found between MT concentrations and soluble Cu- and Zn concentrations ($\text{cor}=0.41$ and $\text{rho}=0.47$, respectively) (Table 4.3).

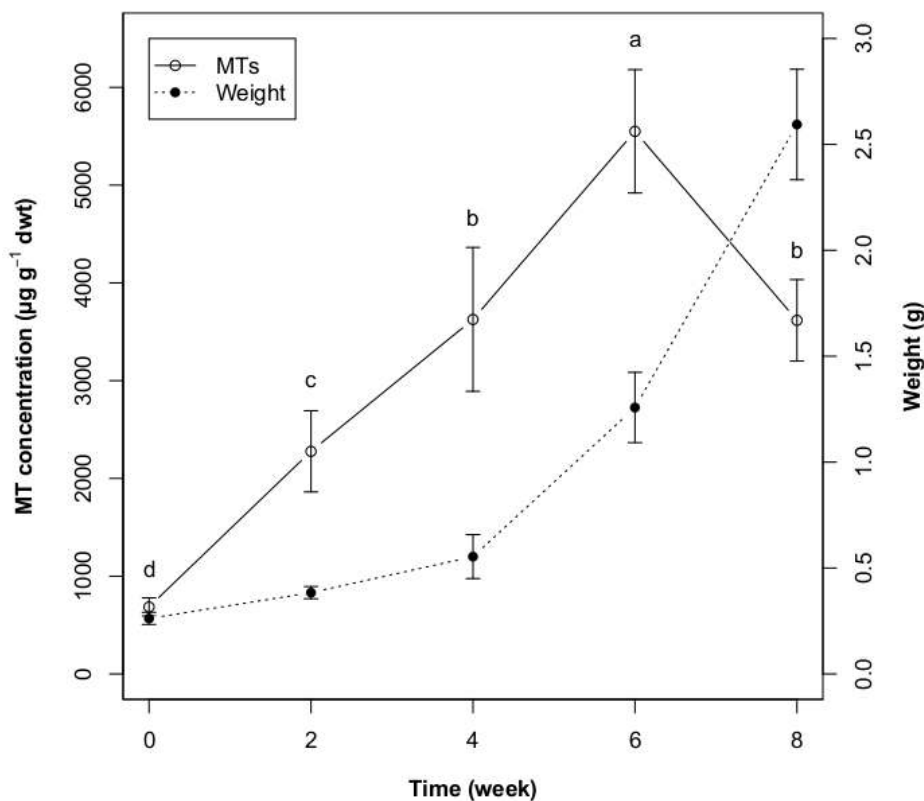


FIGURE 4.2 – Evolution of metallothionein concentrations (mean $\pm$ SD ; $\mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$) in juvenile cuttlefish and associated weight (mean $\pm$ SD ; g) during the 2 months post-hatching.

4.3.2 Zn exposures

Table 4.5 shows the mean Zn concentrations during studied period (i.e. 8 and 6 weeks, respectively for Z1 and Z2) expressed in $\mu\text{g L}^{-1}$ and μM , measured in the seawater of control, Z1 and Z2 batches. Table 4.6 shows the mean concentrations of studied trace elements in prey used during the study.

TABLE 4.5 – Zinc concentrations (mean $\pm$ SD in $\mu\text{g L}^{-1}$ and μM) in seawater during the experiment

Zn concentration	Control	Z1	Z2
$\mu\text{g L}^{-1}$	< 6.2	52 ± 3	184 ± 11
μM	< 0.1	0.80 ± 0.05	2.81 ± 0.16

TABLE 4.6 – Trace metal concentrations (mean $\pm$ SD in $\mu\text{g g}^{-1}$ dw) in prey (*C. crangon*) used during this study

Trace element	Concentration
Ag	0.99 ± 0.13
As	15.7 ± 3.7
Cd	0.25 ± 0.08
Co	0.21 ± 0.04
Cr	0.23 ± 0.18
Cu	25.7 ± 5.6
Fe	60.3 ± 50.9
Mn	6.18 ± 3.49
Ni	1.56 ± 0.60
Pb	0.17 ± 0.10
Se	2.33 ± 0.73
V	< 0.39
Zn	43.2 ± 4.05

4.3.2.1 Elemental concentration perturbations

The variation of Zn concentrations following the exposure to the waterborne metal is presented in figure 4.3. Whereas Zn concentrations remained constant in control, Zn concen-

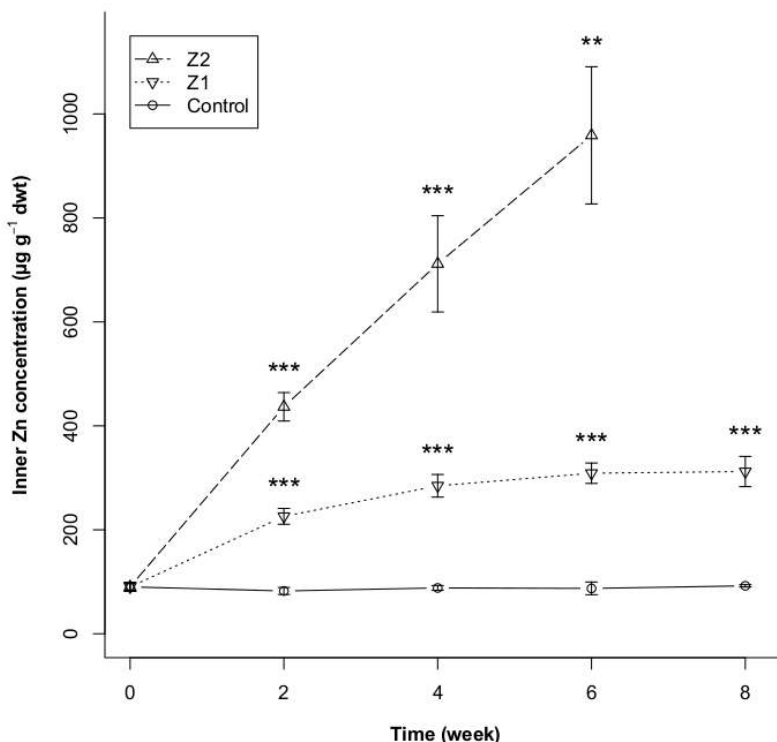


FIGURE 4.3 – Total inner Zn concentrations (mean $\pm$ SD; $\mu\text{g g}^{-1}$ dw) in juvenile cuttlefish reared in control and in 2 Zn concentrations (Z1, Z2). Asterisks correspond to significant differences compared to control (* <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001).

trations increased in both conditions with stabilization occurring in Z1 after 4-week exposure at $302 \pm 27 \mu\text{g g}^{-1}$ dw, and a constant increase in Z2 reaching $959 \pm 132 \mu\text{g g}^{-1}$ dw after 6-week exposure.

Apart from Zn, the only element showing a variation in total concentration was Mn (Fig. 4.4). Thus, a dose-dependant decrease of Mn concentration occurred after 2- and 6-week exposure in Z2 and Z1 conditions, respectively. ANCOVA analysis highlighted a similar evolution (i.e. slope) in the 3 conditions studied but at different concentration levels (i.e. y-intercept) for both Zn-exposures (p -values < 0.01 and 0.001 for Z1 and Z2, respectively).

4.3.2.2 Variation of subcellular distribution

The exposure to waterborne Zn induced a global increase of the proportion of soluble Ag, Cd, Cu and Zn (Fig. 4.5). In Z2, all these elements presented a significant soluble percentage increase regardless of the exposure time of around 2.2-, 2.0-, 1.2- and 1.4-fold the control level for Ag, Cd, Cu and Zn, respectively. Notably, their evolution remained similar to those of

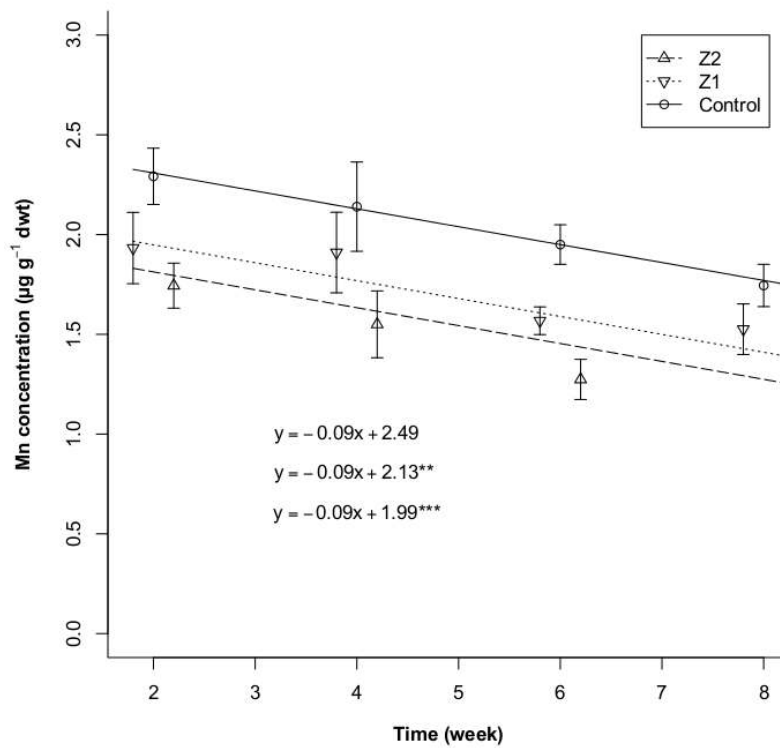


FIGURE 4.4 – Total inner Mn concentrations (mean $\pm$ SD; $\mu\text{g g}^{-1}$ dw) in juvenile cuttlefish reared in control and in two Zn concentrations (Z1, Z2). Asterisks correspond to significant differences between y-intercept compared to control ($^{**} < 0.01$, $^{***} < 0.001$).

the control, and only soluble proportions appeared modified. In Z1, similar increase (towards control condition) of the soluble proportions were measured after 2-week exposure for Ag, Cd and Zn, for all elements after 4-week exposure, whereas the soluble proportion of each of these elements was similar to those of the control after 6-week exposure. During the 2 last weeks exposure, whereas Cd, Cu and Zn soluble proportion increased again, Ag remained similar to the level in the control.

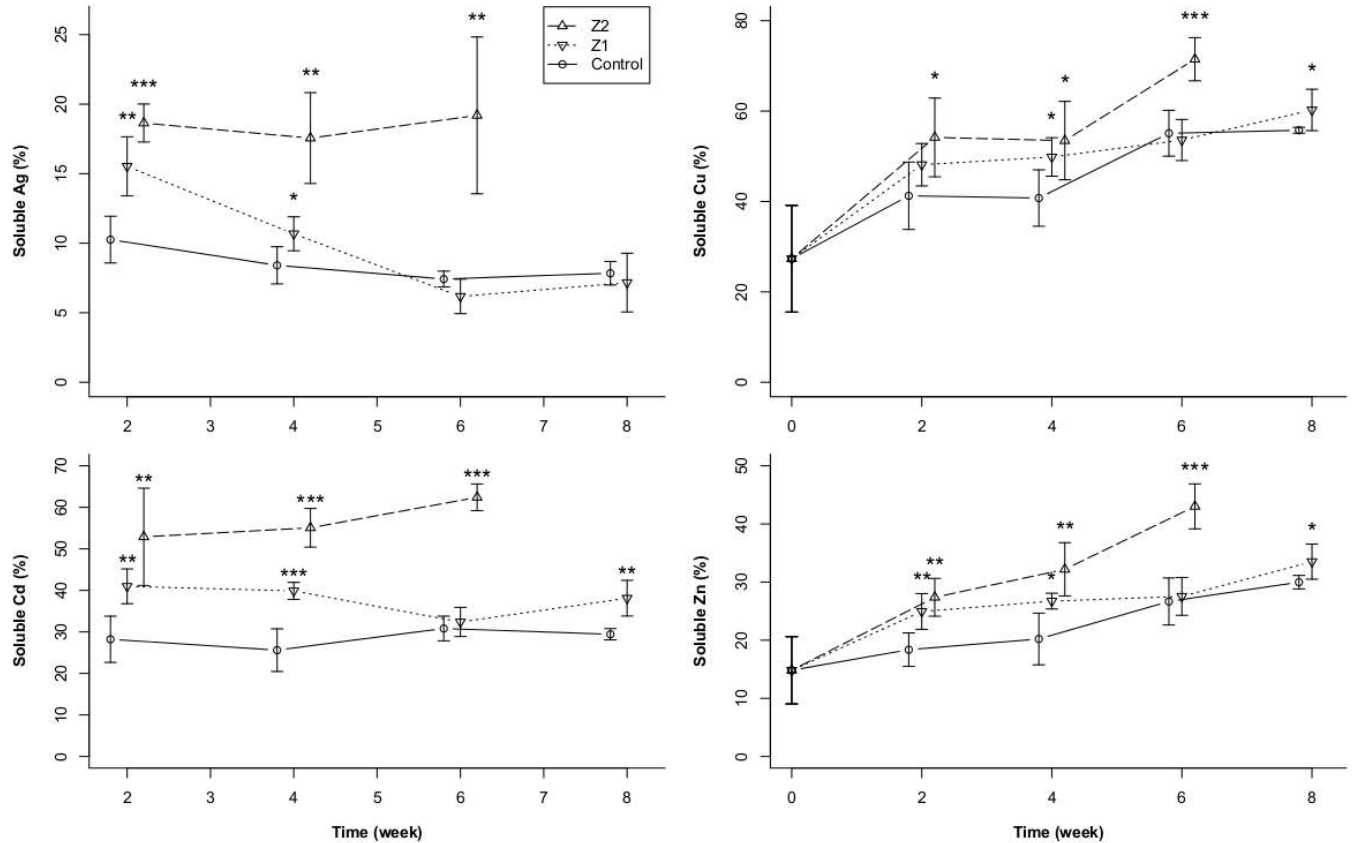


FIGURE 4.5 – Soluble Ag, Cd, Cu and Zn proportions (mean $\pm$ SD ; %) in juvenile cuttlefish reared in control and in 2 Zn concentrations (Z1, Z2). Asterisks correspond to significant differences at each time compared to control (* <0.05 , ** <0.01 , *** <0.001).

4.3.2.3 MT perturbations

According to the linear evolution of MT concentration observed in control and to the lack of differences between Z1 and the control conditions after 8-week exposure (data not shown), the global evolution of this parameter was assayed during the first 6-week period. ANCOVA analysis highlighted no significant difference at Z1 (p -value = 0.17) on MT concentrations, and significant negative effect at Z2 (p -value = 0.009) (Fig. 4.6).

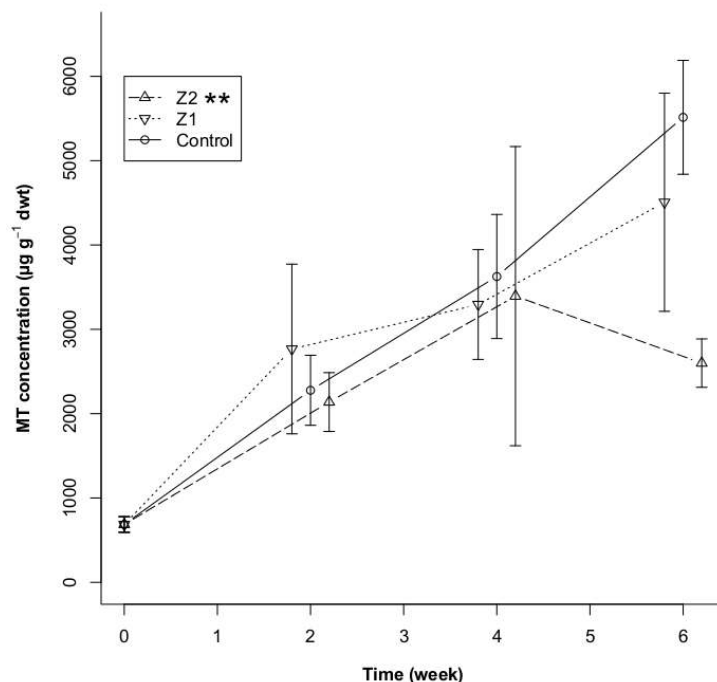


FIGURE 4.6 – Evolution of metallothionein concentrations (mean $\pm$ SD ; $\mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$) in juvenile cuttlefish reared in control and in 2 Zn concentrations (Z1, Z2) during 6 week post-hatching. Asterisks correspond to significant differences of metallothionein evolution compared to control (i.e. different slopes ; $** < 0.01$).

4.3.2.4 Oxydative stress in digestive gland and gills

Because of the small size of organs and the lack of digestive gland differentiation (in draft form during the first month post-hatching), first samplings were realized after 1 month exposure in order to allow individual analysis.

In gills, no effect of Zn exposure on GST, SOD and catalase activities or LPO level were detected, regardless of the exposure time (data not shown). In contrast, some important modifications of these parameters were measured in the digestive gland. Indeed, a significant increase in GST activity was observed in this organ after 4-week exposure to Z2 (Fig. 4.7) and in Z1 (ANCOVA p -value = 0.026). Notably, GST activity also increased in the digestive glands of control individuals during the sampling period. SOD activities increased at each sampling date in Z1 alone (Fig. 4.7), whereas catalase activities significantly decreased after 4-week exposure in Z2, and 6- and 8-week exposure in Z1 (Fig. 4.7). Finally, LPO presented higher levels after 6- and 8-week exposure in Z1 (Fig. 4.8). Notably, LPO level in the digestive gland of the control decreased between 4- and 6-week post-hatching.

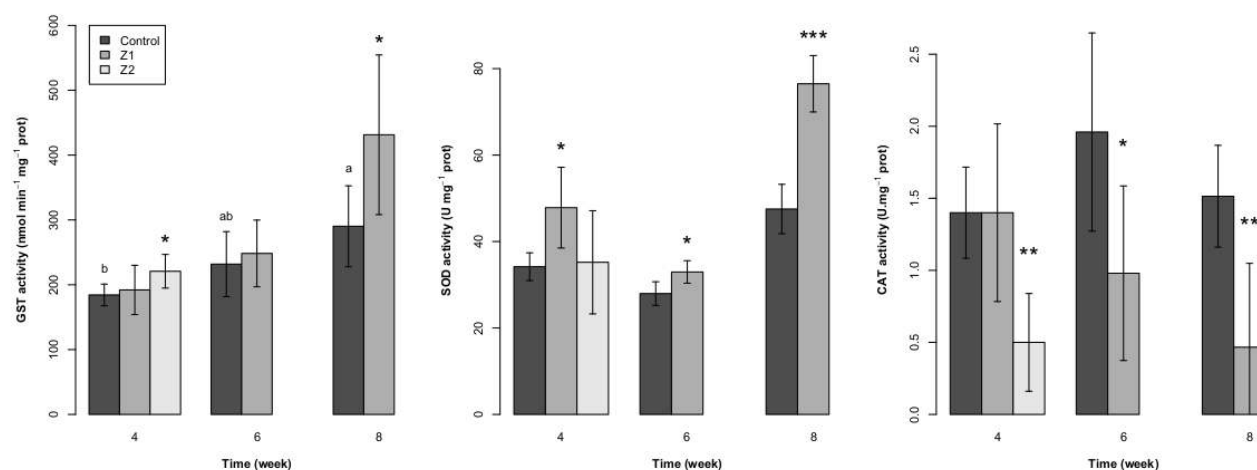


FIGURE 4.7 – Glutathione S-transferase, superoxide dismutase and catalase activities (mean $\pm$ SD; respectively in $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$, $\text{U mg}^{-1} \text{prot}$, and $\text{U mg}^{-1} \text{prot}$) in the digestive gland of juvenile cuttlefish in control, Z1 and Z2 conditions after 4-week post-hatching and in control and Z1 conditions after 6- and 8-week post-hatching. Letter above control indicates its evolution, and asterisks above Z1 or Z2 correspond to significant differences of activity compared to control (* <0.05 , ** <0.01).

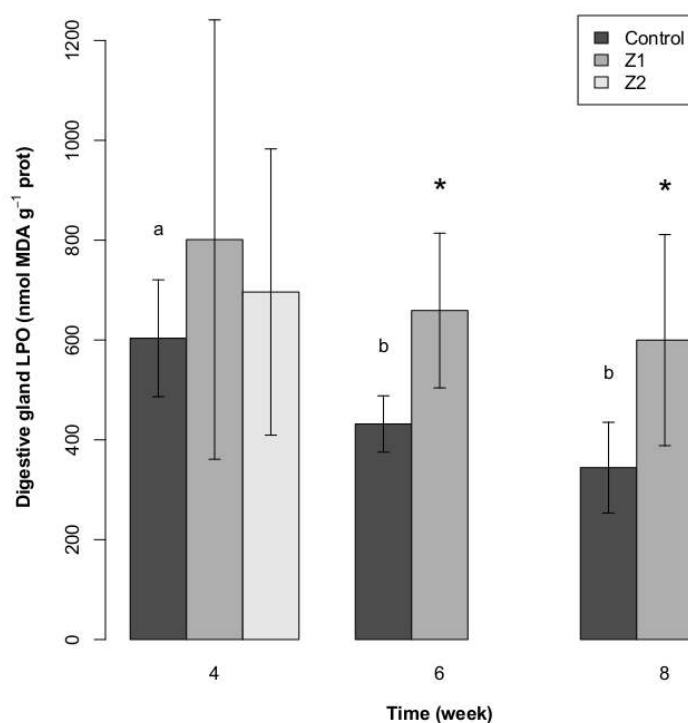


FIGURE 4.8 – Lipid peroxidation (mean $\pm$ SD; $\text{nmol MDA g}^{-1} \text{prot}$) in the digestive gland of juvenile cuttlefish in control, Z1 and Z2 conditions after 4-week post-hatching and in control and Z1 conditions after 6- and 8-week post-hatching. Letter above control indicates its evolution, and asterisks above Z1 correspond to significant differences of activity compared to control (* <0.05).

4.4 Discussion

According to French national monitoring of inshore seawater, the values of dissolved metal concentrations in natural seawater used during this experiment were similar or lower than national median concentration except for Ag, which a concentration 4 times higher than national median (ranged 2-4 ng L⁻¹; Boust *et al.*, 2004; Ifremer, 2011; Etourneau *et al.*, 2013; Chiffolleau *et al.*, 2001; Lachambre et Fisson, 2007a). In order to minimize particle contamination and dissolved metal concentration, seawater was decanted before to be charcoal-filtered.

4.4.1 Metal homeostasis in juvenile cuttlefish

Elements present in hatchlings at total concentrations higher than previously reported in cephalopods were As, Cr, Fe, Mn and Ni (Bustamante *et al.*, 2008; Kojadinovic *et al.*, 2011; Napoleão *et al.*, 2005; Raimundo *et al.*, 2010b, 2014; Miramand et Bentley, 1992; Ichihashi *et al.*, 2001a,b; Horowitz et Presley, 1977). Among them, As, Fe and to a lesser extent, Cr, displayed the highest concentrations followed by an important decrease during the first 6-weeks post-hatching (Table 4.1). According to the very important mean content of As and Fe in hatchlings – 176.3 and 103.4 $\mu\text{g g}^{-1}$ dw, respectively, and to their low dissolved concentrations in our rearing seawater – around 1 and 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively (Boust *et al.*, 2004; Lachambre et Fisson, 2007b), it is very likely that maternal transfer is the main source for both elements. Arsenic and Fe accumulation was previously reported in cephalopod genital tissues : the oviduct gland of the giant squid *Architeuthis dux* is the tissue containing the highest As concentration (Bustamante *et al.*, 2008), and high Fe concentrations were found in the genital tract of female cuttlefish from the English channel ($173 \pm 14 \mu\text{g g}^{-1}$ dw) as well as in eggshells from the same location ($398 \pm 64 \mu\text{g g}^{-1}$ dw; Miramand et Bentley, 1992; Miramand *et al.*, 2006). In contrast, low Fe concentration was previously reported in *S. officinalis* hatchlings from the Mediterranean sea, suggesting an important environmental influence on this process (Villanueva et Bustamante, 2006). Maternal transfer is also likely to be the main source of Cr found in hatchlings. Indeed, higher Cr concentration were found in juveniles of the squid *Stenoteuthis oualaniensis* than in adults (Ichihashi *et al.*, 2001a), and higher Cr concentrations were reported in ovary and genital tract of *A. dux* and *S. officinalis* than in other tissues (Miramand et Bentley, 1992; Bustamante *et al.*, 2008). The important

decrease in total concentration of As, Fe and Cr during the 6 first weeks post-hatching suggested excretion of these compounds at this period (Table 4.1).

In spite of their low total concentrations in hatchlings, Mn and Ni values (2.67 and 1.71 $\mu\text{g g}^{-1}$ dw, respectively) were higher than previously reported in whole adult *S. officinalis* (Miramand et Bentley, 1992). Because of these low numerical values and the previously documented ability of Mn to accumulate in cuttlefish embryos through the eggshell (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2010b), but not through maternal transfer (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2008a), high Mn and Ni likely accumulated from seawater during egg development. Consistently, the dissolved concentrations of Mn and Ni in our rearing seawater was in the upper range of national median range (i.e. around 7 and 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Mn and Ni, respectively ; Chiffoleau *et al.*, 2001; Boust *et al.*, 2004). The slow and constant total concentration decreases observed during the first 6 weeks post-hatching was very likely the result of dilution by growth (Rainbow et White, 1989) (Table 4.1).

Elements that strongly accumulated in our study were the non-essential elements Ag and Cd, with around 10- and 4-fold increase, respectively, during the first month post-hatching. Interestingly, their concentrations stabilized in subsequent time-points (Table 4.1), correlating with the time of digestive gland maturation (Yim et Boucaud-Camou, 1980). Previous studies showed that the mature cuttlefish digestive gland contains more than 70 % of the total body content in both elements (Miramand et Bentley, 1992; Miramand et Guary, 1980; Bustamante *et al.*, 1998b, 2002b; Miramand *et al.*, 2006). Once in this tissue, Ag is quickly excreted whereas Cd is stored in a less toxic form. The major difference in accumulation processes of these elements between juvenile with non-mature digestive gland and adult is the higher assimilation efficiency by juveniles of contaminants contained in food, as juvenile digestion is mostly intracellular (Bustamante *et al.*, 2002b, 2004; Yim et Boucaud-Camou, 1980).

The only element with a decrease in its soluble fraction during our study was the non-essential trace metal Ag. This decrease occurred during the first 6 weeks post-hatching, underlying the set-up of an efficient detoxification pathway of Ag and correlating with the digestive gland maturation which is involved in Ag insolubilisation (Bustamante *et al.*, 2006a; Martoja et Marcaillou, 1993) (Table 4.2).

Other elements with a modification of their subcellular fractionation were the essential trace metals Co, Cr, Cu, Fe, Se and Zn, with an increase in their soluble proportion (Table

4.2). All increases occurred during the first 4- or 6-weeks post-hatching and were consistent with important growth of cuttlefish and essential roles of these elements, such as hemocyanin synthesis for Cu, vitamin B₁₂ production for Co and glutathion peroxidase activity for Se.

The determination of positive correlations between soluble and insoluble concentrations revealed two distinct groups. The first group comprises Ag, Cd, Co, Cu and Zn, all of which are known to highly accumulate in the cephalopod digestive gland and to have affinity for sulfur-containing proteins such as MTs (Vašák, 1991; Amiard *et al.*, 2006). In contrast, the second group is composed of trace metals that do not accumulate in the digestive gland : As, Cr, Mn and Ni are homogeneously allocated in cephalopod tissues and Fe accumulates in other organs (Tables 4.3 and 4.4).

The only elements with soluble fraction positively correlated with MT concentrations in our study were Cu and Zn, consistent with the major role of MTs in homeostasis of both elements (e.g. Cosson, 1991; Amiard *et al.*, 2006; Roesijadi, 1992). These correlations are also consistent with the potential role of MTs in the detoxification process of non-essential metals such as Ag and Cd (Table 4.3)

4.4.2 Zn exposures

The Zn accumulation observed during our experiment highlighted the decreasing ability of juvenile cuttlefish to regulate the Zn-uptake when exposed to dissolved concentrations equal or above $52 \pm 3 \mu\text{g L}^{-1}$ (Z1) (Fig. 4.3). Notably, this threshold appeared low considering Zn accumulation in other marine organisms such as the crustaceans *Palaemon elegans* and *Carcinus maenas* (Rainbow, 1985; White et Rainbow, 1982) and the bivalve mollusks *Perna viridis* (Chan, 1988) which regulated Zn uptake at concentrations above $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Nevertheless, metal uptake appears strongly species specific (e.g. Wang et Rainbow, 2005; Rainbow, 2002). The stabilization of Zn concentration occurring in Z1 animals after 4-week exposure (around $302.1 \pm 26.7 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$) likely resulted from an equilibrium state between water and inner concentrations reached in animals rather than from a regulatory process (Fig. 4.3). Indeed, in Z2 conditions, Zn accumulation was observed at all time-points, whereas regulatory processes in other aquatic organisms lead to maintenance of inner concentrations close to control levels (Chan, 1988; White et Rainbow, 1982; Rainbow, 1985).

Apart from this Zn accumulation, a Zn dose-dependent depletion of total Mn in animals

was observed during Zn exposures without fractionation or evolution changes (Fig. 4.4). Such induction on the Mn element due to metal exposure was not previously reported. According to the similar chemical properties of Mn^{2+} and Zn^{2+} ions, Mn substitution by Zn appears likely : these elements are both used in enzymes as Lewis acids (McCall *et al.*, 2000; Bock *et al.*, 1999) and their divalent ions have almost the same radius (0.75 Å for Mn^{2+} and 0.74 Å for Zn^{2+} ; Bock *et al.*, 1999). In addition, Mn and Zn are borderline metals without binding preferences for oxygen, nitrogen and sulfur ligands, and as such are found in the two main types of metal rich granules in mollusks : those rich in phosphate salts, and those rich in sulfur salts (Marigómez *et al.*, 2002; Nieboer et Richardson, 1980; Pan et Wang, 2012; Chvapil, 1973). Our study suggests Zn binding to Mn ligands at high dissolved Zn concentrations (Z1 and above). Because such Mn^{2+} replacement is most often observed with Mg^{2+} , Mg homeostasis could be an important parameter to survey under Zn perturbation (Bock *et al.*, 1999).

The increase in soluble Ag-, Cd- and Cu fractions observed in Zn-exposed juveniles (Fig. 4.5) differed from those found in similar studies on bivalves which reported some modifications in metal assimilation due to new ligand synthesis (e.g. MTs, GSH), thus allowing higher metal uptake (e.g. Liu et Wang, 2014, 2013; Shi et Wang, 2004b; Fraysse *et al.*, 2002; Popham et D'Auria, 1982). In our study, no assimilation modifications were observed, except for Zn, in spite of modified subcellular distributions, thus suggesting the absence of Zn-induced synthesis of new ligand (Mouneyrac *et al.*, 2002). We suggest that insoluble ligands of Ag, Cd, and Cu become occupied by strongly assimilated Zn, resulting in the observed increase of their respective soluble fractions. Such increases would have to be regulated by soluble ligands such as MTs, GSH and/or high molecular weight proteins (HMWP) to avoid the production of ROS and their associated damages. According to the positive correlation found between MTs and Zn in control juveniles, the different biological half-life of MT depending of their cation linkage and the previously reported shorter half-life of Zn-thioneins, we also suggest that the lack of MTs increase in Z1 and their decrease in Z2 (Fig. 4.6) may result from their intensive use by Zn resulting on progressive depletion of the MTs cuttlefish stock (Cosson, 1991; Amiard *et al.*, 2006). Alternatively, this decrease may result from important MT degradation after metal transport into lysosomes for metal rich granule formation (Mouneyrac *et al.*, 2002; Liu et Wang, 2013). The management of Ag, Cd, Cu and Zn could also be assured by other cytosolic molecules such as the small tripeptide glutathion (GSH) which is one of the most

abundant sulfur ligands found in most cells (Dickinson et Forman, 2002), and/or HMWP (Serafim et Bebianno, 2010). Consistent with this hypothesis, a study describing subcellular fractions of metals in the cuttlefish digestive gland highlighted that a part of cytosolic Cd, Cu and Zn were linked with compounds of size range similar to GSH and HMWP, whereas cytosolic Ag was detected only associated with compounds of HMWP size range (Bustamante *et al.*, 2006a).

Oxidative stress bioassays indicated a lack of gill sensitivity to Zn exposure, suggesting the absence of Zn accumulation in cephalopod gills, unlike previously reported in bivalves (Company *et al.*, 2008, 2010; Funes *et al.*, 2006). In contrast, all biomarkers were affected by Zn exposure in the digestive gland, highlighting increased oxidative stress and reduced regulation of ROS resulting from Zn accumulation. First, the increase in GST activity after 1 and 2 month-exposure to Z2 and Z1 (Fig. 4.7), respectively, was consistent with an increase in free metal binding as the GST enzyme conjugates GSH with a great variety of electrophilic compounds such as metal ions to avoid ROS production (Dickinson et Forman, 2002). A possible consequence of this elevated GST activity is the depletion in free GSH, further increasing free metal concentrations (Dickinson et Forman, 2002). Second, the SOD activity increase measured after 4-, 6- and 8-week exposure to Z1 highlighted an increased ROS production under the superoxide anion form ($O_2^{\bullet-}$), consistent with a saturation of the metal-ligation system. SOD activity reduces $O_2^{\bullet-}$ – the first synthesized oxygen free-radicals, into H_2O_2 (Janknegt *et al.*, 2007; Halliwell et Gutteridge, 1984), which is then decomposed into H_2O and O_2 by CAT (Wang *et al.*, 2013a). The CAT activity decrease observed after 6- and 8-week exposure in Z1 contrasts with the increased SOD activity and suggests an imbalance in ROS management. This decreased CAT activity may result from previously described inhibitory effects of Zn, Cd and/or Cu on this enzyme (Chandran *et al.*, 2005; Geret *et al.*, 2002; Company *et al.*, 2004). The increase in LPO in Z1 after 6-week exposure confirmed such imbalance occurring simultaneously to CAT decrease (Fig. 4.8). Nevertheless, no effect was observed before this period, whereas increases in Ag-, Cd- and Zn cytosolic concentrations were detected starting at 2 weeks of Zn exposure, or 4 weeks in the case of Cu, suggesting a progressive decrease in the regulation of ROS production.

Our results highlighted the great sensitivity of juvenile cuttlefish to dissolved Zn exposure. For the first time in a cephalopod, modifications of metal homeostasis by a single metal

exposure is highlighted. According to these perturbations, our results suggest a low plasticity of this stage of life to regulate the effects of medium dissolved Zn exposure such as oxydative stress. The synthesis of new ligands to control accumulation of this element appeared very limited. Moreover, we studied the ability to control the ROS production in several tissues in a juvenile cephalopod. Contrary to those of bivalves, cuttlefish gills presented low sensitivity to Zn contamination compare to digestive gland. In this tissue, damages were recorded after 6-week exposure in $53 \mu\text{g L}^{-1}$ which is a concentration often reached in the marine environment (e.g. Di Salvatore *et al.*, 2013). Further studies on other pollutants will be necessary to characterize the breadth of cuttlefish sensitivity to anthropic contamination and confirm its impact on cuttlefish recruitment, as previously suggested by Gras (2013).

Acknowledgments

This work was supported by the European, Interreg IV-A CHRONEXPO project. This study was partly conducted in the CREC (Centre de Recherche en Environnement Côtier) at Luc-sur-mer (Normandie, France). The authors thank Dr Pierre Le Pabic for advice and help in English.

Chapitre 5

Essais et limites d'une contamination trophique

De par leur régime carnivore et leurs besoins alimentaires importants pour assurer leur métabolisme, les céphalopodes sont des modèles d'intérêt en écotoxicologie dans le cadre d'études portant sur la contamination trophique des invertébrés.

Plusieurs travaux ont d'ailleurs été réalisés sur ce sujet (Koyama *et al.*, 2000; Bustamante *et al.*, 2002b, 2004, 2006c; Lacoue-Labarthe *et al.*, 2009d; Danis *et al.*, 2005). La plupart des études menées ont porté sur l'assimilation des métaux et ont montré l'importance du rôle de la glande digestive dans le stockage et/ou l'excrétion des métaux traces tel que l'Ag, l'Am, le Cd, le Co, le Zn. Dans la plupart de ces études, la voie trophique a été mise en évidence comme principale voie d'accumulation d'un certain nombre d'éléments (Cd, Co, Hg, Zn) dans le milieu naturel (Koyama *et al.*, 2000; Bustamante *et al.*, 2002b, 2004; Lacoue-Labarthe *et al.*, 2009d). Les seuls travaux ayant comparé l'accumulation par cette voie entre un juvénile et un adulte ont rapporté des différences d'accumulation entre ces deux stades pour la plupart des éléments étudiés (Bustamante *et al.*, 2002b, 2004, 2006c). Les auteurs ont expliqué ces différences par l'immaturité de la glande digestive des juvéniles : digestion majoritairement intracellulaire et acide à cette période, ou absence de ligands spécifiques à la détoxification de tel ou tel élément (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2009d; Bustamante *et al.*, 2002b, 2004). Les proies utilisées au cours de la plupart des phases d'exposition trophique de ces études sont des crustacés adultes du genre *Artemia*, en raison de leur facilité d'obtention dans le commerce. Cependant, ce type de proie vivante ne présente pas un profil nutritionnel adapté aux juvéniles

de céphalopodes (von Boletzky et Hanlon, 1983; Domingues *et al.*, 2001b). Ceci contraint donc l'expérimentateur à réaliser des expositions relativement courtes afin d'éviter la dégradation de l'état des sujets d'étude. Dans le but d'étudier les effets d'une contamination trophique au Zn du juvénile de seiche sur le long terme, il est apparu indispensable de disposer d'un type de proie adapté à ce stade de vie.

5.1 Choix de la proie

De nombreuses espèces ont été utilisées en tant que proies pour l'élevage de juvéniles de seiche, telles que : le caprellidae *Caprella equilibra*, les amphipodes du genre *Elasmopus* (Baeza-Rojano *et al.*, 2010) et *Gammarus* (Koueta et Boucaud-Camou, 1999), ainsi que les espèces *Erichthonius brasiliensis* et *Jassa marmorata* (Baeza-Rojano *et al.*, 2010), les mysis *Mesopodopsis slabberi* (Koueta *et al.*, 2000; Sykes *et al.*, 2010; Baeza-Rojano *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2009; Koueta et Boucaud-Camou, 2001; Koueta *et al.*, 2002), *Americamysis almyra* (Forsythe *et al.*, 1994), *Neomysis integer* (Clarke *et al.*, 1989; Grigoriou et Richardson, 2004) et *Schistomysis* spp. (Koueta *et al.*, 2000; Koueta et Boucaud-Camou, 2001; Koueta *et al.*, 2002), *Paramysis novelli* (Correia *et al.*, 2008a,b; Domingues *et al.*, 2001b,a, 2002, 2004), les crevettes *Palaemonetes pugio* (Forsythe *et al.*, 1994), *Palaemonetes varians* (Domingues *et al.*, 2001a, 2002, 2003, 2004, 2009; Correia *et al.*, 2005, 2008b; Sykes *et al.*, 2003, 2006a, 2009, 2012) et *Crangon crangon* (Koueta et Boucaud-Camou, 2001; Koueta *et al.*, 2002, 2000; Domingues *et al.*, 2003; Grigoriou et Richardson, 2004, 2008, 2009), le crabe *Carcinus maenas* (Correia *et al.*, 2005; Domingues *et al.*, 2001a), *Artemia* spp. (Sykes *et al.*, 2010; Domingues *et al.*, 2001b, et les nombreuses références listées par von Boletzky et Hanlon, 1983) ainsi que différentes espèces de petits poissons (Forsythe *et al.*, 1994; Domingues *et al.*, 2004; Correia *et al.*, 2005). Parmi ces animaux, seules les crevettes et les mysis ont été utilisées comme aliment unique pendant des durées supérieures à 1 mois sans qu'aucune carence ne soit détectée. De plus, ce sont les proies qui ont conféré aux juvéniles les meilleures performances de croissance. Cependant, ces proies étaient la plupart du temps issues de prélèvements dans le milieu naturel, ce qui présente deux principaux inconvénients :

- l'approvisionnement est variable en fonction de la saison et de l'année de prélèvement ;

- les teneurs et la nature des contaminants présents dans les animaux prélevés peuvent varier de manière importante.

On comprend alors l'intérêt de disposer d'un élevage permettant d'obtenir, toute l'année, des animaux dont on contrôle l'historique de vie et la teneur en contaminants.

Parmi les décapodes précédemment cités, les différentes espèces du genre *Palaemonetes* ainsi que l'espèce *Crangon crangon* présentent des cycles de vie complexes (écologie différente selon les stades de vie), impliquant des contraintes en termes de maintenance technique et biologique. En revanche, certaines espèces de mysis du genre *Americamysis* sont élevées depuis le début des années 1980 pour réaliser des tests de toxicité chronique en milieu marin et estuarien (Breteler *et al.*, 1982; Laughlin et Linden, 1983; Nimmo et Hamaker, 1982), car elles présentent des caractéristiques appropriées à l'élevage, c'est-à-dire :

- un cycle de vie relativement court dont la durée peut être modulée ;
- un dimorphisme sexuel marqué à l'âge adulte ;
- la possibilité d'utiliser un seul type d'aliment tout au long du cycle de vie.

Nous avons donc choisi ce second groupe de crustacés en tant que proies vivantes pour le développement d'expériences de contaminations trophiques adaptées à la première période de vie de la seiche *S. officinalis* (Fig. 5.1).

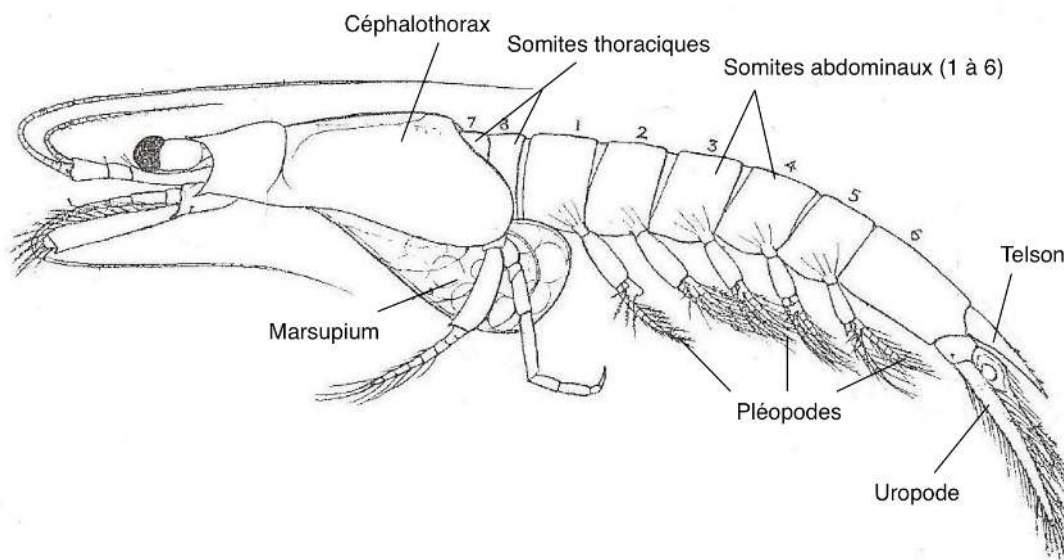


FIGURE 5.1 – Caractéristiques anatomiques d'une femelle Mysidacé en vue latérale, modifié d'après Tattersall et Tattersall (1951).

Les espèces du genre *Americamysis* sont originaires des côtes ouest et sud-ouest des Etats-Unis, et leur élevage n'est pas assez développé en Europe pour bénéficier d'un approvi-

sionnement suffisant. Nous avons donc cherché une espèce locale aux caractéristiques proches de celles d'*Americamysis* spp.. En raison de la présence fortement variable d'une année à l'autre et de la faible description des espèces marines, nous avons orienté nos recherches vers une espèce euryhaline retrouvée en milieu marin, mais particulièrement abondante dans les estuaires des côtes Atlantiques Européennes au printemps et en été : l'espèce *Neomysis integer* (Tattersall et Tattersall, 1951). Après plusieurs périodes de prospection, d'importantes densités de ces animaux ont été trouvées dans d'anciens bassins ostréicoles proches de la station marine de Luc-sur-Mer, et ont permis un réapprovisionnement ponctuel en période estivale au cours de cette étude.

5.2 Description de l'espèce choisie

Neomysis integer (Leach), 1814 est un petit crustacé, pouvant mesurer jusqu'à 17 mm de long, à l'aspect de petite crevette translucide. Comme tous les Mysidacés, les femelles possèdent une poche incubatrice sur la face ventrale du céphalothorax, appelée marsupium, dans laquelle a lieu l'intégralité du développement larvaire (Fig. 5.1). A l'issue de ce développement, des juvéniles d'une taille d'environ 2 mm sont expulsés dans le milieu. Le marsupium permet de distinguer aisément les femelles des mâles qui sont en général plus petits et présentent un allongement important de leur quatrième paire de pléopodes servant à l'accouplement (Fig. 5.2). Cette espèce est la seule du genre vivant en Europe. Elle est euryhaline (0,1 à 38 psu), eurytherme (0 à 33°C) (Tattersall et Tattersall, 1951) et son régime alimentaire est qualifié d'omnivore car composé de détritiques organiques, de phytoplancton et de zooplancton (Fockedey et Mees, 1999; Vilas *et al.*, 2008). Bien que d'un point de vue qualitatif la consommation de composés d'origine végétale semble avoir une importance nutritionnelle non négligeable, les élevages expérimentaux de *N. integer* utilisent couramment des nauplii d'*Artemia* spp. fraîchement éclos comme unique alimentation sans rencontrer de problèmes (Wildgust et Jones, 1998; Verslycke *et al.*, 2003; Fockedey *et al.*, 2005; Erk *et al.*, 2008a,b; Vilas *et al.*, 2008; Fockedey et Mees, 1999).

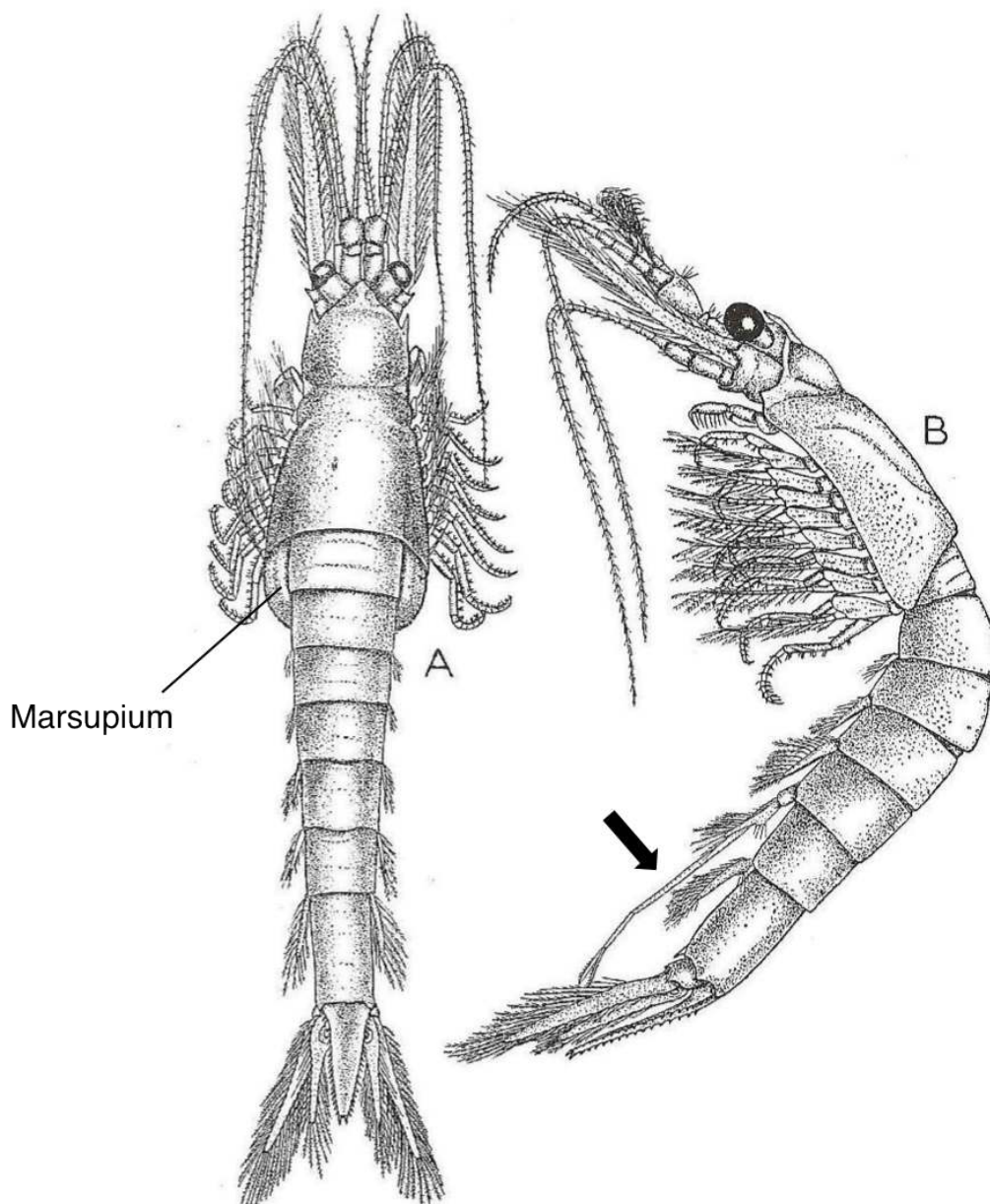


FIGURE 5.2 – Principales caractéristiques anatomiques (A) de la femelle (marsupium) et (B) du mâle (la flèche indique l’allongement du quatrième paire de pléopodes) *N. integer*, modifié d’après Tattersall et Tattersall (1951).

5.3 Description du système d'élevage

Dans le but d'évaluer la faisabilité et les contraintes de l'élevage de *N. integer*, mais également d'étudier son potentiel en tant que proie dans le cadre d'une contamination trophique, nous avons développé un système d'élevage inspiré, d'une part, du système décrit dans la méthode 1007.0 de l'US Environmental Protection Agency (EPA) pour la réalisation de tests de toxicité sur *A. bahia* (rapporté en Annexe) et, d'autre part, des systèmes expérimentaux mis en place pour l'élevage de mysis au Cefas de Weymouth et à la Marine Biological Association (MBA) de Plymouth au Royaume-Uni.

5.3.1 Structure d'élevage

Afin de contrôler les paramètres température et salinité influençant fortement le cycle de vie de *N. integer* (Fockedey *et al.*, 2005), nous avons choisi de réaliser une structure d'élevage en circuit fermé. Contrairement aux circuits ouverts, ce type de système permet également de maintenir constants les paramètres physico-chimiques indispensables au suivi d'un élevage, mais requiert un système de filtration important. La structure expérimentale d'élevage représentée figure 5.3 a été mise en place.

Cette structure est composée de deux aquariums d'une trentaine de litres dans lesquels les mysis ont été maintenues et reproduites à des densités inférieures à 20 indiv L⁻¹ (Fockedey *et al.*, 2005). Afin de diminuer autant que possible l'accumulation de composés azotés toxiques (ammonium, nitrites) liée à la maintenance d'un grand nombre d'individus et de maintenir un pH élevé (> 7,8), un filtre à sable de corail de 10 cm d'épaisseur a été mis en place dans une troisième cuve, dédiée à la collecte des juvéniles ainsi qu'à la filtration. Un filtre extérieur (EHEIM Professionnel 3 350 (2073)) a également assuré cette fonction ainsi que celle de pompe à eau (1050 L h⁻¹), renvoyant l'eau filtrée dans les cuves contenant les mysis. Pour éviter la prédation des nouveau-nés par les mysis adultes et permettre leur dénombrement, un système de collecteur a été mis en place dans la troisième cuve. Cette collecte a été assurée par un système d'aspiration automatique de l'eau des cuves contenant les mysis, induit par la différence de hauteur entre ces aquariums et la cuve de filtration (Fig. 5.3). Les tuyaux d'aspiration étaient munis à leur extrémité d'un filet à mailles de 3 mm permettant l'aspiration sélective des juvéniles libérés du marsupium maternel pendant la nuit (Fockedey,

Paramètres de l'eau (valeurs

moyennes mesurées au cours
de la période d'élevage) :

$T^{\circ} = 16,3 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$

$[\text{O}_2] = 9,5 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$

$\text{pH} = 8,0 \pm 0,1$

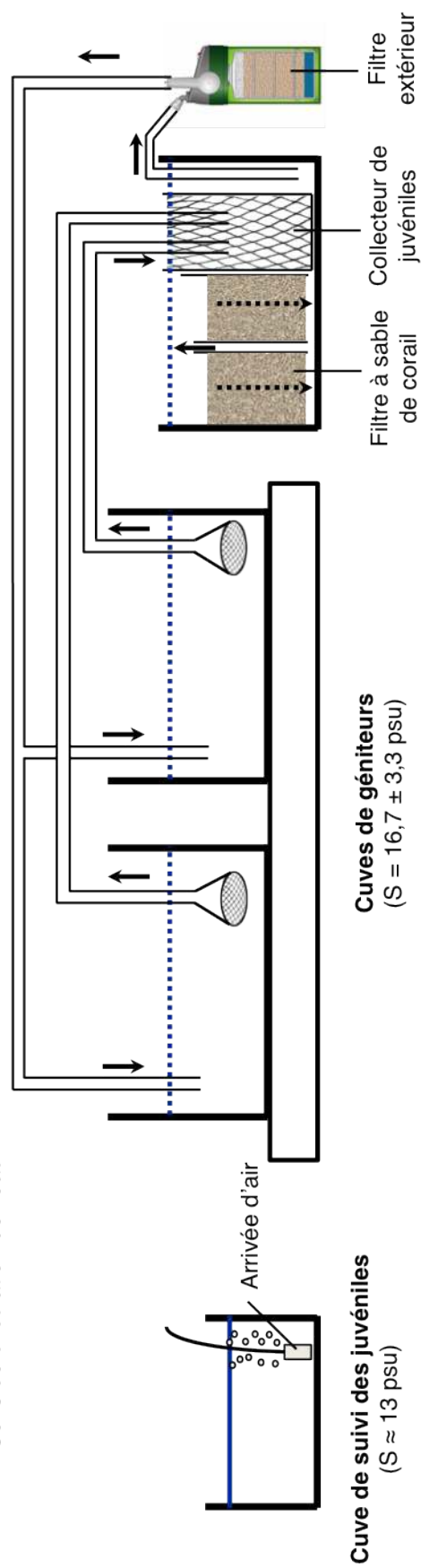
$[\text{NO}_2] < 0,05 \text{ mg L}^{-1}$

$[\text{NO}_3] < 3 \text{ mg L}^{-1}$



..... Niveau de l'eau du système à l'arrêt

→ Sens de circulation de l'eau



Cuve de collecte et de filtration

Cuves de géniteurs
($S = 16,7 \pm 3,3 \text{ psu}$)

Cuve de suivi des juvéniles
($S \approx 13 \text{ psu}$)

FIGURE 5.3 – Structure expérimentale d'élevage de *N. integer*.

2005). Par la suite, les juvéniles étaient transférés dans une cuve plus petite dédiée à leur suivi.

5.3.2 Conditions d'élevage

Nous nous sommes appuyés sur les travaux de thèse de N. Fockedey pour choisir les valeurs du couple température-salinité (Fockedey, 2005). En effet, elle a mis en évidence l'influence positive de la température (testée entre 8 à 25°C) et l'influence négative de la salinité (testée entre 5 à 30 psu) sur la croissance et la mortalité, ainsi que l'apparition de la maturité sexuelle entre 15 et 25°C et 5 et 15 psu. Afin de maintenir une population sur le long terme, nous avons donc opté pour le couple 15°C et 15 psu, meilleur compromis entre la taille des animaux, la production de juvéniles (Fockedey, 2005), et une mortalité moindre. Outre ces 2 paramètres, l'oxygène dissous, le pH, et les concentrations en nitrite et nitrate ont été régulièrement mesurés (méthodes de dosage présentées en Annexe).

Le principal aliment utilisé au cours de cette étude a été le nauplii d'*Artemia* spp. fraîchement éclos, à raison de 750 nauplii jr⁻¹ adulte⁻¹ et 250 nauplii jr⁻¹ subadulte⁻¹ (Fockedey *et al.*, 2005). Une masse de cystes d'*Artemia* spp. (ZM Brine Shrimp Cysts Premium 260 Grade), adaptée au nombre de mysis à nourrir, était mise à incuber dans de l'eau à environ 15 psu et 28°C, permettant ainsi une éclosion optimale des cystes après 24 h. Les nauplii fraîchement éclos étaient ensuite récoltés sur un tamis à maille de 100 μ m et distribués aux mysis. Afin d'éviter l'aspiration des nauplii par le système de collecte des mysis juvéniles, le filtre extérieur était coupé pendant les 4 h suivant l'apport de nauplii dans le système.

5.3.3 Suivis

Cette structure a permis de maintenir une population de *N. integer* pendant une année. Dans le but d'évaluer la fonctionnalité d'un tel élevage dans ces conditions, la mortalité des adultes a été suivie sur une période de trois mois (Fig. 5.4), ainsi que la production de juvéniles et leur mortalité sur une période de deux mois. Quotidiennement, la mortalité a été déterminée par comptage et la production de juvéniles par comptage du nombre de juvéniles présents dans le collecteur. Les juvéniles ont ensuite été placés dans une cuve indépendante dédiée à leur croissance dont 25 % de l'eau était changée quotidiennement et la salinité maintenue sous 15 psu. C'est dans cette cuve que la mortalité des juvéniles a été évaluée.

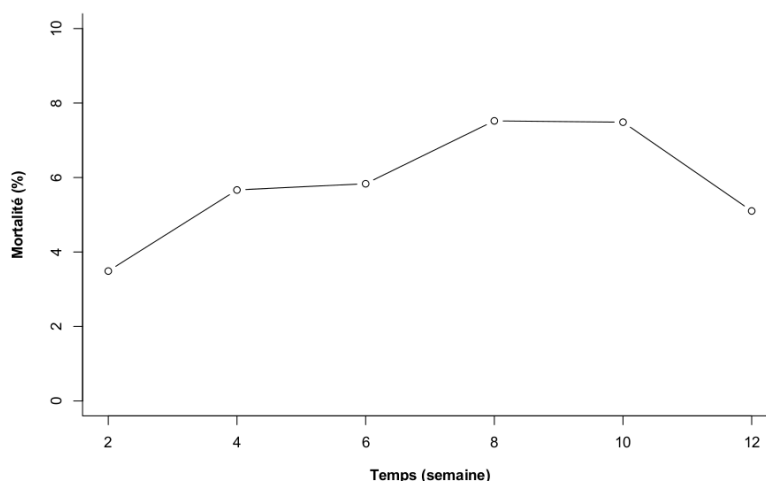


FIGURE 5.4 – Courbe de mortalité (%) d’une population d’environ 300 adultes de *N. integer* suivie sur une période de 3 mois.

Une fois la taille d’environ 10 mm atteinte (taille à laquelle la maturité sexuelle est observée), ces animaux ont été intégrés aux pools de reproducteurs.

La mortalité moyenne mesurée au cours de ce suivi a été de $5,9 \pm 1,5$ %. L’augmentation observée après 8 et 10 semaines de suivi est liée au prélèvement d’individus pour la réalisation des expériences d’accumulation au Zn décrites plus bas. Toutefois, nos taux de mortalité semblent avant tout indiquer que nos conditions de culture étaient adaptées à la maintenance de cette espèce.

Concernant la mortalité des juvéniles, mesurée au cours d’un suivi de deux mois, le taux moyen était de $10,6 \pm 7,7$ %. Cet écart par rapport au stade adulte est cohérent avec celui rapporté par Domingues *et al.* (2000) et est lié à la plus grande fragilité de ce stade de vie. Au cours de la même période, la production de juvéniles a été de $3,0 \pm 1,7$ juv jour⁻¹. Cette valeur est très faible comparée à celles issues des études précédemment citées qui rapportent toutes une production en juvénile au moins supérieure à 50 mysis par jour (Domingues *et al.*, 1998, 1999, 2000, 2001c). Cela peut à nouveau être expliqué par les différences de durée des cycles de vie des animaux étudiés, ainsi que par les importantes populations de géniteurs utilisées dans ces expériences (≥ 1000 la plupart du temps). Nous avons estimé que les juvéniles mettaient entre 75 et 90 jours pour devenir sexuellement mûres, ce qui est cohérent avec la littérature (Fockedey *et al.*, 2005). Le temps nécessaire pour atteindre la maturité sexuelle ainsi que le faible nombre d’individus utilisés dans cet élevage ont généré un taux de production trop faible pour pouvoir utiliser ces animaux en tant que proie, dans nos conditions d’élevage.

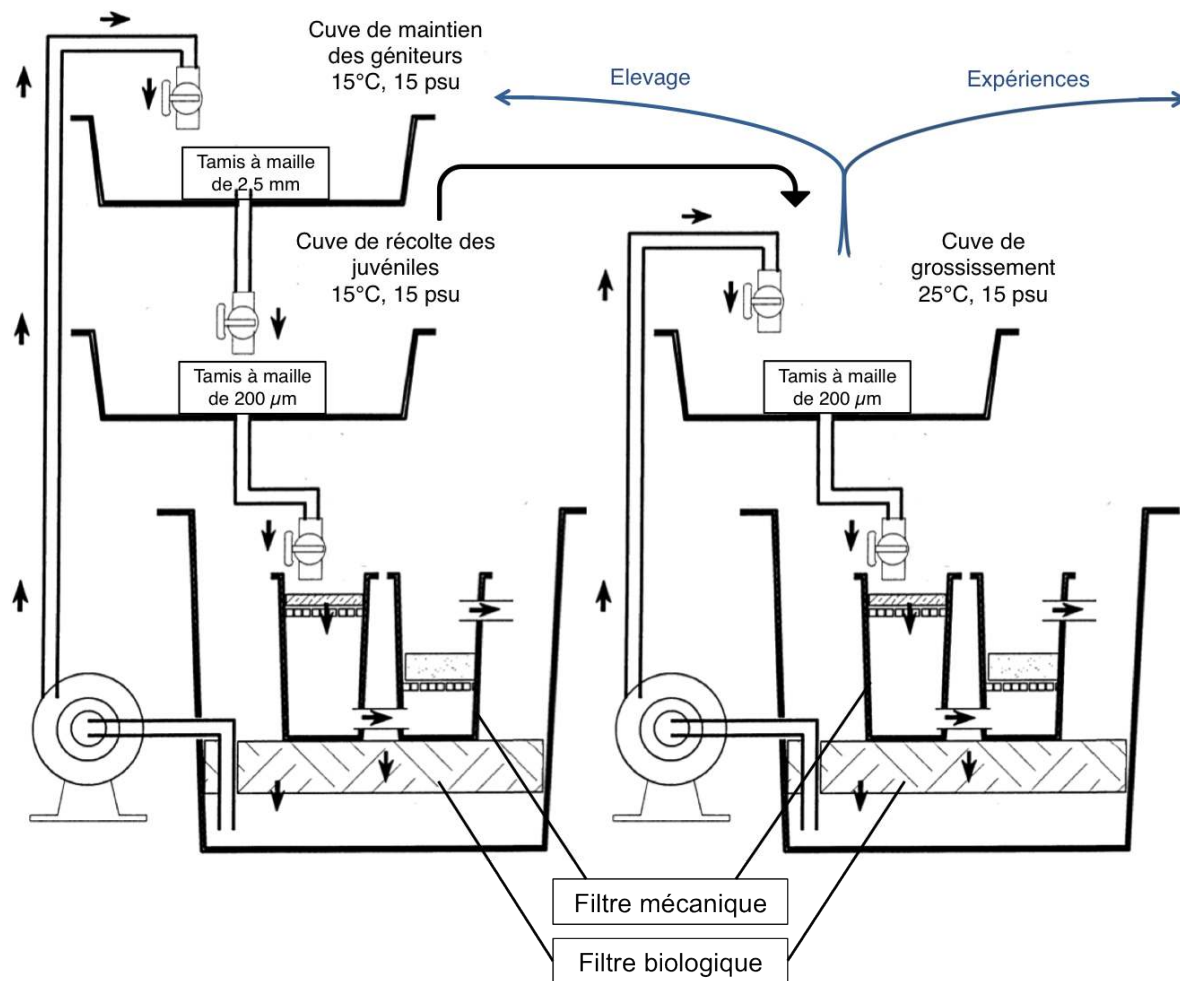


FIGURE 5.5 – Représentation d’une structure adaptée à l’élevage de *N. integer* à des fins expérimentales, modifiée d’après Domingues *et al.* (1999).

5.3.4 Bilan concernant l'élevage de *N. integer*

Cette expérience préliminaire a permis de mettre en place et de valider un système fermé pour la maintenance et l'élevage du mysidae *N. integer*.

Nos résultats ainsi que les données de la littérature suggèrent que l'élevage de cet animal en tant que proie est envisageable à certaines conditions :

1. Utiliser une population de géniteurs relativement grande (≥ 1000 individus) pour produire suffisamment d'individus afin d'assurer le maintien de l'effectif de la population d'origine, et de permettre leur utilisation pour la réalisation d'expériences ;
2. Pour une production optimale, utiliser des paramètres adaptés, d'une part, aux phases de croissance avant la maturité sexuelle, et d'autre part, à la reproduction (Fig. 5.5). Afin d'optimiser le temps alloué à la croissance sans induire une trop grande mortalité, les animaux pourraient être maintenus à 25°C et 15 psu et nourris uniquement avec des nauplii d'*Artemia* spp., tandis que les animaux servant de géniteurs pourraient être maintenus à 15°C et 15 psu (ou à une salinité légèrement inférieure), permettant d'optimiser la survie des géniteurs et des juvéniles (qui sont moins tolérants aux salinités élevées), et nourris avec un supplément algal en plus des nauplii pour éviter de potentielles carences. Si une alimentation en continue n'est pas possible, deux apport quotidien en nourriture devront être effectué ;
3. Ce type d'élevage nécessitant une manutention et un suivi importants et réguliers, il n'est envisageable sur le long terme qu'en présence d'une équipe de deux ou trois personnes.

Au cours de cette période d'élevage, des essais de contamination au Zn ont également été réalisés.

5.4 Contamination au Zn de *Neomysis integer*

En écotoxicologie, *N. integer* et la plupart des autres espèces de mysis sont utilisées en tant qu'animaux indicateurs de toxicité, mais peu d'études ont rapporté des données concernant l'accumulation de contaminants dans ces organismes (Amiard *et al.*, 1980; Amiard-Triquet *et al.*, 1980; Miramand, 1998). Cependant, la teneur en Zn de $260 \mu\text{g g}^{-1}$ poids sec mesurée dans *N. integer* à la sortie de l'estuaire de la Seine semblait encourageante quant à sa capacité à accumuler cet élément (Miramand *et al.*, 1998).

5.4.0.1 Matériel et méthodes

Les travaux de Verslycke *et al.* (2003) ont montré que la sensibilité de *N. integer* vis-à-vis d'un certain nombre d'éléments métalliques (Cd, Hg, Ni, Pb et Zn) est moins importante que celle d'*A. bahia*, qui est couramment utilisée outre-Atlantique pour déterminer la toxicité d'eaux marines contaminées. Cette étude a également mis en évidence une plus grande tolérance au Zn de *N. integer* à une salinité de 25 psu (96-h $\text{LC}_{50} = 1037 \mu\text{g L}^{-1}$) comparée à 5 psu (96-h $\text{LC}_{50} = 540 \mu\text{g L}^{-1}$). C'est pourquoi, au cours de notre étude, les expositions ont été réalisées à 25 psu à une concentration de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ (concentration sublétales correspondant à 1/5 de la 96-h LC_{50} comme décrit par Erk *et al.* (2008b)) afin d'étudier le potentiel d'accumulation du Zn par *N. integer*.

Une première exposition a été réalisée en contaminant l'eau et en échantillonnant des individus après 1, 3 et 7 jours. Au cours de la deuxième exposition, outre la contamination de l'eau, les nauplii d'*Artemia* spp. utilisés comme nourriture ont été mis en balnéation 24 h dans de l'eau de mer à la concentration sublétales de 5 mg Zn L^{-1} (Martínez *et al.*, 1999), et les animaux ont été échantillonnés après 1 et 3 jours. Dans les deux cas, deux aquariums ont été utilisés : un pour les conditions contrôles (C) et un pour les conditions exposées (E). Quotidiennement, un tiers du volume d'eau était changé pour éviter l'accumulation de composés toxiques et les paramètres de l'eau mesurés pour s'assurer que les conditions de maintien n'étaient pas différentes entre C et E. Chaque échantillonnage consistait à prélever

une dizaine d'individus par aquarium et à les conserver à -80°C , ce nombre de mysis correspondant à une masse d'environ 60 mg de matière sèche nécessaire au dosage du Zn en triplicata. Le dosage du Zn dissous a été réalisé comme décrit précédemment (partie 3.2.2.2), tandis que les mysis ont été minéralisées avant de déterminer leur teneur en Zn par spectrométrie d'absorption atomique en mode flamme (SAA-F). Chaque lot (C et E) a été lyophilisé avant d'être finement broyé dans un mortier en agate préalablement lavé à l'acide (bain à HNO_3 10% suivi d'un rinçage 10 fois à l'eau MilliQ $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Chaque broyât a ensuite été réparti dans 3 microbondes en Téflon à raison de 20 mg chacune, et minéralisé dans 5 ml d'eau régale (mélange d' HNO_3 (69 %, qualité Suprapur) et d' HCl (37 %, qualité Suprapur) 1:3 (v:v), respectivement). La minéralisation a été initiée par une incubation de ce mélange au moins 30 minutes, qui a ensuite été chauffé au four à micro-ondes (Berghof) suivant trois étapes conduisant à une montée et un maintien de la température à 205°C pendant 15 min. La solution obtenue a ensuite été récupérée et son volume ajusté à 25 mL avec de l'eau MilliQ, avant d'être analysée par SAA-F. Dans ces conditions, la limite de détection était de $2,7 \mu\text{g g}^{-1}$ poids sec. Pour chaque série d'analyses, un échantillon de référence de tissus de moules (Standard Reference Material[®] (SRM) 2976, National Institute of Standards and Technology (NIST)) certifié en métaux a été minéralisé et analysé suivant le même protocole afin de valider les dosages (Tableau 5.1). Au cours de ces expériences aucune mortalité n'a été recensée.

TABLE 5.1 – Concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ poids sec) en Zn dans les tissus de moule SRM 2976 mesurées (moyenne $\pm$ SD) et certifiées (moyenne $\pm$ IC₉₅).

Standard	Zn
Mesuré	131 ± 3
Certifié	137 ± 13

Mis à part la salinité, les paramètres de l'eau sont restés proches de ceux de l'élevage (Fig. 5.3). Les concentrations en Zn dissous mesurées pendant les 2 expériences menées ont été sensiblement les mêmes : $13,7 \pm 3,5$ et $12,2 \pm 1,9 \mu\text{g L}^{-1}$ dans C, et 178 ± 5 et $178 \pm 3 \mu\text{g L}^{-1}$ dans E, respectivement au cours de la première et de la deuxième exposition. Les concentrations relativement élevées en Zn trouvées dans l'eau de la cuve contrôle peuvent être expliquées par une accumulation du Zn dans notre système d'élevage et par des teneurs

élevées en Zn dans l'eau de mer à proximité du pompage (échantillonnages SOMLIT réalisés devant la station marine au cours des expériences indiquant des valeurs de 8,7 et 12,7 $\mu\text{g L}^{-1}$).

5.4.1 Résultats et discussion

5.4.1.1 Première exposition

La première exposition a mis en évidence une augmentation de la concentration en Zn dans les animaux à partir de 3 jours d'exposition (Tableau 5.2). Cette accumulation semble s'arrêter après 3 jours. En effet, les concentrations mesurées entre 3 et 7 jours d'exposition sont quasi identiques (73 contre 72 $\mu\text{g g}^{-1}$ poids sec, respectivement). Cette augmentation est de l'ordre de 10 à 15 % de la teneur en Zn mesurée dans les animaux de la cuve contrôle (64 $\mu\text{g g}^{-1}$ poids sec). Cette première exposition a suggéré que l'accumulation du Zn dans *N. integer* par la voie dissoute était relativement rapide (entre 1 et 3 jours), mais qu'elle restait faible. En accord avec ces observations, la seconde exposition ne s'est déroulée que sur 3 jours.

TABLE 5.2 – Concentrations (moyenne $\pm$ SD ; $\mu\text{g g}^{-1}$ poids sec) en Zn dans les tissus de *N. integer* en conditions contrôles (C) et en conditions exposées (E) en fonction du temps au cours de l'exposition 1. Les astérisques indiquent les différences significatives entre les 2 conditions testées à chaque temps d'exposition (* $p < 0.05$).

Temps d'exposition (jours)	C	E	Augmentation (%)
0	63 $\pm$ 2	-	-
1	66 $\pm$ 2	70 $\pm$ 4	7,2
3	63 $\pm$ 2	73 $\pm$ 6*	15,6
7	65 $\pm$ 1	72 $\pm$ 5*	11,5

5.4.1.2 Deuxième exposition

Les résultats obtenus (Tableau 5.3) ont montré que l'utilisation de nauplii d'*Artemia* spp. exposés au Zn en tant qu'aliment induit une accumulation par rapport aux contrôles (C) légèrement supérieure à celle observée au cours de la première exposition (17 à 21,4 % contre 11,5 à 15,6 %). La cinétique d'accumulation semble proche de celle observée précédemment

avec une augmentation ayant lieu principalement au cours des 24 premières heures. Les concentrations obtenues restent cependant faibles comparées à celles issues d'individus de Baie de Seine (Miramand *et al.*, 1998).

TABLE 5.3 – Concentrations (moyenne $\pm$ SD ; $\mu\text{g g}^{-1}$ poids sec) en Zn dans les tissus de *N. integer* en conditions contrôles (C) et en conditions exposées (E) en fonction du temps au cours de l'exposition 2. Les astérisques indiquent les différences significatives entre les 2 conditions testées à chaque temps d'exposition (* $p < 0.05$).

Temps d'exposition (jours)	C	E	Augmentation (%)
0	52 ± 5	-	-
1	54 ± 4	$63 \pm 2^*$	17,0
3	53 ± 2	$65 \pm 6^*$	21,4

Il est important de noter que la différence de concentrations en Zn mesurée dans les mysis C entre la première et la deuxième exposition est liée à leur origine (64 ± 1 vs $53 \pm 1 \mu\text{g g}^{-1}$ poids sec). En effet, les individus utilisés lors de la première exposition étaient issus de l'élevage, tandis que les individus utilisés au cours de la deuxième exposition avaient été prélevés dans le milieu naturel peu de temps avant. Les concentrations relevées dans les animaux de la deuxième exposition sont cohérentes avec celles mesurées dans des individus de l'estuaire de la Loire ($48 \pm 1 \mu\text{g g}^{-1}$ poids sec ; Amiard *et al.*, 1980). Cela confirme les teneurs en Zn légèrement supérieures dans nos eaux d'élevage par rapport au milieu naturel.

Considérant ces résultats, une contamination trophique au Zn des juvéniles de seiches, sur le long terme en utilisant *N. integer*, semblait réalisable mais contraignante. En effet, afin d'assurer une exposition trophique significativement différente des conditions contrôles, les juvéniles devaient recevoir une alimentation importante (i.e. 3 mysis $\text{juv}^{-1} \text{ jrs}^{-1}$). Bien qu'envisageable, ce besoin en mysis était assez conséquent. De plus, la tenue d'une telle expérience sur plusieurs semaines impliquait des contraintes zootechniques considérables. Ayant de nombreux travaux à mener en parallèle, nous avons choisi de ne pas prolonger ces essais.

5.4.2 Bilan et perspectives

Ces essais ont permis de mettre en évidence le potentiel de *N. integer* en tant que proie pour la réalisation de contaminations trophiques expérimentales de jeunes céphalopodes. L'accumulation rapide mais faible du Zn comparée à celle rapportée chez d'autres organismes (Jung et Zauke, 2008; Zhang et Wang, 2005) est cependant cohérente avec la capacité de certains crustacés à réguler cet élément (Rainbow et White, 1989). Afin de mieux comprendre sa cinétique d'accumulation par *N. integer*, il serait intéressant d'exposer des animaux pendant une plus longue période, à différentes concentrations, en faisant varier les paramètres température-salinité qui ont une influence forte sur le métabolisme de *N. integer* et la bio-disponibilité de l'élément dissous (Verslycke *et al.*, 2003; Rainbow, 1995).

Il serait également intéressant d'étudier l'accumulation d'éléments non essentiels tels que le cadmium et l'argent. Les organismes régulant souvent moins bien ces éléments, leur bio-accumulation pourrait donc être plus importante (Rainbow et White, 1989; Rainbow, 2007).

Enfin, *N. integer* pourrait être un organisme particulièrement intéressant dans le cadre d'études utilisant des radiotraceurs. En effet, cette technique très sensible permet de diminuer de façon importante le nombre d'organismes nécessaires à l'expérimentation tout en travaillant sur des temps relativement longs. De plus, les résultats obtenus sont directs et rapides, contrairement aux dosages traditionnels qui nécessitent une série de phases préparatives relativement longues (Warnau et Bustamante, 2007).

Quatrième partie

Caractérisation des hémocytes de *Sepia officinalis* et développement de leur culture primaire dans le but de réaliser des tests de toxicité *in vitro*

Préambule

Cette partie rapporte les études réalisées sur les hémocytes de la seiche commune.

Le chapitre six présente la caractérisation des hémocytes de *S. officinalis*, pré-requis indispensable à toute étude approfondie de ce type cellulaire. Dans ces travaux, nous avons cherché à 1) confirmer les observations d'études précédentes par des outils jamais utilisés sur ce type cellulaire (i.e. cytométrie en flux, microscopie électronique), et 2) affiner la compréhension du fonctionnement du système immunitaire de ce céphalopode par différents dosages enzymatiques (i.e. phosphatases acides, lysozymes, POs, inhibiteurs de protéases) dans les compartiments de l'hémolymph (i.e. plasma, hémocytes), associés à l'étude de la phagocytose.

Le chapitre sept décrit les tests réalisés afin de 1) déterminer des paramètres de culture *in vitro* (i.e. milieu, température, et temps de culture), et 2) étudier les éventuelles perturbations de la phagocytose et de la production de ROS sur ces cellules, induites par des expositions à différents éléments traces (i.e. Cd et Zn).

Chapitre 6

Hemocyte morphology and phagocytic activity in the common cuttlefish (*Sepia officinalis*)

Charles Le Pabic^{a,b,c}, Didier Goux^{a,d}, Maryline Guillamin^{a,e}, Georges Safi^{a,b}, Jean-Marc Lebel^{a,b,c}, Noussithé Koueta ^{a,b,c}, Antoine Serpentine^{a,b,c}

accepté dans *Fish & Shellfish Immunology*

^a Normandie Université, F-14032 Caen, France

^b UMR BOREA, MNHN, UPMC, UCBN, CNRS-7028, IRD-207, IBFA Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la Paix, CS 14032, 14032 Caen cedex, France

^c Centre de Recherches en Environnement Côtier, Université de Caen Basse-Normandie, 54 rue du Docteur Charcot, 14530 Luc-sur-Mer, France

^d CMAbio, Université de Caen Basse-Normandie, F-14032 Caen cedex, France

^e Plateau de cytométrie SFR ICORE, Université de Caen Basse-Normandie, F-14032 Caen cedex, France

Abstract

Little is known about the immune system of cephalopods, in spite of their many highly derived characters within the molluscan clade, including a vertebrate-like high-pressure closed circulatory system. Further the economic importance of cephalopod fisheries, potential for aquaculture, and use as ecotoxicology models demand a thorough understanding of their immune system. In this study, we present a comprehensive characterization of hemocytes in the common cuttlefish *S. officinalis*. Cytological stainings, electron microscopy- and flow cytometry-observations highlight a single granulocyte population with various densities of eosinophilic granules and unstained vesicles. These hemocytes contain acid phosphatase-, lysozyme- and proPO system enzymes, and have high activity in bead phagocytosis assays. Interestingly, bead pre-incubation in plasma results in time-dependent aggregation perhaps resulting from hemocyanin-coating, and decrease in phagocytosis. This study provides the basis for understanding hemocyte-mediated immunity in the common cuttlefish, and essential background for future studies on cephalopod immunity.

Keywords : Cuttlefish (*Sepia officinalis*) ; Cephalopod mollusk ; Hemocyte population ; Enzymatic assay ; Phagocytosis ; Plasma opsonization

6.1 Introduction

Invertebrates resist pathogens despite their lack of adaptive immunity (Loker *et al.*, 2004). The tremendous variety of invertebrate life histories and ecological niches suggests a great diversity of immune strategies (Rowley et Powell, 2007). Among Mollusca – one of the most diverse groups of animals (Ponder et Lindberg, 2008), studies of immunity have mostly focused on bivalves (e.g. Aladaileh *et al.*, 2007; Allam *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2005; Donaghy et Volety, 2011; Donaghy *et al.*, 2009a; Hong *et al.*, 2013; López *et al.*, 1997b; Matozzo *et al.*, 2007; Salimi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012; Wootton et Pipe, 2003) and gastropods (e.g. Accorsi *et al.*, 2013; Barracco *et al.*, 1993; Donaghy *et al.*, 2010; Mahilini et Rajendran, 2008; Matricón-Gondran et Letocart, 1999; Travers *et al.*, 2008), while few studies have focused on cephalopods (Castellanos-Martínez et Gestal, 2013; Ford, 1992). Cephalopods are an interesting model because of their (1) vertebrate-like high-pressure closed circulatory system, (2) high sensitivity to environmental parameters, (3) short-life span and (4) elevated metabolic rate (Melzner *et al.*, 2007a; Pierce *et al.*, 2008). Moreover, their economical importance has recently grown in terms of fisheries and aquaculture (e.g. Berger, 2010; Payne *et al.*, 2006; Reid *et al.*, 2005; Sykes *et al.*, 2006b; Uriarte *et al.*, 2011).

As in other invertebrates, the cephalopod immune system relies on humoral factors and cell-mediated mechanisms acting together to eliminate invading micro-organisms (Soudant *et al.*, 2013; Malham, 1996). Humoral factors mainly include lectins (e.g. agglutinins, opsonins), antimicrobial factors (e.g. peptides, acid phosphatases, lysozymes), and several signaling pathways including prophenoloxidase (proPO) and proteolytic cascades (Rowley et Powell, 2007; Wang *et al.*, 2013b). In contrast, cell-mediated defense mechanisms are primarily performed by hemocytes (Hcs) – cells synthesized in white bodies and freely circulating in plasma and infiltrating in tissues (Claes, 1996; Cowden et Curtis, 1981). Hcs are of central importance to invertebrates because of their involvement in numerous physiological functions (Beninger *et al.*, 2003; Donaghy *et al.*, 2009b; Matozzo *et al.*, 2001; Montes *et al.*, 1995; Mount *et al.*, 2004), including their ability to phagocytose, encapsulate and destroy foreign particles (Donaghy *et al.*, 2010; Rodríguez-Domínguez *et al.*, 2006; Soudant *et al.*, 2013). In cephalopods, Hcs have mainly been described as a one cell-type population with large lobate nucleus and abundant granules, able to phagocytose (Bolognari, 1951; Collins *et al.*, 2012; Cowden et Curtis, 1981; Malham, 1996; Rodríguez-Domínguez *et al.*, 2006). However, these

He descriptions were mainly performed in Octopodidae as well as in the sepiolidae *Euprymna scolopes* and little is known about the immune cellular factors of other cephalopod species such as the sepiidae (cuttlefish) *Sepia officinalis*. Because of the distinct ecology of Sepiidae within Cephalopodia (Boucaud-Camou et Boismery, 1991; Uriarte *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2003), they may also have distinct immune requirements.

In this study, we performed cytological stainings, electron microscopy and flow cytometry (FCM) analysis to morphologically characterize *S. officinalis* Hcs. In addition, we investigated humoral factor localization between plasma and cells, and phagocytic reactions at several incubation times, temperatures and plasma concentrations. Our results highlighted one granulocyte population with various densities of acidophilic granules and unstained vesicles. The Hcs, which contained acid phosphatase, lysozyme and proPO system enzymes, had high phagocytic ability, modulated by plasma in our assay conditions.

6.2 Material and methods

6.2.1 Animals

Thirty-one adult cuttlefish *S. officinalis* (21.5 ± 3.1 cm mantle length) were obtained from traps deployed during spring 2011 and 2012 along the Calvados coast (Normandy, France). Cuttlefish were then conditioned at the Centre de Recherches en Environnement Côtier (Luc-sur-Mer, Normandy, France) in 4500-L tanks in an open seawater circuit for at least 2 days, fed with crustaceans *Crangon crangon* and *Carcinus maenas*, and starved for 1 day before experimentation. The sex of each individual was determined.

6.2.2 Hemolymph collection

Before hemolymph sampling and following ethical procedures (Directive 2010/63/EU), cuttlefish were anesthetized as described by Andrews *et al.* (2013) through placement for 10 min in seawater containing 2 % ethanol. Between 9 and 13 ml of hemolymph was then withdrawn from the anterior mantle vein (King *et al.*, 2005) using a syringe with 18-gauge needle. The sample was transferred into a sterile tube, diluted or not with one volume of cooled sterile antiaggregative modified Alsever solution (115 mM glucose; 27 mM sodium

citrate; 11.5 mM EDTA; 382 mM NaCl pH 7.5; Bachère *et al.*, 1988), depending on the procedure (see below), and kept on ice to minimize cell clumping. Hc viability was checked by mixing one volume of Alsever-diluted hemolymph with one volume of trypan blue solution (0.4 %) and Hc concentration was determined with non diluted hemolymph using a Thoma cell. Once sampling was completed, animals were euthanized by increasing ethanol concentration to 10 % (Oestmann *et al.*, 1997).

6.2.3 Chemicals

Sodium chloride (NaCl), anhydrous and hexahydrate magnesium chloride (MgCl_2 and $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), calcium chloride (CaCl_2), bovin serum albumin (BSA), Bradford reagent, trypsin TPCK (N-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone), $\text{N}\alpha$ -benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA), p-nitrophenyl-phosphate, dimethyl sulfoxide (DMSO), trizma hydrochloride (Tris-HCl), trizma base, 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA), tropolone, hen egg white (HEW) lysozyme, freeze-dried *Micrococcus lysodeikticus*, sodium phosphate dibasic dihydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), citric acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), Wright stain, neutral red, L-15 medium (Leibovitz), potassium chloride (KCl), magnesium sulphate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), formaldehyde solution, L-glutamine, streptomycin, sodium hydroxide (NaOH), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), trypan blue solution, methanol and HEPES were obtained from Sigma-Aldrich (France). Halt Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free (100X) was obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Ethanol was obtained from Carlo erba (Milan, Italy). Hemacolor[®] staining kit was obtained from Merck Millipore (Darmstadt, Germany). Low melting point agar was obtained from Carl Roth (Lauterbourg, France). All chemicals used for electron microscopy i.e. glucose, sodium citrate, glutaraldehyde, sodium cacodylate, sucrose, osmium tetroxide (OsO_4), propylene oxide, araldite resin, uranyl acetate and lead citrate were obtained from Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA).

6.2.4 Morphological characterization of *S. officinalis* Hcs

6.2.4.1 Hemolymph cell monolayer stainings

For Hc staining, one drop of hemolymph was placed on a Thermanox[™] coverslip (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and allowed to adhere for 30 min at 15°C. Before staining,

coverslips were rinsed in Molluscan Physiological Saline (MPS; 0.4 M NaCl, 0.1 M MgSO₄, 20 mM HEPES, 10 mM CaCl₂ and 10 mM KCl modified after Lowe *et al.* (1995)) to remove plasma. Hemacolor[®] staining was performed according to the manufacturer's recommendations. Wright staining was performed after 1 min air-drying by 1 min dehydration in absolute methanol, following by 1 min in Wright solution (0.66 % in methanol), then diluted (1:4) in distilled water during 4 min and rinsed. To highlight the cell lysosomal system, neutral red (NR) uptake was performed by incubating cells for 30 min in NR solution (1:500; NR stock solution (20 mg NR/ml DMSO):MPS) in a moist chamber at 15°C, before observation.

Freshly spread Hcs were observed using an inverted binocular microscope (Leica[®] DM IRB, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Stained Hc observations were carried out with a Nikon Eclipse 80i light microscope with computer-assisted microscopic image analysis system, NIS-elements D 2.30 software (Nikon[®], Champigny-sur-Marne, France).

6.2.4.2 Electron microscopy

After 10 min $300 \times g$ centrifugation, Hc pellets ($N = 5$) were rinsed with MPS and fixed in 3.2 % glutaraldehyde in 0.31 M sodium cacodylate buffer, with 0.25 M sucrose (pH 7.4) during for 90 min at 4°C. The cells were washed 3 times in rinsing solution (0.4 M sodium cacodylate, 0.3 M sucrose, pH 7.4). Then, cells were post-fixed 1 h with 1 % OsO₄ in cacodylate buffer 0.2 M, with 0.36 M sucrose (pH 7.4) at 4°C (protected from light), and washed in rinsing solution.

For scanning electron microscopy (SEM), cells were sedimented for 7 days on Thermanox[™] coverslip coated with poly-l-lysine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) during several days. They were then dehydrated in progressive bath of ethanol (70-100 %) and critical point dried (Leica[®] EM CPD030). Finally, cells were sputtered with platinum and observed with scanning electron microscope JEOL 6400F. Freshly sampled cell diameters were determined by measuring 100 cells per cuttlefish ($N = 5$).

For transmission electron microscopy (TEM), cells were pellet in 2 % low melting point agar at 40°C, and then dehydrated through increasing concentrations of ethanol (70-100 %) and propylene oxide 100 %, embedded in araldite resine and allowed to polymerise for 48 h at 60°C. Ultrathin sections were done and contrasted with 2.5 % uranyl acetate diluted in 50 % ethanol for 30 min and contrasted for 5 min in Reynold's lead citrate (Venable et

Coggeshall, 1965). Finally, cells were observed by transmission electron microscope JEOL 1011 and images were obtained with Camera Megaview 3 and Analysis Five software.

6.2.5 Biochemical analysis

6.2.5.1 Enzyme extraction

Hcs and plasma were separated in non diluted hemolymph by $500 \times g$ centrifugation for 10 min at 4°C. Plasma was then removed, checked for absence of Hc microscopically, and stored in aliquots at -80°C until analysis. Upon complete plasma removal, Hc pellets were gently rinsed in either Tris buffer pH 7 (0.1 M Tris-HCl, 0.45 M NaCl, 26 mM MgCl₂ and 10 mM CaCl₂) for phenoloxidase (PO) assays (Luna-Acosta, 2010) or Tris buffer pH 8 (10 mM Tris-HCl and 150 mM NaCl) for acid phosphatase, lysozyme and protease inhibitor (PI) assays (Safi, 2013). Cells were resuspended at 10×10^6 cells mL⁻¹ in same extraction buffer and sonicated at 60 W for 20 s. Cell extracts were then centrifuged at $10,000 \times g$ and their supernatant aliquoted and stored at -80°C until analysis.

6.2.5.2 Enzymatic assays

All activities were expressed in relation to protein concentration measured by the Bradford method (Bradford, 1976) using BSA as standard.

Total acid phosphatase activity was determined according to Moyano *et al.* (1996) using *p*-nitrophenyl-phosphate 2 % as substrate in a 1 M Tris buffer at pH 3. Then, 10 μ L of supernatant was added to 10 μ L of substrate in 96-well flat bottom plates (BD, USA). After 30 min incubation at 25°C, 100 μ L of NaOH 1 M were added to stop the reaction. The absorbance was measured at 405 nm using a Mithras LB 940 luminometer (Berthold, Thoiry, France). Total acid phosphatase activity was expressed as specific activity (U mg⁻¹ protein) where one enzymatic unit corresponded to the absorbance recorded after incubation.

Lysozyme activity was quantified according to Malham *et al.* (1998b). Fifty μ L of HEW lysozyme (85 μ g mL⁻¹ in Tris buffer pH 8 described in section 2.5.1.) standard was serially diluted in triplicate in 96-well flat bottom plates (BD, USA). Fifty μ L of each sample was added in triplicate to the 96-well plates as well as 50 μ L of Tris buffer pH 8, as blanks. One hundred and fifty μ L of the substrate, freeze-dried *M. lysodeikticus* (75 mg/100 mL of phosphate/citrate buffer pH 5.8 (Na₂HPO₄·2H₂O, 4.45 g/250 mL distilled H₂O; C₆H₈O₇, 2.1

g/100 mL distilled H₂O ; NaCl, 0.09 g/100 mL buffer), was added to each well. The reductions in turbidity in the wells were read on Mithras LB 940 luminometer (Berthold, Thoiry, France) at 25°C for 5 minutes at 10 second intervals at 450 nm using negative kinetics. Lysozyme concentrations were calculated from the standard curve (μg HEW lysozyme equivalent mL⁻¹). Final lysozyme-like activity was thus expressed as μg HEW lysozyme eq. mg⁻¹ protein.

As described by Malham *et al.* (1998b) and Thompson *et al.* (1995), PI activity was measured by transferring 20 μL of sample and 10 μL of trypsin TPCK (100 μg mL⁻¹ of 0.05 M Tris buffer pH 8) in 96-well flat bottom plates (BD, USA), and mixed at room temperature for 5 minutes. In parallel, intrinsic trypsin activity was measured by replacing 10 μL of trypsin by Tris buffer pH 8 described above (section 2.5.1.). A positive control was used by replacing the sample with Tris buffer pH 8. Two hundred μL of BAPNA substrate solution (5.2 mg BAPNA mL⁻¹ DMSO) in 10 mL of 0.01 M trizma base buffer pH 7.4) was added to each well and incubated for 15 minutes at room temperature. Absorbance was read at 405 nm using Mithras LB 940 luminometer (Berthold, Thoiry, France), and PI activity was expressed as the percentage of trypsin sample inhibition (TI) compared to the positive control.

In order to partly discriminate PO synthesis and activation site, we took care to avoid unwanted activation of proPO during each step of the experiment. PO-like activity was measured spectrophotometrically by recording the formation of *o*-quinones, as described by Luna-Acosta (2010) with slight modifications to distinguish artificially activated PO (APO) (corresponding to PO-like activity resulting from zymogenic PO (proPO) activation plus already ‘active’ form) and *in vivo* ‘active’ PO form (Le Pabic, 2014). PO assays were conducted in 96-well flat bottom plates (BD, USA). L-DOPA was used as substrate, at a final concentration of 10 mM (Luna-Acosta, 2010) and prepared extemporaneously in Tris buffer pH 7 described above (section 2.5.1.). Troponone (10 mM) and trypsin TPCK (1 g L⁻¹) were used respectively as PO inhibitor and elicitor as previously described in *S. officinalis* (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2009a; Le Pabic, 2014). To avoid uncontrolled proPO activation by intrinsic proteases, Halt Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free (1X) wide spectrum PI was used. For each sample, autoxidation of sample, ‘basal’, ‘inhibited’ and ‘activated’ PO-like activities were measured. For non-enzymatic sample autoxidation, 10 μL of sample was mixed with Tris buffer pH 7. For ‘basal’ PO-like activity, 10 μL of sample was firstly mixed during 10 min with 1.4 μL Halt Protease Inhibitor Cocktail (100X), followed by adapted volume

of Tris buffer pH 7 and 80 μL L-DOPA. Similarly, for inhibited or APO-like activity, 10 μL of sample was mixed with 10 μL of tropolone (140 mM) or trypsin TPCK (14 g L⁻¹), Tris buffer pH 7 and 80 μL L-DOPA. Each measurement was systematically controlled by replacing sample by buffer, always in a final volume reaction of 140 μg . Immediately after L-DOPA addition, PO-like activities were monitored at 25°C for 5 h using Mithras LB 940 luminometer (Berthold, Thoiry, France) at 490 nm (Luna-Acosta, 2010). When an inhibited PO-like activity was measured, this value was subtracted from APO and PO-like activities. Tropolone, with its copper chelator and peroxidase substrate properties, ensured that PO-like activity alone was detected (and not peroxidase). Results were also systematically corrected for non-enzymatic autoxidation of the substrate and were expressed in enzyme unit (1 U) per mg of total protein. One U corresponded to an increase of 0.001 in the absorbance per min at 25°C (Le Pabic, 2014).

6.2.6 Flow cytometry (FCM) analysis

FCM analyses were performed using a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter). In our study, excitation light was provided by a 22 mW blue diode (488 nm), and fluorescence was collected in the FL1 channel with a 525 nm bandpass filter. For each sample about 20,000 events were acquired. Data were analysed using Kaluza software (Beckman Coulter).

6.2.6.1 Freshly sampled Hc cytomorphology

Hc morphology was based upon relative flow-cytometric parameters, Forward Scatter (FSC) and Side Scatter (SSC). FSC and SSC commonly measure particle size and internal complexity, respectively. Internal complexity, also reported as granularity, depends upon various inner components of the cells including shape of the nucleus, amount and types of cytoplasmic granules, cytoplasmic inclusions and membrane roughness (Donaghy *et al.*, 2012). Freshly withdrawn Hc was pelleted by $300 \times g$ centrifugation for 5 min at 4°C, rinsed in MPS, before to be fixed in 3.7 % formaldehyde in MPS and kept in dark at 4°C until FCM analysis.

6.2.6.2 Phagocytosis assays

Evaluation of phagocytosis was based on the ingestion of carboxylate-modified FluoSpheres[®] beads (1.0 μm , yellow-green carboxylate-modified FluoSpheres[®], Molecular Probes) by Hcs. Phagocytosis was expressed as (i) the percentage of cells that had ingested three or more microbeads (Auffret *et al.*, 2006; Hégaret *et al.*, 2003; Allam *et al.*, 2002), and (ii) the average number of microbeads per phagocytic Hcs (Donaghy *et al.*, 2010).

Hemolymph-diluted Alsever solution was used to plate Hcs at 1.0×10^6 cells per well in 6-well plates, into which three volumes of sterile artificial seawater (25.5 g L⁻¹, NaCl, 6.4 g L⁻¹, MgSO₄, 5.2 g L⁻¹ Hepes, 1.1 g L⁻¹ CaCl₂, 0.75 g L⁻¹ KCl pH 7.4) were added to allow cell adhesion. After 60 min of incubation in dark at 15°C, supernatant was removed and cells were covered with 1 mL modified sterile Leibovitz L-15 medium pH 7.6 (20.2 g L⁻¹ NaCl, 0.54 g L⁻¹ KCl, 0.6 g L⁻¹ CaCl₂, 1 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O and 3.9 g L⁻¹ MgCl₂·6H₂O) (Domart-Coulon *et al.*, 1994), supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin and 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ penicillin G into which FluoSpheres[®] were added at a ratio of 1:100 (Hc:beads). Hcs from same individual cuttlefish were analyzed at each time.

In vitro impact of time and temperature

Hcs were collected from 5 cuttlefish as described in section 2.2. To determine temperature-dependence of *S. officinalis* phagocytosis, three different temperatures were investigated; one physiological temperature (15°C) and two temperatures (4 and 25°C) out of the thermal window determined by Melzner *et al.* (2007b) with 15°C-acclimated cuttlefish. In this context, media with FluoSpheres[®] were acclimated to different working temperatures before addition to Hcs. Then, 6-well plates were placed in dark at 4, 15 and 25 CO₂-free incubators, during 30, 60, 120 and 180 min incubation. Afterwards wells were rinsed with MPS to remove bead excess, following by gentle scrapping and centrifugation at $300 \times g$ for 5 min at 4°C. Resulting supernatants were removed, pellets resuspended in 3.7 % formaldehyde solution in MPS and stored in the dark at 4°C until FCM analysis.

In vitro impact of plasma concentrations

To study the plasma opsonization process, FluoSpheres[®] were added to modified L-15 medium mixed with cell-free plasma at 0 (as control), 1, 10 and 50 %. These mixtures were

incubated at 15°C during 1 h before homogenization and addition to cells. After 2 h incubation at 15°C, cells were treated as previously described for FCM analysis.

In parallel, bead phagocytosis was performed in modified L-15 medium or 100 % plasma, and Hcs analysed by TEM as described in section 6.2.4.2

6.2.7 Data analysis

Residual distributions were tested for normality (Shapiro test) as well as homogeneity of variances (Levene test). Student's *t*-test was used to compare Hc concentrations between male and female individuals, specific activities between Hc and plasma compartments, PO- and APO-like activities in each compartment, and phagocytic parameters between control and several plasma treatments. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by non-parametric pairwise permutational *t*-tests ($N < 30$) was used to determine the impact of temperature on phagocytic parameters at each time. Analysis of covariance (ANCOVA) was used to compare phagocytic parameter time-evolution as function of the temperature. All results are expressed and displayed as mean $\pm$ standard deviation (SD). The statistical significance was designed as being at the level of $p < 0.05$. R software was used for statistics and graphics.

TABLE 6.1 – Reported circulant hemocyte concentrations (mean $\pm$ SD and range $\times 10^6$ cell mL⁻¹) in cephalopod, gastropod and bivalve mollusks.

Species	<i>N</i>	Concentration	Range	Authors
Cephalopod				
Loliginidae				
<i>Sepioteuthis lessoniana</i>	18	2.80 $\pm$ 4.24	-	Heming <i>et al.</i> (1990)
Sepiidae				
<i>Sepia officinalis</i>	31	7.23 $\pm$ 5.62	0.92 - 20.31	Present study
Sepiolidae				
<i>Euprymna scolopes</i>	-	5.0	-	Collins et Nyholm (2010)
Octopodidae				
<i>Eledone cirrhosa</i>	≥ 5	> 10.0	-	Malham <i>et al.</i> (1998a, 2002)
<i>Octopus vulgaris</i>	28	10.67 $\pm$ 7.32	2.3 - 25.0	Rodríguez-Domínguez <i>et al.</i> (2006)
<i>O. vulgaris</i>	92	10.3 $\pm$ 7.77	0.49 - 32.0	Castellanos-Martínez <i>et al.</i> (2014)
Gastropod				
Ampullariidae				
<i>Pomacea canaliculata</i>	3	1.1 $\pm$ 0.1	-	Accorsi <i>et al.</i> (2013)
Haliotididae				
<i>Haliotis discus discus</i>	38	2.24	-	Donaghy <i>et al.</i> (2010)
<i>Haliotis tuberculata</i>	40	6.0 $\pm$ 0.7	-	Travers <i>et al.</i> (2008)
Planorbidae				
<i>Biomphalaria tenagophila</i>	10	0.25 $\pm$ 0.13	0.11 - 0.55	Barracco <i>et al.</i> (1993)
Turbinidae				
<i>Turbo cornutus</i>	35	1.50	-	Donaghy <i>et al.</i> (2010)
Bivalve				
Cardiidae				
<i>Cerastoderma edule</i>	10	4.54 $\pm$ 2.21	-	Wootton <i>et al.</i> (2003)
<i>Cerastoderma glaucum</i>	10	0.55 $\pm$ 0.22	-	Matozzo <i>et al.</i> (2007)
Mytilidae				
<i>Mytilus edulis</i>	10	5.68 $\pm$ 3.63	-	Wootton <i>et al.</i> (2003)
<i>Perna perna</i>	60	3.41 $\pm$ 1.77	-	Barracco <i>et al.</i> (1999)
<i>Perna viridis</i>	20	1.30 $\pm$ 0.35	0.73 - 2.20	Donaghy et Volety (2011)
<i>P. viridis</i>	6	5.54 $\pm$ 1.30	-	Wang <i>et al.</i> (2012)
Ostreidae				
<i>Crassostrea ariakensis</i>	15	0.71 $\pm$ 0.22	0.33 - 1.23	Donaghy <i>et al.</i> (2009a)
<i>Crassostrea virginica</i>	-	-	0.65 - 2.80	Goedken et De Guise (2004)
Pectinidae				
<i>Argopecten irradians</i>	≥ 20	37.9	-	Zhang <i>et al.</i> (2006)
Pharidae				
<i>Ensis siliqua</i>	10	6.48 $\pm$ 2.50	-	Wootton <i>et al.</i> (2003)
Semelidae				
<i>Scrobicularia plana</i>	≥ 10	2.99	-	Wootton et Pipe (2003)
Tridacnidae				
<i>Tridacna crocea</i>	6	-	0.3 - 2.6	Nakayama <i>et al.</i> (1997)
Unionidae				
<i>Cristaria plicata</i>	30	2.37 $\pm$ 0.51	-	Xie <i>et al.</i> (2011)
Veneridae				
<i>Chamelea gallina</i>	120	-	1.2 - 2.4	Pampanin <i>et al.</i> (2002)
<i>Macrocallista nimbosa</i>	41	1.08 $\pm$ 0.47	0.12 - 2.06	Donaghy <i>et al.</i> (2012)
<i>M. nimbosa</i>	40	0.99 $\pm$ 0.52	0.26 - 2.2	Jauzein <i>et al.</i> (2013)

In *italic* : SD calculated from SE or CI₉₅

6.3 Results and Discussion

Little is known about cephalopod Hcs, while Hc populations have been extensively studied in other mollusks (bivalves and gastropods). Our study provides the first-description of the circulating Hc population in the cuttlefish *S. officinalis* using FCM and electron microscopy. We also report biochemical- and phagocytosis analysis of Hc interaction with plasma.

6.3.1 Hc viability and concentration

Hc viability in all cuttlefish used in this study was higher than 99 % (data not shown), and no Hc concentration difference was observed between males ($7.20 \pm 5.70 \times 10^6$ cells mL^{-1} ; $N=18$) and females ($7.27 \pm 5.75 \times 10^6$ cells mL^{-1} ; $N=13$). Consequently, we obtained a mean Hc concentration in hemolymph of *S. officinalis* of $7.23 \pm 5.62 \times 10^6$ cells mL^{-1} ranging from 0.92 to 20.31×10^6 cells mL^{-1} . This mean concentration and concentration variability are consistent with reports on cephalopod Hcs (Table 6.1). Although highly variable, the Hc concentration of *S. officinalis* appeared slightly higher than that of the loliginidae *Sepioteuthis lessoniana*, similar to that of the sepiolidae *Euprymna scolopes*, and lower than that of Octopodidae, where the highest Hc concentrations within cephalopods are found (10×10^6 cells mL^{-1}) (Castellanos-Martínez *et al.*, 2014; Collins et Nyholm, 2010; Collins *et al.*, 2012; Heming *et al.*, 1990; Malham *et al.*, 2002, 1998a; Rodríguez-Domínguez *et al.*, 2006). Generally, Hcs of gastropod and bivalve mollusks appear less concentrated with most values ranging between 1 and 5×10^6 cells mL^{-1} (Table 6.1), albeit with population-dependent variation (Donaghy et Volety, 2011; Santarém *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2012).

6.3.2 Hc identification and characterization

6.3.2.1 Light microscopy

After adhesion, fresh cuttlefish Hcs rapidly displayed many thin pseudopodia, and most cells contained refringent and non-refringent granules of various densities in their cytoplasm (Fig. 6.1). Among different stains used, Wright's differential staining allowed the best observation of spontaneously adhering Hcs. A single cell type with large, lobate nucleus, slightly basophilic cytoplasm and acidophilic granules was identified (Fig. 6.2A). Lucent vesicles were also observed in the cytoplasm of some cells. NR uptake revealed dense lysosomal system in

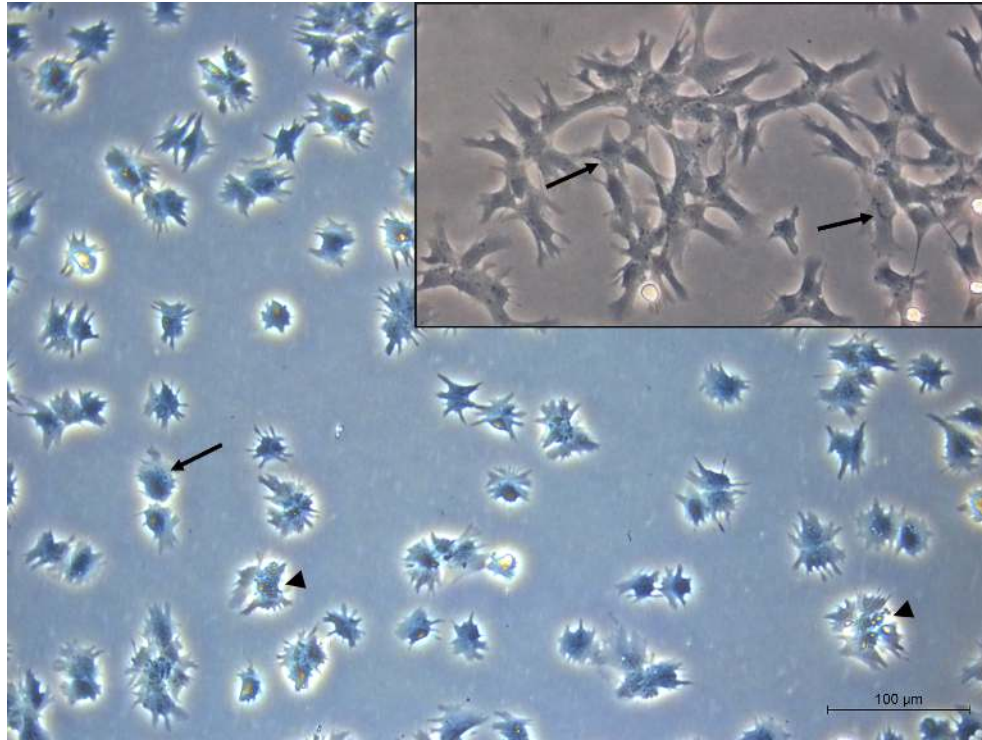


FIGURE 6.1 – Freshly adhesive *Sepia officinalis* hemocytes presenting refringent (arrowhead) and non-refringent (arrow) granules. Inset : hemocytes completely spread

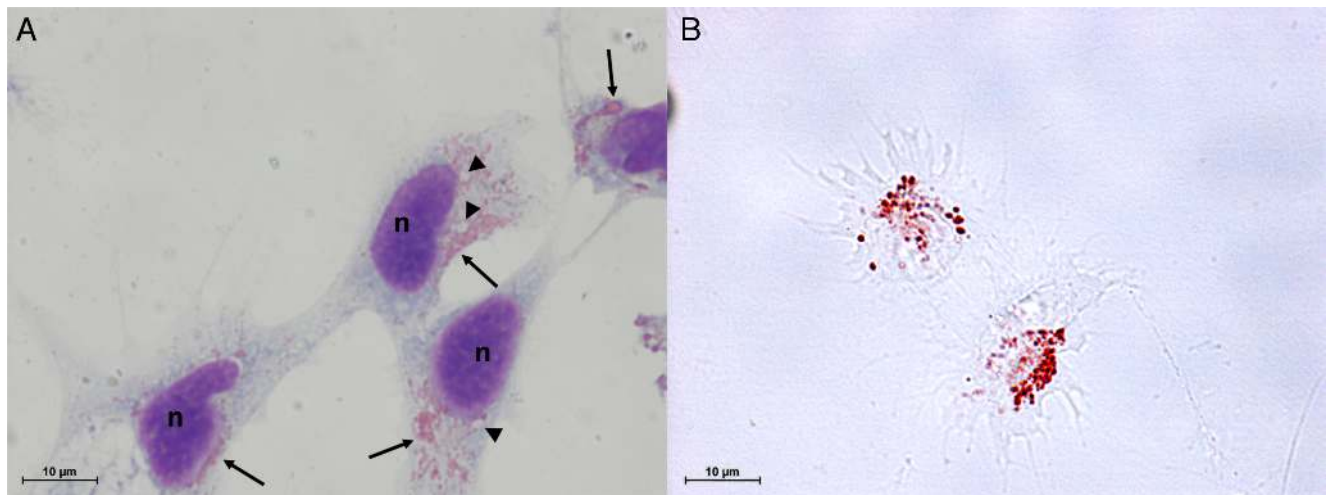


FIGURE 6.2 – Stained *S. officinalis* freshly adhesive hemocytes; (A) Wright staining highlighting large nucleus (n), slightly basophilic cytoplasm, acidophilic granules (arrow) and lucent granules (arrowhead) in spread hemocytes; (B) Neutral red uptake staining of two hemocytes highlighting lysosomal system.

most cells (Fig. 6.2B). According to the classification of bivalve Hcs, 2 main classes are usually accepted : granulocytes with cytoplasmic granules and hyalinocytes with few or no granules (Cheng, 1981). Based on the high granule density found in most Hcs, we classify *S. officinalis* Hcs as granulocytes. These observations are consistent with the majority of studies performed in Octopodidae (Bolognari, 1951; Cowden et Curtis, 1981, 1973; Kondo *et al.*, 2003; Malham, 1996), Sepiidae (Claes, 1996) and Sepiolidae (Collins *et al.*, 2012; Heath-Heckman et McFall-Ngai, 2011), which reported one granular cell population circulating in the hemolymph and also called macrophage-like Hc (Cowden et Curtis, 1981; Nyholm et McFall-Ngai, 1998).

6.3.2.2 Electron microscopy

SEM observations of circulating cuttlefish Hcs showed a single cell type of 10.3 ± 0.8 μm in diameter and able to form numerous pseudopodia (Fig. 6.3A-B), consistent with the above described light microscopy observations. This cell size is consistent with the 8-10 μm cell diameter measured on non-circulating mature Hcs in the cuttlefish white bodies (leukopoietic tissues) (Claes, 1996) and appeared slightly lower than Hc size of octopods *O. vulgaris* and *E. cirrhosa* Hcs : 11.6 ± 1.2 and 12-15 μm , respectively (Castellanos-Martínez *et al.*, 2014; Stuart, 1968).

TEM observations of circulating Hcs highlighted a large lobate nucleus without nucleoli but highly condensed chromatin mainly localized along the inner surface of the nuclear membrane (Fig. 6.3C). The cytoplasm of most cells contained various sizes and densities of two distinct inclusion types (Fig. 6.4A) : electron-dense granules corresponding to lysosomes (Claes, 1996), and electron-lucent membrane-surrounded vesicles, containing various densities of molecules with similar size and circular shape as Hcy molecules (Fig. 6.4B-C ; (Bergmann *et al.*, 2006; Boisset et Mouche, 2000; Dilly et Messenger, 1972; Martoja et Marcaillou, 1993; Muzii, 1981)). These molecules are referred to as Hcy-like hereafter. In contrast to *E. cirrhosa* and *O. vulgaris* Hcs, neither different electron-dense granules nor lipid droplets were observed (Castellanos-Martínez *et al.*, 2014; Cowden et Curtis, 1981; Malham, 1996), suggesting different granule contents between these cephalopods. Mitochondria, Golgi apparatus and rough endoplasmic reticulum that often surrounded the nucleus were also observed in these cells (Fig. 6.3C inset).

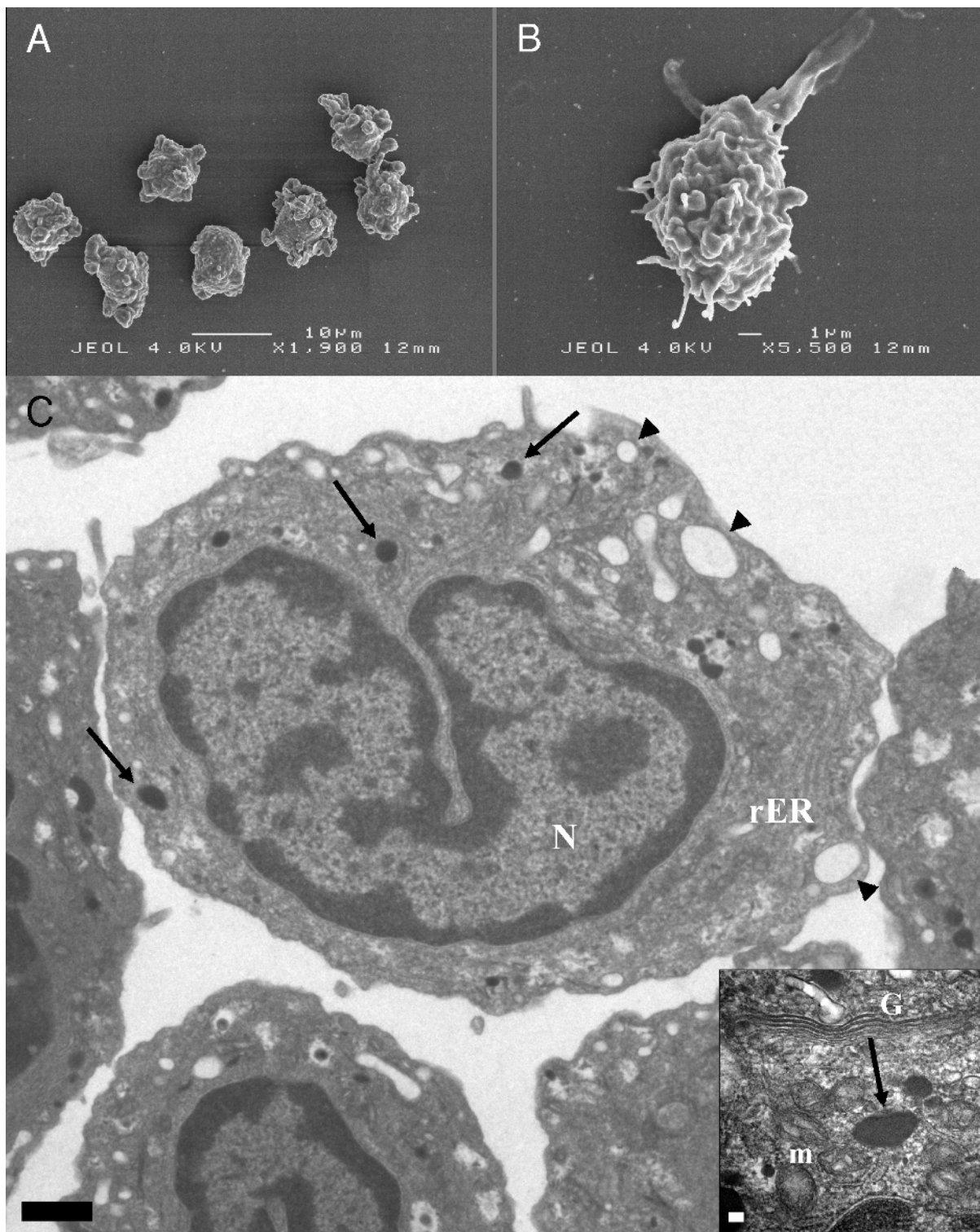


FIGURE 6.3 – Electron micrographs of *S. officinalis* circulating hemocytes. (A) Scanning electron micrograph of several hemocytes showing similar aspect ; (B) Scanning electron micrograph of one hemocyte producing many pseudopodia ; (C) Transmission electron micrograph of circulating hemocytes presenting characteristic lobate-nucleus (N) with highly condensed chromatin along the inner surface of the nuclear membrane, well-developed rough endoplasmic reticulum (rER), electron-dense lysosomal vesicles (arrow) and electron-lucent vesicles (arrowhead). Bar : 1 μm . Inset : high magnification of mitochondria (m) and Golgi apparatus (G). Bar : 0.1 μm .

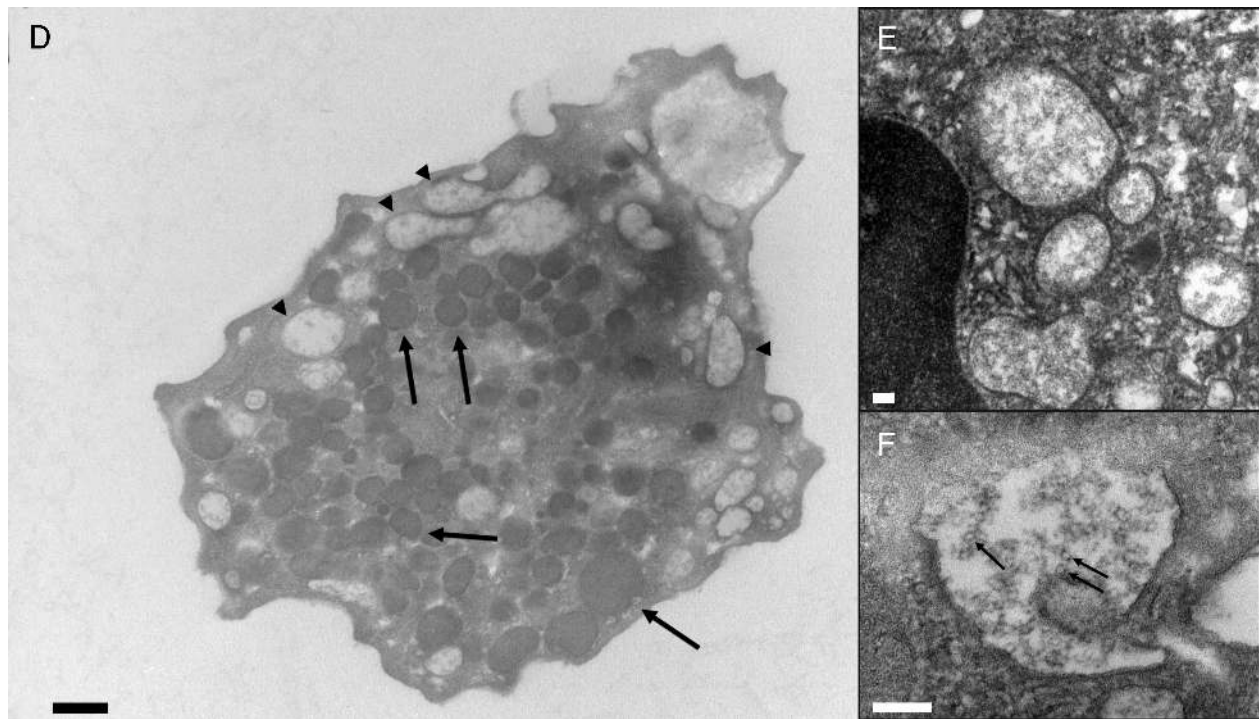


FIGURE 6.4 – Electron micrographs of *S. officinalis* circulating hemocytes. (D) Transmission electron micrograph of circulating hemocytes presenting numerous vesicles; electron-dense lysosomal granules (arrow) and electron-lucent vesicles (arrowhead). Bar : 0.5 μm . (E-F) Electron-lucent vesicles showing inner hemocyanin-like molecules (small arrow). Bars : 100 nm.

6.3.3 Enzymatic assays

Hydrolytic enzyme lysozymes and acid phosphatases were detected in Hc extract alone (Table 6.2), consistent with their known lysosomal distribution (Blasco *et al.*, 1993; Fiolka *et al.*, 2012). These data are in agreement with carbohydrates and acid phosphatases detected by stainings in *E. cirrhosa* Hcs (Malham *et al.*, 1998a) and suggest their synthesis in *S. officinalis* Hcs or earlier during their maturation (Cowden, 1972; Malham *et al.*, 1998a). PI activities were exclusively found in plasma (Table 2), corresponding at least in part to the already described α_2 -macroglobulin activity – the second most abundant protein in *S. officinalis* plasma (Armstrong, 1992; Thøgersen *et al.*, 1992; Vanhoorelbeke *et al.*, 1994). Interestingly, PIs were recently reported in *E. cirrhosa* and *E. scolopes* Hcs (Collins *et al.*, 2012; Malham, 1996), underlying the need for future investigations.

TABLE 6.2 – Specific activity repartition in hemolymph compartments : hemocyte (10×10^6 cell mL^{-1}) and plasma. Asterisk (*) indicates significance between PO- and APO-like activities in each compartment ($p < 0.05$).

Specific activity	N	Hemolymph compartment	
		Hc	Plasma
Acid phosphatases (U mg prot ⁻¹)	9	23.5 ± 10.6	0.1 ± 0.1
Lysozymes (μg HEW lysozyme eq. mg prot ⁻¹)	10	21.9 ± 9.0	0.1 ± 0.1
PIs (trypsin inhibition %age)	9	0.0	31.8 ± 14.6
PO-like (U mg prot ⁻¹)	10	20.3 ± 9.5	2.6 ± 1.0
APO-like (U mg prot ⁻¹)		$30.5 \pm 7.4^*$	2.9 ± 0.9

PO-like activities were measured in both hemolymph compartments (Table 6.2). Siddiqui *et al.* (2006) showed in *S. officinalis* that plasma-associated PO-activity resulted from Hcy, which molecule shares a structurally and functionally equivalent active site with POs (Campello *et al.*, 2008). Therefore, PO-like activities found in Hc extracts probably result, at least in part, from Hcy presence in electron-lucent vesicles (TEM analysis). We note that PO activity was not previously detected in cephalopod Hcs. In contrast, proPO activation – the difference between PO- and APO-like activity, occurred in Hc extract alone ($p=0.01$).

6.3.4 FCM analysis

6.3.4.1 Fresh Hc cytogram

According to the criteria of cell size (FSC) and cell complexity (SSC), FCM supported the presence of a single Hc population in cuttlefish (Fig. 6.5A), albeit with variable internal complexity in some individuals (Fig. 6.5B), consistent with the above described TEM observations. Notably, recent *O. vulgaris* Hc characterization using TEM and CMF reported 2 circulating granulocyte morphs based on size, which were interpreted as different maturing stages of the same cell type (Castellanos-Martínez *et al.*, 2014). Consistently, a study of *S. officinalis* Hc synthesis suggested a Hc maturation model with a single cell precursor (Claes, 1996). This cephalopod organization is distinct from that of bivalves and gastropods, where most Hc studies reported several circulating Hc types derived from one or more cell precursors (e.g. Accorsi *et al.*, 2013; Donaghy *et al.*, 2010, 2009a; Hong *et al.*, 2013; Mahilini et Rajendran, 2008; Matozzo *et al.*, 2007; Prado-Alvarez *et al.*, 2012; Rebelo *et al.*, 2013; Salimi *et al.*, 2009; Travers *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012). Our results further support the presence

of a single mature circulating cell type in the Hc population of cephalopods.

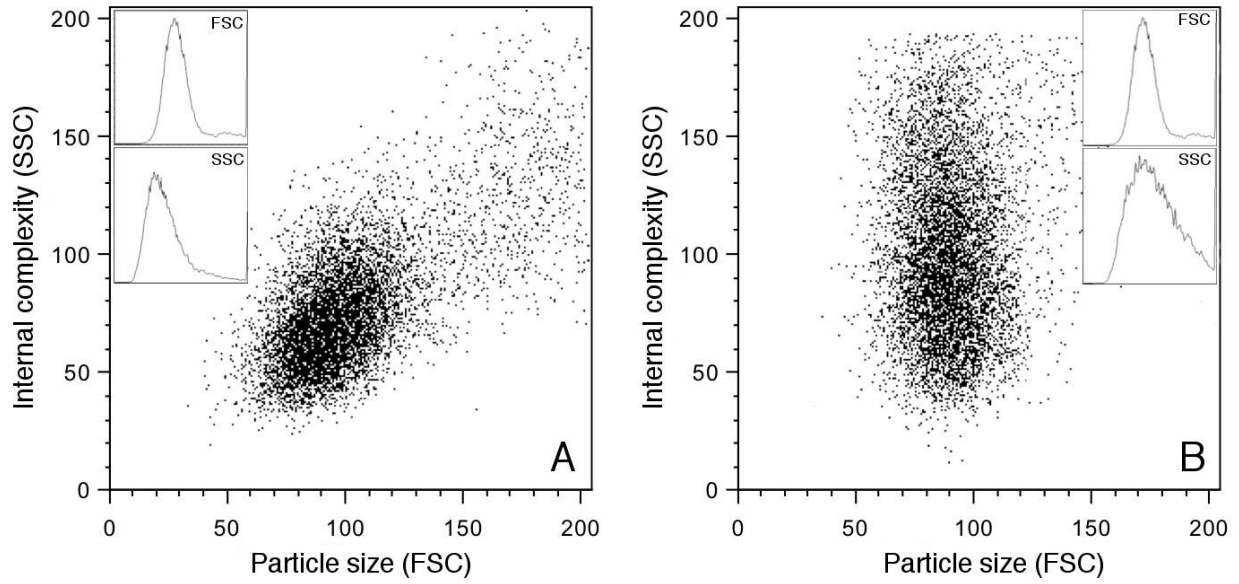


FIGURE 6.5 – Flow cytometer bivariate plots showing distributions of particle size (FSC) *vs* internal complexity (SSC) of fresh Hcs of *S. officinalis*. Insets representing histogram of both variables. (A) Typical cuttlefish dot-plot; (B) Dot-plot showing wide internal complexity (SSC) distribution sometimes observed.

6.3.4.2 Phagocytosis experiments

6.3.4.3 Time and temperature

Both phagocytosis parameters (i.e. percentage of phagocytic Hcs and quantity of ingested beads) appeared time-dependent at all temperatures tested (Fig. 6.6).

After 30 min, 35.5 ± 8.1 , 40.1 ± 6.6 , and 41.7 ± 9.7 % of cells were phagocytic at 4, 15 and 25°C, respectively, subsequently reaching 63.3 ± 7.2 , 70.6 ± 10.9 and 69.8 ± 12.0 % after 180 min (Fig. 6.6A). These phagocytic percentages are consistent with previous observations of Hcs in *O. vulgaris* and *E. cirrhosa* where 50 and 70 % of phagocytic cells were reported, respectively (Malham *et al.*, 1997; Rodríguez-Domínguez *et al.*, 2006). In contrast, a lower phagocytic percentage (≤ 13 %) was recently reported for *O. vulgaris* Hcs after 120 min incubation at 15°C (Castellanos-Martínez *et al.*, 2014). The filtered seawater used as media during this *in vitro* experiment may account for this lower rate. Overall, our results are among the highest phagocytic percentages reported among mollusks, regardless of experimental conditions (e.g. Carballal *et al.*, 1997b; Cima *et al.*, 2000; Di *et al.*, 2013; Donaghy et Volety, 2011; Donaghy *et al.*, 2010, 2009a; Gorbushin et Iakovleva, 2007; Hong

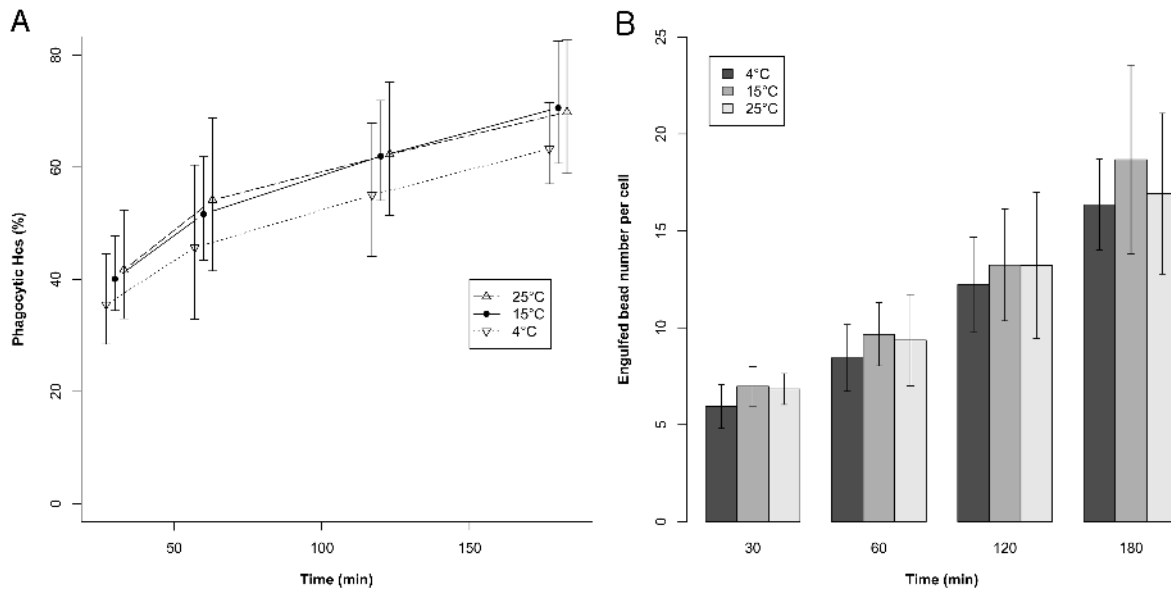


FIGURE 6.6 – Graphs representing evolution of phagocytic parameters function of time (30, 60, 120 and 180 min) at three temperatures (4, 15 and 25°C) ($N = 5$); (A) Phagocytic hemocyte percentages and (B) engulfed bead number.

et al., 2013; Jauzein *et al.*, 2013; Nakayama *et al.*, 1997; Ordas *et al.*, 1999; Prado-Alvarez *et al.*, 2012; Travers *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012; Wootton et Pipe, 2003; Xue *et al.*, 2001).

The time-dependent evolution of phagocytosis measured in our study is consistent with previous findings on Hcs of mollusk bivalves (Canesi *et al.*, 2002; Cima *et al.*, 2000; Donaghy et Volety, 2011; Hong *et al.*, 2013; Ordas *et al.*, 1999) and gastropods (Adema *et al.*, 1991; Donaghy *et al.*, 2010; Travers *et al.*, 2008), but also crustacean (Raman *et al.*, 2008) and fish blood cells (Harford *et al.*, 2006). Within cephalopods, Malham *et al.* (1997) showed similar evolution on *E. cirrhosa* Hcs, whereas Rodríguez-Domínguez *et al.* (2006) reported constant *O. vulgaris* Hc phagocytic percentages from 45 to 120 min incubation at 22°C.

Notably, temperature sensitivity appears species-specific in cephalopods, as no effects were observed in our study, whereas negative effects of low temperature (4-10°C) were reported on Hc phagocytosis rate in *O. vulgaris* (Rodríguez-Domínguez *et al.*, 2006), and *E. cirrhosa* (Malham *et al.*, 1997). Although temperatures used were extremes and out of the thermal window of 15°C-acclimated cuttlefish (Melzner *et al.*, 2007b) (25°C - inducing anaerobic metabolism, and 4°C - a lethal temperature (Richard, 1971)), no significant effects on phagocytosis parameters were found in our study. This low effect of temperature on Hc phagocytosis ability is consistent with the eurythermy of *S. officinalis*. The quantity of ingested

beads measured by FCM evolved in similar ways as the percentage of phagocytic Hcs. Mean quantity of beads in Hcs increased during the entire experiment from 6.0 ± 1.1 , 7.0 ± 1.0 and 6.8 ± 0.8 beads/cell after 30 min to 16.4 ± 2.4 , 18.7 ± 4.9 and 16.9 ± 4.1 beads/cell after 180 min at 4, 15 and 25°C, respectively (Fig. 6.6B). Concurrent TEM observations confirmed the number of ingested beads registered by FCM (Fig. 6.7A) and visually demonstrated the engulfment process with (1) Hc-bead adhesion, (2) bead internalization by almost continuous close contact between membrane and particle, and (3) closing phagosome (Fig. 6.7B-C). Occasionally, lysosomal fusion with phagosome was also observed (Fig. 6.7D).

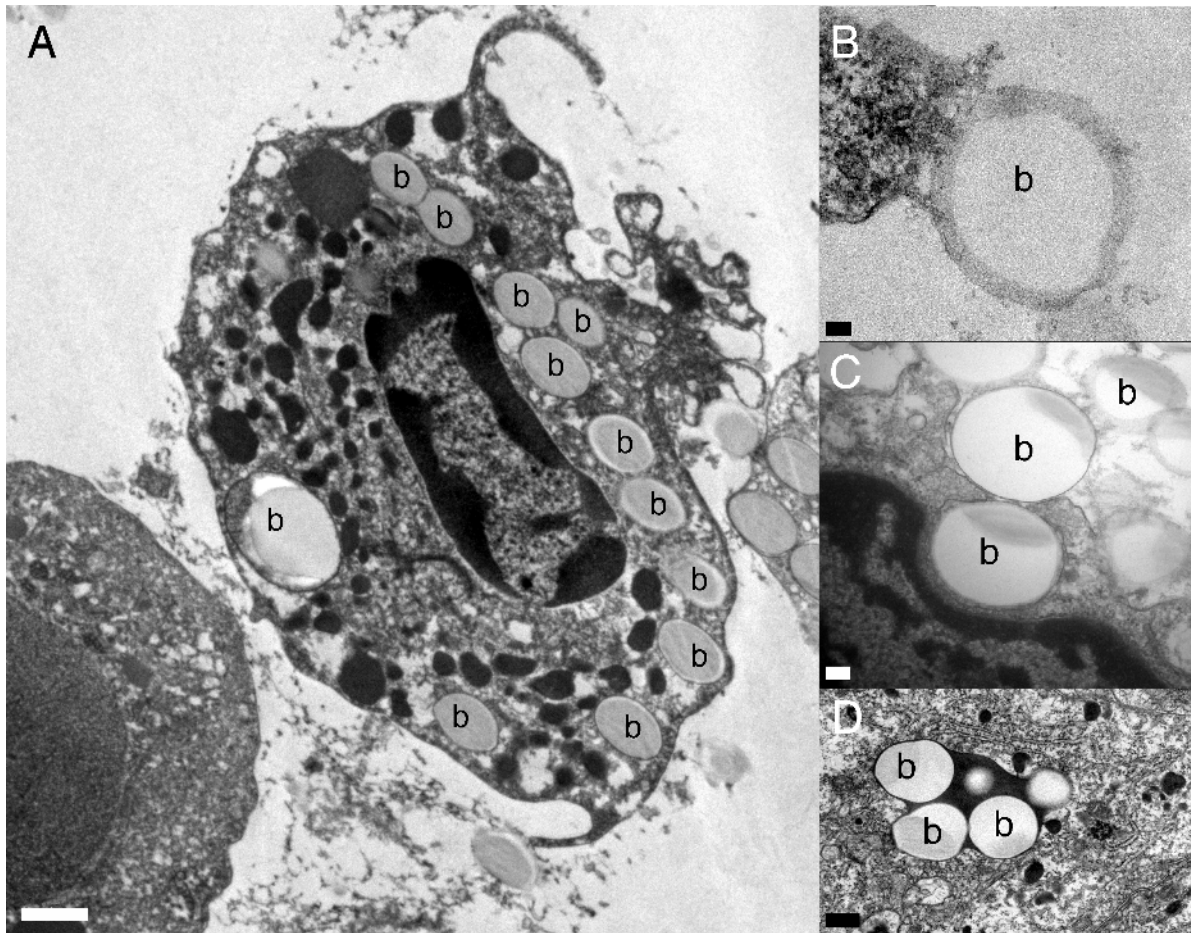


FIGURE 6.7 – Transmission electron micrographs of *S. officinalis* hemocyte. (A) Phagocytic hemocyte presenting several engulfed $1\ \mu\text{m}$ latex beads (b). Bar : $1\ \mu\text{m}$. Sequential events of the internalization of beads (B-D) ; (B) hemocyte-bead adhesion. Bar : $0.1\ \mu\text{m}$; (C) bead engulfment. Bar : $0.2\ \mu\text{m}$; and (D) fusion between phagosomal and lysosomal compartments. Bar : $0.5\ \mu\text{m}$.

Our phagocytosis assay revealed similar rates of bead engulfment as those found in *O. vulgaris* (Rodríguez-Domínguez *et al.*, 2006), but higher rates than in the mollusk bivalve

Perna viridis and gastropods *Lymnaea stagnalis*, *Haliothis discus discus* and *Turbo cornutus* (Adema *et al.*, 1991; Donaghy et Volety, 2011; Donaghy *et al.*, 2010), highlighting higher engulfment capacity of cephalopod Hcs. Nevertheless, such differences could be explained by the high number of beads per cell used in our study (1:100) compared to those of previous ones ($\leq 1:25$).

6.3.4.4 Opsonization assay

As observed under FCM, opsonization experiments differently affected Hc phagocytosis percentage and engulfed bead number. While phagocytosis occurred without incubation of Hcs or beads in plasma, an increase in ingested bead number occurred after incubation in 1 or 10 % plasma ($p=0.008$ and 0.045 , respectively) (Fig. 6.8). In contrast, incubation of beads and Hcs in 50 % plasma led to a decrease of phagocytosis percentage ($p=0.04$).

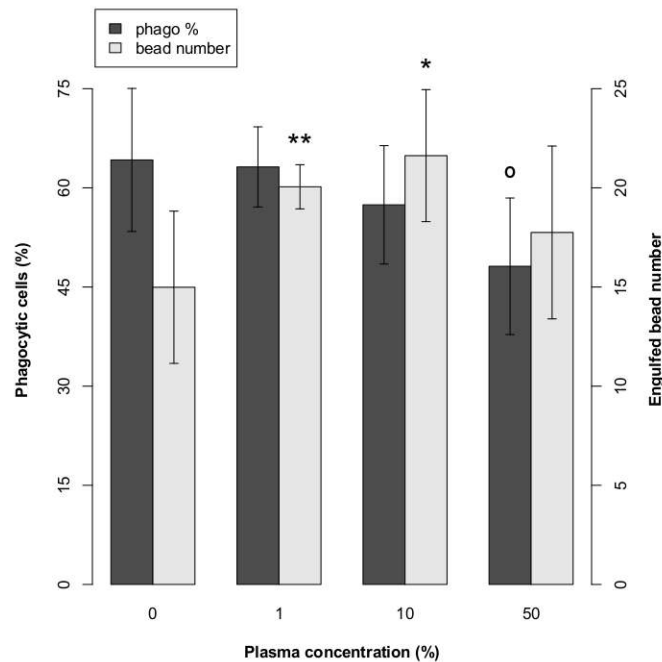


FIGURE 6.8 – Graph representing phagocytic hemocyte percentage and mean engulfed bead number of *S. officinalis* hemocytes ($N \geq 4$; 2h incubation at 15°C) function of plasma concentration (%) treatments. Statistically significant differences were made against control (0% plasma concentration) at each plasma concentration for phagocytic cell percentage (°) and engulfed bead number (*); * and ° $p<0.05$; ** $p<0.01$.

TEM observations of phagocytosis conducted with plasma revealed a bead-coating by Hcy-like molecules (Fig. 6.9A-B) as previously suggested in cephalopods (Beuerlein *et al.*,

2002b; Malham *et al.*, 1997; Stuart, 1968). This observation could explain Hcy presence in Hc electron-lucent vesicles. Moreover, Hcy-like molecule presence in bridges between beads (Fig. 6.9C) suggested an agglutinating function, consistent with the increasing engulfed bead number observed at 1 and 10 % plasma (Fig. 6.8). Such findings are consistent with a recent *Octopus maya* plasma agglutinin (OmA) characterization, showing homology between OmA subunits and one functional unit of Hcy from *Octopus dofleini* (Alpuche *et al.*, 2010). Moreover, the bead engulfment increased after as low as 1 % plasma addition, underlying the high concentration of the molecule in charge of this process, and Hcy is known to represent more than 90 % of cephalopod plasma proteins (D’Aniello *et al.*, 1986; Ghiretti, 1966; Malham *et al.*, 1997; Mangold et Bidder, 1989a). Such agglutinating function could also explain the phagocytic percentage decrease occurring with 50 % plasma. Indeed, important bead agglutination might limit the availability of these particles for phagocytic process by increasing the size of particles to engulf. Ballarin *et al.* (1994) described a similar phagocytic decrease resulting from agglutinins in the ascidian *Botryllus schlosseri* after yeast pre-incubation in high plasma concentrations (≥ 50 %). In cephalopods, this Hcy property could explain the decrease of phagocytosis by *O. vulgaris* Hcs measured after pre-incubation of zymosan in 100 % plasma (Rodríguez-Domínguez *et al.*, 2006), because of zymosan particle (about 3 μm) aggregation. Malham *et al.* (1997) and Ballarin *et al.* (1994) highlighted also the importance of phagocytosis duration in this type of study, as phagocytosis enhancement after plasma incubation mainly occurred after 30 min. This is consistent with our study and that of Rodríguez-Domínguez *et al.* (2006) which report plasma-dependent phagocytosis decrease after 120 and 90 min of phagocytosis duration, respectively. Our results demonstrate the presence of a Hcy-like coating molecule with agglutinin function in *S. officinalis* plasma, which can modulate phagocytosis according to (1) pre-incubation plasma concentration and (2) phagocytosis duration.

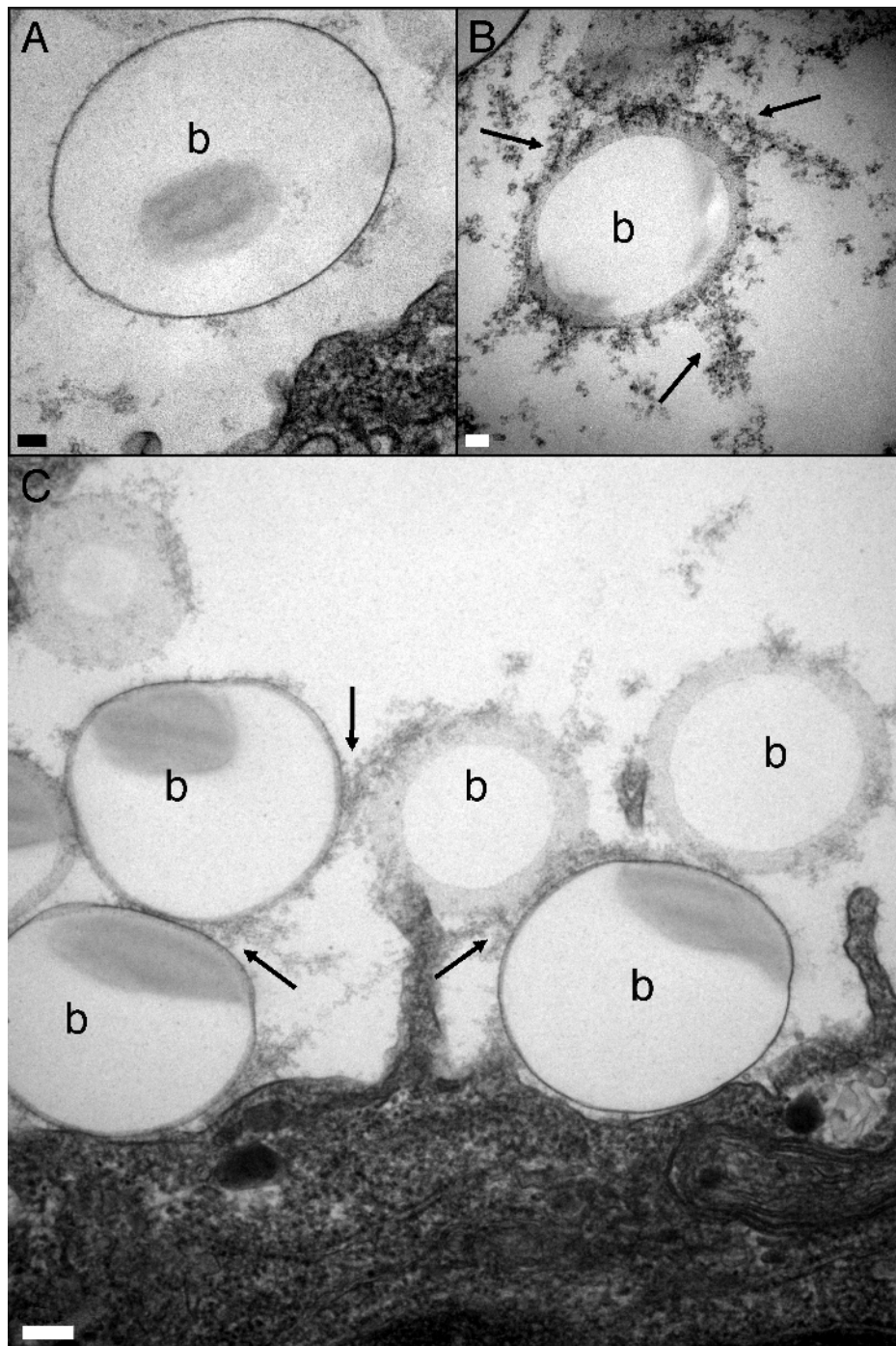


FIGURE 6.9 – Transmission electron micrographs of 1 μm latex beads (b). (A) One bead after incubation in medium without plasma add; (B) One bead after incubation in plasma presenting important coating by hemocyanin-like molecules (arrow). Bars : 100 nm. (C) Apparent hemocyanin-like molecule implication in bead aggregation (arrow). Bar : 200 nm.

6.4 Conclusions

Our study demonstrates, using FCM, light- and electron-microscopy, that a single granulocyte population with variable internal complexity circulates in the hemolymph of *S. officinalis*, as in other cephalopods. Acid phosphatase, lysozyme, and for the first time in cephalopods proPO system enzymes were detected in Hcs, but not in plasma (Malham, 1996; Grimaldi *et al.*, 2013). These cells were able to recognize and incorporate foreign material at high rate independently of temperature and without need for plasma. Concurrent TEM and FCM analysis suggested a role for Hcy in foreign particle coating probably associated with its hypothesized agglutinin function. These data provide important information to understand the Hc-mediated immunity in the common cuttlefish, and a useful background for future studies of cephalopod Hcs.

Acknowledgments

This work was supported by the European, Interreg IV-A CHRONEXPO project. This study was partly conducted in the CREC (Centre de Recherche en Environnement Côtier) at Luc-sur-mer (Normandie, France). The authors thank Beatrice Adeline for technical support in cytological analysis and Dr Pierre Le Pabic for advice and help in English.

Chapitre 7

Développement et utilisation des
hémocytes de seiche en conditions *in*
vitro pour des études en écotoxicologie

7.1 Introduction

Préconisée par la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (2000/60/EC), l'approche *in vitro* est une alternative intéressante à l'utilisation d'animaux entiers. En effet, elle permet de cibler spécifiquement les mécanismes cellulaires impactés par divers substances ou stimuli, de limiter le nombre d'animaux utilisés, et enfin de réduire les coûts et les temps d'expérimentation (Ní Shúilleabháin *et al.*, 2006; Schirmer, 2006). Les cultures primaires d'hémocytes de mollusques, cellules circulant dans le plasma et acteurs clés de la réponse immunitaire, ont été développées afin d'étudier leur fonctionnement ainsi que leur réaction vis-à-vis de composés toxiques. A ce jour, cet outil a été mis en œuvre uniquement chez quelques espèces de bivalves et gastéropodes d'intérêt économique (e.g. Lebel *et al.*, 1996; Olabarrieta *et al.*, 2001; Thiagarajan *et al.*, 2006; Sauvé *et al.*, 2002; Cima *et al.*, 1999; Brousseau *et al.*, 2000; Gómez-Mendikute et Cajaraville, 2003). Pourtant, la singularité du système circulatoire des céphalopodes, qui est clos, pourvu de plusieurs cœurs et d'une population d'hémocytes plurifonctionnels, présente un intérêt indéniable d'un point de vue évolutif et est susceptible de modifier les réactions des cellules circulantes vis-à-vis de composés extérieurs (Malham, 1996; King *et al.*, 2005; Rodríguez-Domínguez *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 2012). Afin d'évaluer la viabilité des cellules de mollusques en conditions *in vitro*, l'utilisation de sels de tétrazolium est courante (e.g. Latire *et al.*, 2012; Auzoux-Bordenave *et al.*, 2007; Domart-Coulon *et al.*, 1994). Ces tests permettent de mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale présente dans les cellules vivantes. Ils ont été utilisés dans cette étude afin de déterminer les paramètres (i.e. température, temps et milieu de culture) les plus adaptés à la maintenance des hémocytes de seiche. La caractérisation des hémocytes de *S. officinalis* réalisée au cours de ce travail de thèse a permis de mettre en évidence une population majeure de granulocytes présentant une capacité de phagocytose importante. Par ailleurs, la production de ROS par des hémocytes de céphalopodes autres que les octopodes *E. cirrhosa* et *O. vulgaris* (Malham *et al.*, 2002; Castellanos-Martínez *et al.*, 2014) n'ayant jamais été décrite, nous nous sommes également intéressés à ce paramètre.

Les hémocytes ayant été caractérisés, la mise en place de leur culture primaire s'inscrit dans une démarche de développement d'outils permettant d'étudier l'impact de contaminants sur le système immunitaire de *S. officinalis* et plus spécifiquement sur sa composante cellulaire. L'objectif de ce travail a été de 1) déterminer des paramètres de culture permettant

la maintenance *in vitro* de ces cellules, et 2) étudier l'effet de 2 métaux, le zinc (Zn) et le cadmium (Cd), sur des paramètres cellulaires classiquement analysés chez les hémocytes (i.e. la phagocytose et la production de ROS).

7.2 Matériels et méthodes

7.2.1 Prélèvement d'hémolymph et mise en culture

Les prélèvements d'hémolymph ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (partie 6.2.2). Le prélèvement a donc été fait au niveau des veines antérieures du manteau à l'aide d'une seringue, sur des animaux préalablement anesthésiés. L'hémolymph a ensuite été diluée de moitié dans une solution stérile d'Alsever et conservée dans la glace, permettant ainsi de diminuer l'aggrégation cellulaire. La concentration cellulaire a ensuite été déterminée sur cellule de Thoma et les hémocytes répartis dans les plaques de culture. En fonction des tests à réaliser, les hémocytes ont été placés en plaque 12 puits à raison de 200 000 cellules par puits pour étudier la viabilité, ou en plaque 6 puits à raison d'1 000 000 de cellules par puits pour les analyses en cytométrie en flux (phagocytose et ROS). Dans les deux cas, un volume du mélange hémolymph/Alsever correspondant au nombre de cellules désiré a été additionné de trois volumes d'eau de mer artificielle stérile afin de diluer l'Alsever et de permettre aux cellules d'adhérer. Après 1h d'incubation à 17°C, le surnageant couvrant les cellules a été remplacé par du milieu de culture à raison de 300 μ L et 1 mL pour les plaques de 12 et 6 puits, respectivement. Ce milieu de culture a ensuite été renouvelé tous les jours pour éviter d'éventuelles carences et ôter les composés toxiques excrétés par les cellules.

7.2.2 Effet des paramètres de culture sur la viabilité

Afin d'étudier l'influence de la température sur le maintien des hémocytes de seiche, ces cellules ont été mises en culture à deux températures : 15 et 17°C. L'influence de trois milieux de culture a également été testée: le Hank's 199 modifié selon Lebel *et al.* (1996) (14.61 g L⁻¹ NaCl, 3.01 g L⁻¹ MgSO₄, 0.75 g L⁻¹ KCl, 0.37 g L⁻¹ CaCl₂.2H₂O et 2.6 g L⁻¹ Hepes, pH 7.4), car il permet la survie d'hémocytes d'ormeau pendant environ 1 semaine (Latire *et al.*,

2012); le Leibovitz L-15 modifié selon Domart-Coulon *et al.* (1994) (20.2 g L⁻¹ NaCl, 0.54 g L⁻¹ KCl, 0.6 g L⁻¹ CaCl₂, 1 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O et 3.9 g L⁻¹ MgCl₂·6H₂O, pH 7.6) car il est couramment utilisé pour la culture primaire de divers types cellulaires de mollusques marins, dont les céphalopodes (e.g. Auzoux-Bordenave *et al.*, 2007; Le Bihan *et al.*, 2004; Domart-Coulon *et al.*, 1994; Faucet *et al.*, 2003); et le Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) modifié selon Pichon et Boucher-Rodoni (2007) (21.6 g L⁻¹ NaCl, 0.36 g L⁻¹ KCl, 1.2 g L⁻¹ CaCl₂·6H₂O, 10.2 g L⁻¹ MgCl₂·6H₂O, 1 g L⁻¹ Na₂SO₄, 4.76 g L⁻¹ Hepes pH 7.8, dilué de moitié dans de l'eau de mer artificielle stérile) car il a montré des résultats intéressants pour la maintenance de divers types cellulaires de céphalopodes (Pernice *et al.*, 2007; Pichon et Boucher-Rodoni, 2007). Chaque milieu a été supplémenté extemporanément en antibiotiques (100 mg L⁻¹ streptomycine, 60 mg L⁻¹ pénicilline) ainsi qu'en L-glutamine (280 mg L⁻¹). L'évaluation de la viabilité cellulaire a été réalisée à l'aide du test MTT (ou bromure de 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium). Ce test mesure la réduction du MTT par l'enzyme succinate déshydrogénase mitochondriale qui est présente seulement dans les cellules vivantes. Le précipité formé, le formazan, est ensuite quantifié après solubilisation (Domart-Coulon *et al.*, 1994). Ainsi, 30 µL de solution stock de MTT (5 mg MTT mL⁻¹ PBS) ont été introduits dans chaque puits de culture (10 % v:v). Après 24h d'incubation, 300 µL d'isopropanol acidifié (0.04 M HCl) ont été ajoutés dans chaque puits afin de dissoudre le formazan nouvellement formé. La quantification du signal a été réalisée après 30 minutes d'agitation en mesurant l'absorbance à 570 nm (630 nm en référence). Ce test a été mené après 24, 48 et 72h de culture. Afin de comparer les effets de la température et du milieu de culture, les résultats ont été exprimés en pourcentage de la valeur maximale mesurée de chaque réplica ($N = 4$).

7.2.3 Effet des paramètres de culture sur la viabilité

Les concentrations testées étaient de 1, 10, 50, 100 et 1000 µg Cd L⁻¹ (+ contrôle), et de 10, 100, 1000, 5000 et 10 000 µg Zn L⁻¹ (+ contrôle). Toutes ces solutions ont été préparées extemporanément dans du milieu de culture stérile L-15, à partir de concentrations stocks à 163,08 et 2084,1 mg L⁻¹ de CdCl₂ et de ZnCl₂, correspondant à des concentrations de 100 et 1000 mg L⁻¹ de Cd et Zn, respectivement. L'impact de ces concentrations en Zn et en Cd sur la phagocytose et la production de ROS a été testé sur des cellules exposées 24h aux

contaminants et provenant de cinq animaux.

7.2.3.1 La phagocytose

L'évaluation de la phagocytose a été réalisée comme décrit précédemment (partie 6.2.6.2). Après 24h d'exposition, les billes ont été ajoutées à raison de 100 billes/hémocyte et laissées à incuber 2 h. Les cellules ont ensuite été rincées puis scrappées, centrifugées et fixées comme décrit précédemment (partie 6.2.6.1).

7.2.3.2 La production de ROS

La production de ROS par les hémocytes de *S. officinalis* a été étudiée en ajoutant 10 μ M d'une sonde non-fluorescente (le 2',7', dichlorofluoresceine diacétate ou DCFH-DA, Sigma) au milieu de culture après exposition (Lambert *et al.*, 2003). Cette molécule est incorporée à l'intérieur des cellules et devient fluorescente en présence d'H₂O₂. Après 1 h d'incubation, les cellules ont été rincées puis scrappées, centrifugées et fixées comme décrit précédemment (partie 6.2.6.1).

7.2.4 Analyse des données

Afin de mettre en évidence l'influence des paramètres température et milieu de culture sur la viabilité des hémocytes, une Anova à 2 facteurs a été réalisée, en accord avec les conditions d'application de ce test (normalité des résidus et homogénéité des variances). Puis, des comparaisons multiples ont été effectuées à l'aide de la méthode des contrastes afin de déterminer les différences entre les modalités des facteurs. L'influence du temps de culture sur la viabilité a également été testée à l'aide d'une Anova à 1 facteur suivie de comparaisons deux à deux corrigées et adaptées aux petits effectifs ($N < 30$). Concernant les analyses en cytométrie en flux suivant les expositions aux métaux (phagocytose et ROS), la différence entre la valeur de chaque lot exposé et 100 (valeur contrôle) a été évaluée par un test-*t* de Student suivant les conditions d'application de ce test (normalité).

7.3 Résultats et discussion

7.3.1 Effet du milieu de culture et de la température

L'analyse de la viabilité des cellules en fonction des différents milieux de culture testés a mis en évidence que le milieu de Hank's est le moins adapté à la culture d'hémocytes de seiche (p -values < 0,001 ; Fig. 7.1), tandis que Le DMEM et le L-15 présentent des résultats similaires. Les températures de maintenance testées n'ont pas montré de différences significatives. L'étude de l'évolution de la viabilité en fonction du temps pour les média L-15 et DMEM n'a pas mis en évidence de différence significative entre 24 et 72h de culture. Cependant, il est important de noter que les valeurs de viabilité, très proches entre 24 et 48h de culture (p -value = 0,897), diminuent à 72h (p -value = 0,087) et atteignent le même niveau que le milieu Hank's. Cette absence de significativité est probablement due à la petite taille des effectifs utilisés dans cette étude, associée à la variabilité importante de la viabilité des hémocytes. Compte tenu de ces observations, et afin de travailler dans les meilleures conditions, nous avons choisi de réaliser nos expositions dans du L-15 pendant 24h à 15°C (valeurs de viabilité élevées et variabilités moindres à cette température).

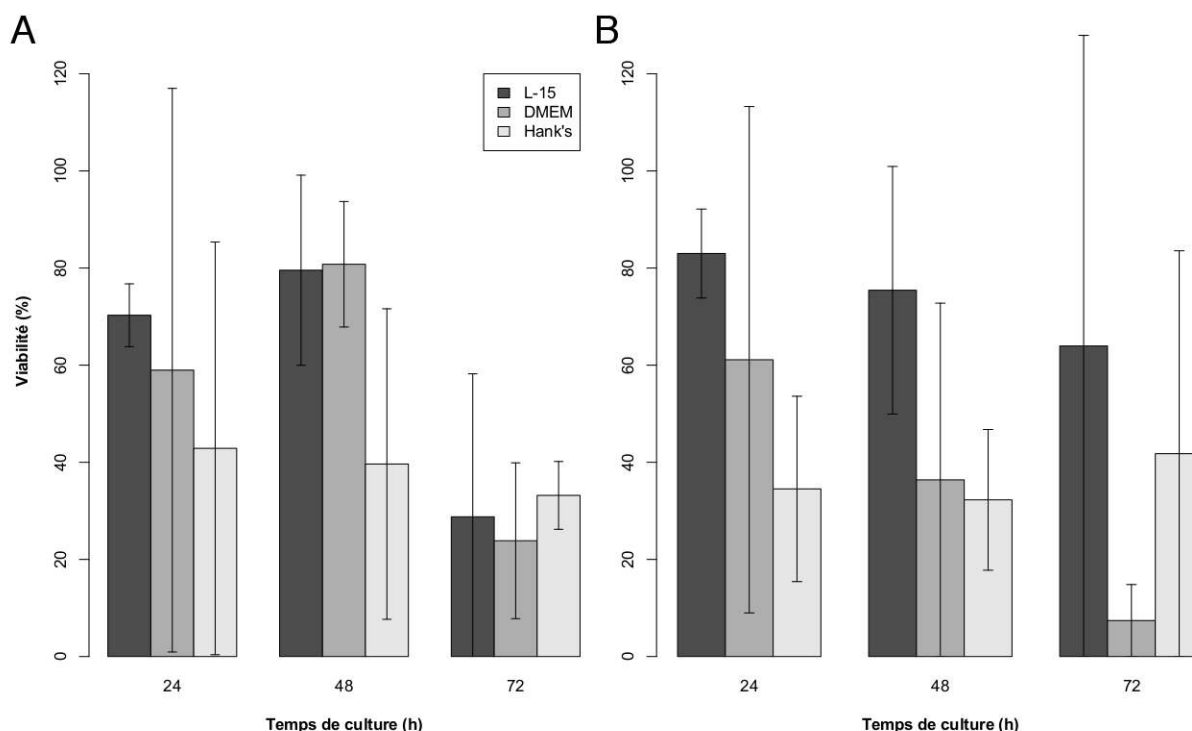


FIGURE 7.1 – Evolution de la viabilité (moyenne $\pm$ SD ; %) des hémocytes de *S. officinalis* maintenus dans 3 media de culture (L-15, DMEM et Hank's) à 15°C (A) et 17°C (B).

La stabilité des valeurs de viabilité observée pendant les 48 premières heures est cohérente avec les données rapportées pour les hémocytes de la plupart des mollusques marins dont la culture a été expérimentée (Yoshino *et al.*, 2013; Rinkevich, 2005). Les résultats obtenus au cours de cette étude fournissent les pré-requis nécessaires à de futurs travaux visant à développer la culture primaire de ce type cellulaire chez la seiche.

7.3.2 Effet du Cd et du Zn sur la phagocytose et la production de ROS

La phagocytose des hémocytes est un processus clé du système immunitaire des invertébrés qui précède la destruction intracellulaire du pathogène (Olabarrieta *et al.*, 2001). Les expositions de 24h réalisées au cours de cette étude ont mis en évidence l'effet négatif de 1 mg L⁻¹ de Cd sur la capacité à phagocyter des hémocytes de seiche, qui se traduit par une diminution de 10 % par rapport au contrôle (Fig. 7.2). Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par Latire *et al.* (2012) qui ont travaillé sur les effets d'une exposition au Cd des hémocytes du mollusque gastéropode *Halotis tuberculata*, pendant 10 jours. En effet, cette étude rapporte une diminution de la phagocytose à partir de concentrations supérieures à 300 µg L⁻¹. D'autres travaux menés sur les bivalves décrivent cette propriété inhibitrice du Cd sur la phagocytose des hémocytes (Brousseau *et al.*, 2000; Sauvé *et al.*, 2002; Auffret *et al.*, 2002). Par ailleurs, plusieurs études *in vitro* ont mis en évidence des modifications morphologiques et fonctionnelles potentiellement responsables d'une diminution de ce paramètre (Fagotti *et al.*, 1996; Beckmann *et al.*, 1992; Cima *et al.*, 1999; Kaloyianni *et al.*, 2006; Matozzo *et al.*, 2001; Latire *et al.*, 2012; Mottin *et al.*, 2010). La principale hypothèse avancée suggère que l'élément métallique induit une désorganisation du cytosquelette de la cellule, inhibant sa mobilité et donc sa capacité à phagocyter. Cette désorganisation peut être directe, par l'interaction des métaux avec les protéines structurales du cytosquelette de la cellule, ou indirecte par la perturbation de l'homéostasie calcique de la cellule (Matozzo *et al.*, 2001). L'exposition au Zn a, quant à elle, induit une augmentation de la phagocytose à la concentration de 100 µg L⁻¹. Un effet similaire du Zn a déjà été rapporté sur des hémocytes de bivalves (Cheng et Sullivan, 1984; Sauvé *et al.*, 2002) ainsi que sur des cellules circulantes d'insectes (Filipiak *et al.*, 2010), mettant en évidence une stimulation de ce processus aux faibles doses testées. Notre observation semble cohérente avec le rôle du Zn en tant qu'élément essentiel

et nécessaire au maintien de la structure des membranes ainsi qu'à leur fonctionnement, et souligne un potentiel rôle de cet élément trace dans la réponse immunitaire cellulaire de la seiche (Chvapil, 1973; Bettger et O'Dell, 1981).

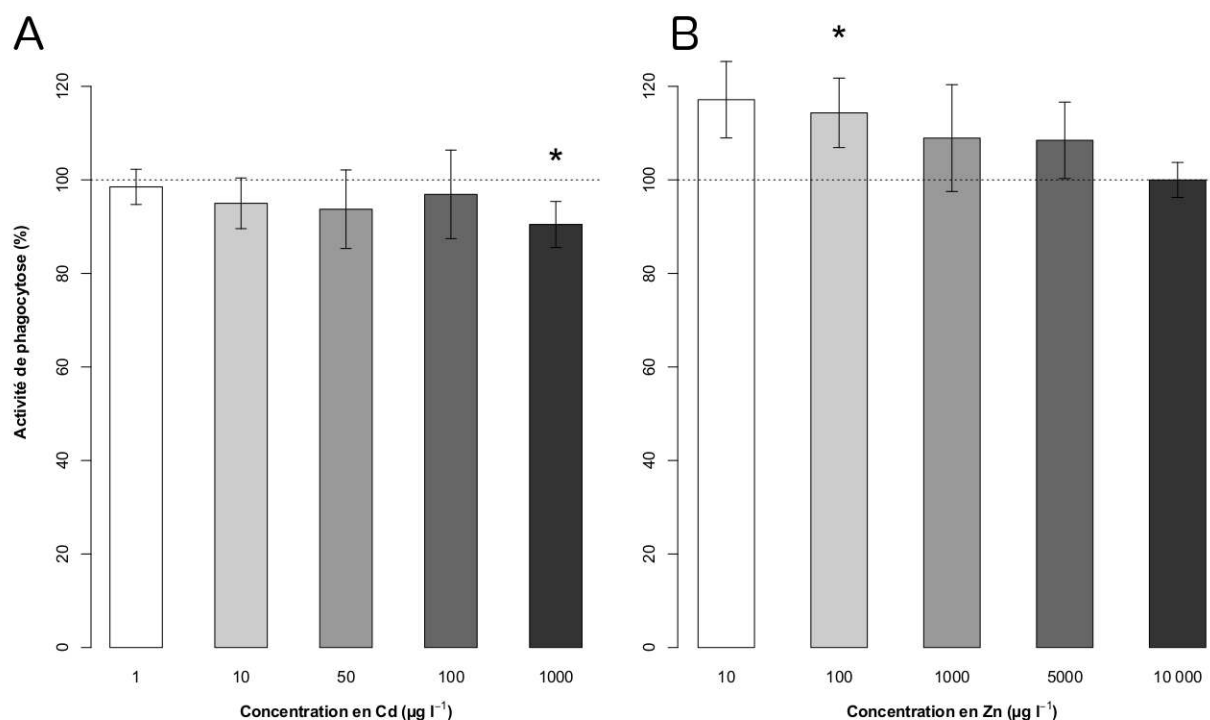


FIGURE 7.2 – Effet de 24h d'exposition des hémocytes de *S. officinalis* à différentes concentrations métalliques sur la capacité de phagocytose (moyenne $\pm$ SD ; %) ; (A) exposition au Cd ; (B) exposition au Zn. Les astérisques indiquent les différences avec la valeur contrôle de 100 % (pointillés) ; * $p < 0.05$.

La production de ROS, qui permet à la cellule de détruire, au moins partiellement, la particule phagocytée, a été augmentée par rapport au contrôle seulement par l'exposition au Cd (Fig. 7.3). Cette augmentation a été induite à partir de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ jusqu'à la concentration maximale testée d' 1 mg L^{-1} pour une production de ROS supplémentaire allant de 17 % à plus de 50 %. Ces observations sont cohérentes avec la capacité de ce métal à augmenter la production de ROS ainsi qu'à perturber l'efficacité du système antioxydant (Stohs et Bagchi, 1995; Koutsogiannaki *et al.*, 2006; Nzengue *et al.*, 2008; Company *et al.*, 2010; Giguère *et al.*, 2003; Katsumiti *et al.*, 2014). Cette stimulation de la production de ROS par des éléments métalliques a déjà été observée dans les hémocytes du gastéropode *H. tuberculata* exposés au Cd (Latire *et al.*, 2012), mais également dans les hémocytes du bivalve *Mytilus galloprovincialis* exposés au Cu et au Zn (Gómez-Mendikute et Cajaraville, 2003; Kaloyianni *et al.*, 2006).

Dans des conditions proches de celles utilisées dans notre étude, Latire *et al.* (2012) ont rapporté cette augmentation à une concentration de $3 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ après 10 jours d'exposition. En tenant compte du temps d'exposition, cela suggère une sensibilité supérieure des hémocytes de seiche vis-à-vis du Cd. Cependant, la sensibilité de différents organismes pouvant varier en fonction de l'élément étudié (Sauvé *et al.*, 2002; Brousseau *et al.*, 2000; Cheng et Sullivan, 1984), cette hypothèse ne peut être étendue aux autres éléments métalliques. Par exemple, Mottin *et al.* (2010) ont montré une diminution de la production de ROS des hémocytes d'*H. tuberculata* après 24h d'exposition à 6.5 mg Zn L^{-1} , ce qui n'a pas été observé dans notre étude (résultats non présentés). L'absence de stimulation de la production de ROS par le Zn peut être expliquée par l'organisation de ses couches électroniques qui ne lui permettent pas de participer aux réactions d'oxydoréduction à l'origine de la production de ROS (Chvapil, 1973; McCall *et al.*, 2000; Stohs et Bagchi, 1995; Alberts *et al.*, 1998).

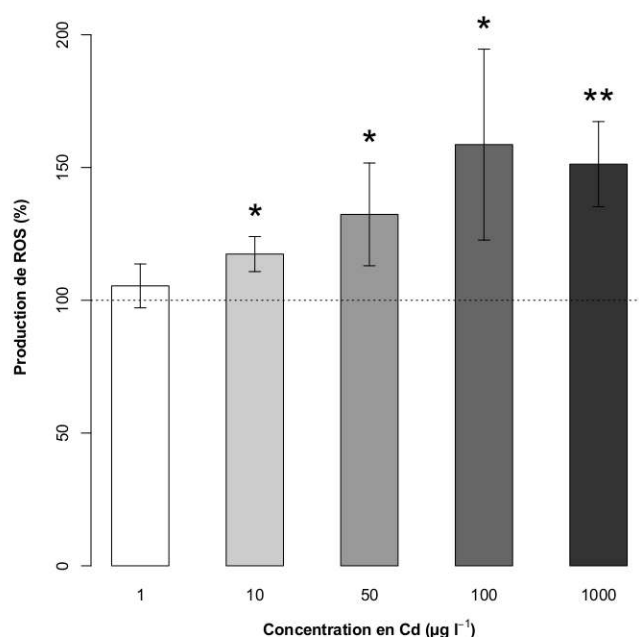


FIGURE 7.3 – Effet de 24h d'exposition des hémocytes de *S. officinalis* à différentes concentrations en Cd sur la production de ROS (moyenne $\pm$ SD ; %). Les astérisques indiquent les différences avec la valeur contrôle de 100 % (pointillés) ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Ce travail a mis en évidence pour la première fois une production de ROS par des hémocytes de céphalopodes de la famille des Sepiidae. Outre la démonstration de la capacité de ces cellules à produire ces composés, ce test suggère le maintien de leurs capacités fonctionnelles dans nos conditions de culture. Cette étude avait pour objectif la mise en place d'un protocole

de culture d'hémocytes de seiche permettant d'étudier spécifiquement cet acteur principal de la défense immunitaire chez un céphalopode. Les tests de toxicité réalisés ensuite ont permis de valider ces conditions de culture et d'avoir un premier aperçu de la sensibilité des cellules vis-à-vis de contaminants tels que le Zn et le Cd, dont les effets sont partiellement connus. Cependant, l'utilisation de tests standardisés chez d'autres espèces de mollusques permettrait de mieux appréhender la sensibilité de ce type cellulaire. Enfin, l'utilisation d'autres sondes adaptées aux études en cytométrie en flux (e.g. LysoTracker[®] en tant que marqueur des organites acides) associée à la microscopie photonique et électronique permettrait d'améliorer nos connaissances relatives à la physiologie et à la sensibilité aux métaux des hémocytes de céphalopode.

Cinquième partie

Conclusion générale - perspectives

Chapitre 8

Conclusion générale - perspectives

L'étude de l'incorporation des métaux dans l'oeuf de seiche ainsi que leurs potentiels effets toxiques ont déjà fait l'objet de travaux, mettant en évidence des capacités protectrices de l'embryon par la capsule de l'oeuf pendant les deux tiers du développement, puis une diminution de cette propriété en raison de modifications structurales de cette capsule. Ainsi, des éléments tel que l'Ag, le Zn, le Hg, le Mn, le Co, le Cd et le Cs s'accumulent dans l'embryon à la fin de son développement (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2008b, 2009c, 2010b). Il a par la suite été montré que l'Ag, le Cd et le Cu peuvent perturber les activités d'enzymes impliquées dans la digestion du vitellus (cathepsines et phosphatases acides) et dans l'immunité (POs) de l'embryon, et diminuer leur poids à la naissance à des concentrations proches des teneurs environnementales (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2009d, 2010a). Ces études ont permis de mettre en évidence les capacités d'accumulation et la sensibilité du stade embryonnaire de la seiche vis-à-vis de certains éléments traces, et ont soulevé la question de la gestion de ces éléments par le stade juvénile lors de sa vie côtière (i.e. un à deux mois post-éclosion).

C'est en effet au cours des premières semaines post-éclosion que la physiologie de l'animal évolue vers une physiologie « adulte », notamment marquée par la maturation de la glande digestive (Yim et Boucaud-Camou, 1980). Nos études ont cherché à déterminer un seuil de toxicité (létal/non létal) du Zn sur ce stade de vie, étudier l'accumulation de cet élément et son influence sur l'homéostasie d'autres éléments traces, et enfin, décrire les effets du Zn sur une gamme de marqueurs intégrés (croissance, comportement) et cellulaires (enzymes digestives et immunitaires, marqueurs de processus de détoxification) pendant des périodes d'exposition allant de un à deux mois.

8.1 Effets du Zn sur le stade juvénile de *S. officinalis*

Le suivi de juvéniles de seiche exposés au Zn nous a permis d'estimer les seuils induisant la mortalité et l'accumulation. Les phénomènes de mortalité sont apparus à des concentrations relativement basses en comparaison d'autres mollusques (i.e. $> 200 \mu\text{g L}^{-1}$; Ahsanullah, 1976; Amiard-Triquet *et al.*, 1986; Chan, 1988; D'Silva et Kureishy, 1978; Franco *et al.*, 2006; Devos *et al.*, 2012). Contrairement à la plupart des métaux étudiés au cours des 2 premiers mois post-éclosion (chapitre 4), la concentration en Zn dans l'animal est restée stable (i.e. $88.3 \pm 7.8 \mu\text{g g}^{-1} \text{ dw}$) en conditions environnementales, ce qui suggère une régulation de cet élément à des concentrations faibles (i.e. $< 10 \mu\text{g L}^{-1}$). Cependant, le suivi de l'accumulation en Zn dans le juvénile au cours des 2 mois post-éclosion a montré l'incapacité de ce stade de vie à réguler son accumulation en Zn dissous au moins à partir d'une concentration d'environ $50 \mu\text{g L}^{-1}$.

Ces observations sont cohérentes avec l'apparition précoce de phénomènes de mortalité et soulignent une sensibilité intermédiaire de la seiche juvénile comparée aux seuils de mortalité déterminés chez la plupart des stades adultes de poissons et bivalves marins, qui sont supérieurs (Bengtsson, 1974; Cairns *et al.*, 1982; Ciji et Bijoy Nandan, 2014; Holcombe *et al.*, 1979; Malik *et al.*, 1998; Sinley *et al.*, 1974; Spear, 1981; Ahsanullah, 1976; Amiard-Triquet *et al.*, 1986; Chan, 1988; D'Silva et Kureishy, 1978; Franco *et al.*, 2006; Mottin *et al.*, 2012), et aux seuils induisant des problèmes de développement des stades embryo-larvaires de bivalves et d'échinodermes, qui sont inférieurs (Brereton *et al.*, 1973; Calabrese et Nelson, 1974; Calabrese *et al.*, 1973; Castagna *et al.*, 1981; Fathallah *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 1981; Nadella *et al.*, 2013; Phillips *et al.*, 1998; Tellis *et al.*, 2014; Watling, 1982). Nos études n'ont pas montré de mise en place de processus permettant une régulation de cet élément au cours des deux premiers mois post-éclosion, ce qui suggère que 1) la maturité de la glande digestive n'influe pas sur les capacités d'assimilation de l'animal, et 2) quel que soit son stade de vie, la seiche régule mal son accumulation en Zn par la voie dissoute. Il a déjà été mis en évidence que les demi-vies de rétention du Zn assimilé par la nourriture sont très différentes entre les stades juvénile et adulte (i.e. 173 et 38 jours, respectivement; Bustamante *et al.*, 2002a), tandis que la demi-vie de rétention du Zn assimilé par la voie dissoute n'a été estimée que sur le stade juvénile (i.e. 53 jours). Il serait donc intéressant de déterminer si la demi-vie de rétention du Zn assimilé par la voie dissoute chez l'adulte montre une différence avec le juvé-

TABLE 8.1 – Récapitulatif des effets du Zn sur les différents marqueurs utilisés pour des analyses sur animal entier et sur glande digestive en fonction du temps d'exposition. Légende : **gras** indique les concentrations induisant la mortalité ; bleu et + signifie que le paramètre est augmenté vis-à-vis du contrôle ; rose et - signifie que le paramètre est diminué vis-à-vis du contrôle. Les zones grises indiquent que le marqueur n'a pas été testé à cette période.

Temps d'exposition (semaine)							
	1	2	3	4	5	6	8
<i>Analyse sur animal entier</i>							
Système digestif	Phosphatases acides	+ 108 µg L ⁻¹					
	Cathepsines	- 230 µg L ⁻¹		- 108 µg L ⁻¹			
	Trypsine	- 230 µg L ⁻¹					
Système immunitaire	POs	- 230 µg L ⁻¹					
	[MTs]		- 184 µg L ⁻¹				
	[Zn] totale		+ 53 µg L ⁻¹			+ 184 µg L ⁻¹	+ 53 µg L ⁻¹
Homéostasie des éléments traces	[Mn] totale			- 53 µg L ⁻¹			
	% Ag soluble		+ 53 µg L ⁻¹			+ 184 µg L ⁻¹	+ 53 µg L ⁻¹
	% Cd soluble		+ 53 µg L ⁻¹			+ 184 µg L ⁻¹	+ 53 µg L ⁻¹
	% Cu soluble	+ 184 µg L ⁻¹	+ 53 µg L ⁻¹	+ 53 µg L ⁻¹		+ 184 µg L ⁻¹	+ 53 µg L ⁻¹
Marqueur intégré	% Zn soluble		+ 53 µg L ⁻¹			+ 184 µg L ⁻¹	+ 53 µg L ⁻¹
	Croissance					- 108 µg L ⁻¹	
<i>Analyse sur glande digestive</i>							
Marqueur de détoxication	Comportement		- 184 µg L ⁻¹				
	GST			+ 184 µg L ⁻¹			+ 52 µg L ⁻¹
Marqueur lié au stress oxydatif	SOD				+ 52 µg L ⁻¹		
	CAT			- 184 µg L ⁻¹		- 52 µg L ⁻¹	
	LPO					+ 52 µg L ⁻¹	

nile (ce qui ne semble pas être le cas au vu de nos résultats). Concernant la voie trophique, il serait intéressant d'étudier le lien entre les écarts observés (Bustamante *et al.*, 2002a) et la maturation de la glande digestive, ainsi que de déterminer si la capacité de régulation de cet élément assimilé par cette voie est différente de celle observée dans notre étude (chapitre 4).

Les effets en lien avec cette accumulation sont variables en fonction de la concentration et du temps d'exposition, du stade de développement, ainsi que du marqueur étudié (tableau 8.1). Cependant, les perturbations observées les plus précocement (après une semaine d'exposition) sont l'augmentation des activités phosphatases acides et la diminution des activités POs.

Ces résultats montrent que le juvénile peut être rapidement affecté par l'exposition au Zn aux niveaux digestif et immunitaire. L'activation des phosphatases acides n'a plus été mesurée ensuite, tandis que l'inhibition des POs a été accentuée après deux semaines, avant un retour au niveau contrôle. Ces changements peuvent être expliqués par une modification des isoformes enzymatiques majoritairement présentes dans le juvénile à cette période, comme la persistance de phosphatases acides embryonnaires dédiées à la consommation du vitellus au cours de la première semaine de vie post-éclosion. Concernant les POs, l'arrêt des perturbations au delà de deux semaines d'exposition peut être lié à la maturation de la glande digestive. Afin de mettre en évidence de telles modifications, il serait nécessaire de caractériser les enzymes étudiées ou de travailler de façon organe spécifique. Ainsi, dans le cadre d'un approfondissement du travail présenté chapitre 2, il serait intéressant de déterminer si les formes de POs présentes dans la glande digestive sont différentes de celles trouvées dans le système circulatoire et la peau. Cependant, comme illustré par notre étude sur l'homéostasie métallique, l'approche organe spécifique s'avère compliquée à réaliser sur des animaux âgés de moins d'un mois en raison de leur taille et du développement des organes (e.g. la glande digestive).

A partir de deux semaines d'exposition, le dosage d'enzymes impliquées dans la digestion nous a renseigné quant au devenir du Zn dans l'animal. En effet, la grande majorité des cathepsines et des trypsines présentes à cette période sont issues de lysosomes de différentes natures, les premiers assurant la digestion intracellulaire, et les seconds, voués à l'excrétion, assurant la digestion extracellulaire. Les différences de concentrations en Zn inhibant l'une ou l'autre des enzymes suggèrent donc que le Zn est stocké dans un premier temps dans les

lysosomes « à cathepsines », et qu'au delà du seuil induisant la mortalité (i.e. $> 200 \mu\text{g L}^{-1}$), il peut pénétrer dans les seconds, les lysosomes « à trypsine ». Ces effets délétères indiquent cependant une gestion incomplète de l'élément qui est stocké au niveau de ces vésicules sans que les processus chargés d'assurer son innocuité (e.g. ligands, précipitation) soient complets. Il semble donc que l'intoxication au Zn au niveau de la glande digestive se déroule en plusieurs étapes : 1) cet élément est d'abord stocké et accumulé au niveau de sphérules présentes dans les cellules basales (Costa *et al.*, 2014; Martoja et Marcaillou, 1993), 2) le Zn gagne les cellules digestives et est accumulé dans les lysosomes impliqués dans la digestion intracellulaire, ce qui induit des perturbations des enzymes présentes dans ces organelles (i.e. cathepsines), et 3) le Zn rejoint les lysosomes qui seront libérés dans le tractus digestif (i.e. contenant des trypsines), suggérant une saturation de l'organe en Zn. Cette étude a permis de souligner que l'accumulation de cet élément au niveau du système lysosomal des cellules de la glande digestive est un processus de détoxification mis en place par la seiche juvénile comme déjà décrit chez les mollusques bivalves (Marigómez *et al.*, 2002; Mason et Jenkins, 1995).

Concernant les marqueurs intégrés, nos travaux ont mis en évidence une perturbation du comportement de prédation à partir d'une concentration proche du seuil induisant la mortalité (i.e. $184 \mu\text{g L}^{-1}$), suggérant que le système nerveux est un des derniers systèmes atteints par le Zn avant l'apparition de la morbidité. S'il s'avère que cette perturbation n'est pas spécifique au Zn, ce marqueur pourrait permettre de déterminer les seuils de mortalité d'autres éléments chez cet animal à ce stade de vie, tout en limitant le nombre d'animaux à sacrifier. En effet, nos expériences ont montré que cette perturbation a lieu rapidement après le début de l'exposition (à partir de 48 h), sans présenter de phénomènes d'atténuation ou d'amplification lié au temps d'exposition, et disparaît après quelques jours dans une eau non contaminée.

En raison de son profil exponentiel au cours de ses premières semaines de vie (e.g. Forsythe *et al.*, 2002; Correia *et al.*, 2008b; Grigoriou et Richardson, 2004; Sykes *et al.*, 2010), la croissance de la seiche est apparue comme étant relativement sensible. En effet, une diminution de la taille des animaux après un mois d'exposition a été mise en évidence à partir de $108 \mu\text{g L}^{-1}$. Dans le cadre de nouvelles études d'écotoxicologie sur la seiche juvénile, il serait important d'étudier l'influence de ce paramètre sur l'accumulation et la toxicité de contaminants. En effet, il a été précédemment rapporté que la croissance peut être un facteur

déterminant permettant à certains crustacés, incapables d'augmenter leur vitesse d'excrétion lors d'expositions à des contaminants, de maintenir une concentration interne constante (Rainbow et White, 1989). Dans notre étude, la croissance des animaux est restée moyenne comparée à celle observée dans le milieu naturel ou dans les élevages fournissant une quantité de nourriture plus importante (Miramand *et al.*, 2006; Sykes *et al.*, 2010), ce qui a pu induire une accumulation plus importante et par conséquent des effets plus importants.

Nos travaux ont montré que l'entrée de Zn dans l'organisme de la seiche juvénile perturbe l'homéostasie d'un certain nombre d'autres éléments. La capacité de liaison de cet élément, tant à des composés riches en soufre, qu'en azote ou en oxygène, confère au Zn cette importante capacité perturbatrice. En effet, le Zn, présent en grande quantité dans l'animal occupe la majorité des ligands, empêchant ou ralentissant la prise en charge par l'organisme d'autres éléments (e.g. Ag, Cd, Cu, Mn). Les perturbations physiologiques décrites ci-dessus ne sont donc pas le résultat d'une augmentation du Zn seul, mais également d'une diminution globale de la teneur en Mn dans l'organisme associée à une augmentation des concentrations solubles en Cu, Ag et Cd. Il apparaît donc fondamental pour une meilleure compréhension des phénomènes de toxicité mis en évidence chez des mollusques céphalopodes, d'étudier l'accumulation et le fractionnement subcellulaire d'éléments aux propriétés proches de celles de l'élément étudié, notamment en termes d'affinité de liaison. A grande échelle, ce genre de perturbations pourraient modifier les teneurs de certains éléments au sein des réseaux trophiques. En effet, on considère que la fraction biodisponible au maillon supérieur est majoritairement la fraction soluble.

Les résultats présentés dans le chapitre 4 ont mis en évidence une synthèse importante de ligands de type MTs au cours des six premières semaines post-éclosion en condition contrôle. Il serait important, dans le cadre de futures études sur ce modèle, de tenir compte de cette période qui n'avait jamais été relevée jusqu'à présent chez la seiche juvénile, et qui semble cruciale en ce qui concerne la synthèse de ligands pour les éléments traces ayant une affinité particulière pour le soufre (i.e. de classe B et de transition). L'évolution des teneurs en MTs suggère que l'animal est plus sensible vis-à-vis de ce type de contaminants avant quatre semaines post-éclosion car c'est à cette période que sa concentration en MTs est la plus faible (i.e. potentiel de liaison au niveau soluble le plus faible).

Cependant, nos travaux ont mis en évidence que, dans le cadre d'expositions prolongées,

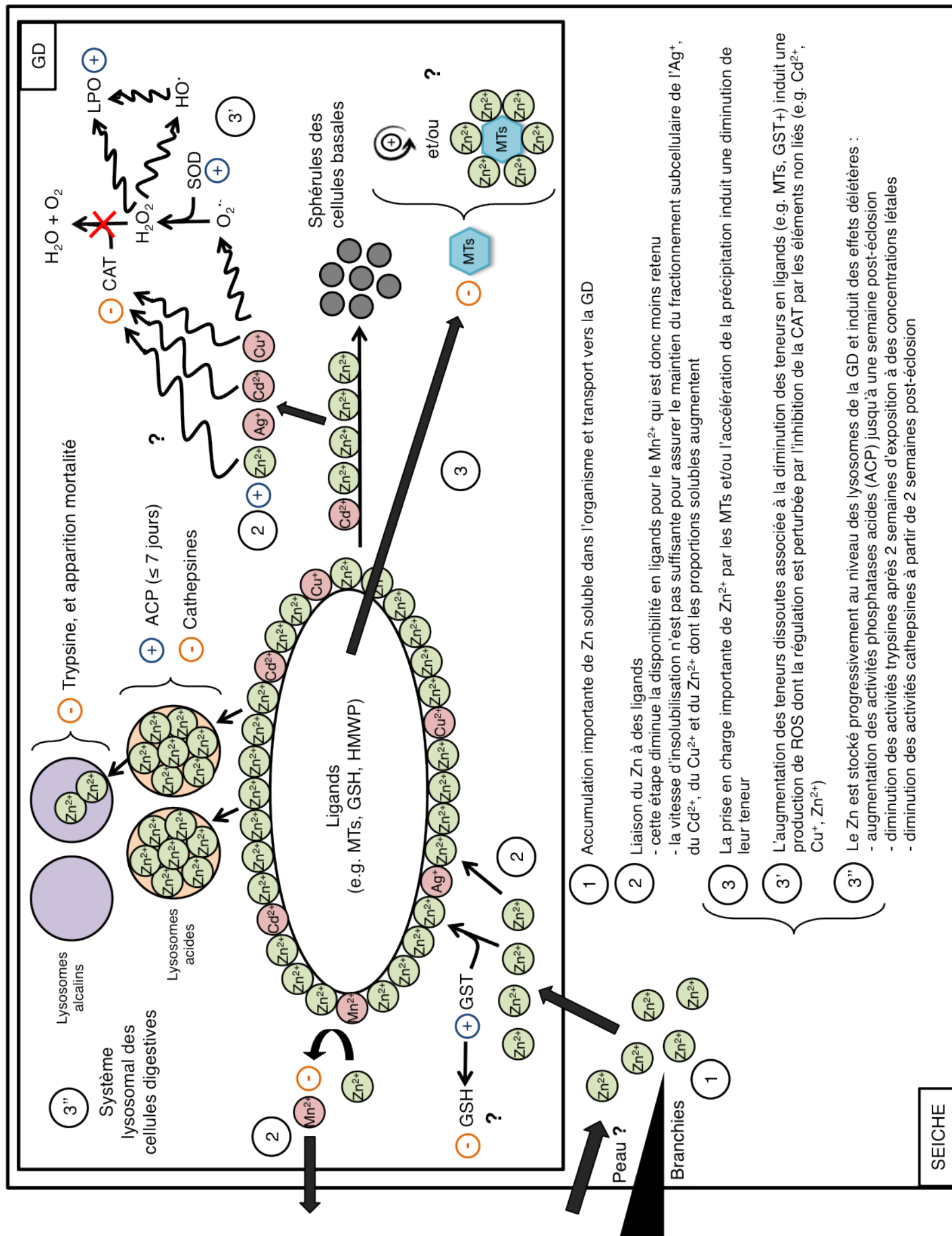


FIGURE 8.1 – Schéma bilan représentant les principales conséquences d'une exposition au Zn dissous du juvénile de *S. officinalis*. Les points d'interrogation indiquent les principales questions émergeant de nos conclusions.

les premiers effets délétères (augmentation de la LPO) à la concentration d'environ $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (i.e. la plus faible testée) sont observés à partir de six semaines. L'augmentation des activités GST, qui permettent d'accélérer la liaison du GSH aux composés électrophiles libres, mise en évidence au niveau de la glande digestive à partir d'un mois d'exposition, suggère un rôle important de ce ligand (Dickinson et Forman, 2002). En effet, le GSH présente des affinités similaires à celles des MTs, il peut donc être impliqué dans la régulation des éléments traces comme déjà suggéré chez l'adulte (Bustamante *et al.*, 2006a). Afin de mieux comprendre la sensibilité, le fonctionnement et l'évolution du système de détoxification du juvénile de *S. officinalis*, il serait intéressant de déterminer le rôle des autres ligands et leur importance, notamment au cours du premier mois suivant l'éclosion. Le schéma bilan (Fig. 8.1) présente les principaux résultats de ces études.

Les marqueurs directement liés au stress oxydatif (i.e. SOD, CAT, LPO) ont été peu étudiés chez les céphalopodes (Semedo *et al.*, 2012; Rosa *et al.*, 2012; Trübenbach *et al.*, 2013; Zielinski et Pörtner, 2000). Les perturbations importantes mesurées dans la glande digestive des animaux à partir d'un mois d'exposition (tableau 8.1) suggèrent que cet organe pourrait être un bon indicateur de l'état de stress de ces animaux. Si des perturbations semblables étaient avérées dans d'autres types de contaminations, cet organe pourrait être utilisé dans le cadre d'études *in situ* afin d'estimer le stress d'animaux s'étant développés dans des milieux différemment exposés aux contaminations d'origine anthropique (e.g. en Basse-Normandie, les côtes de Baie de Seine et de l'Ouest Cotentin).

8.2 Caractérisation des hémocytes de *S. officinalis* et développement de leur culture primaire

Les hémocytes jouent un rôle primordial en tant qu'effecteur cellulaire du système immunitaire des invertébrés. Notre étude a donc débuté par la caractérisation de ces cellules chez *Sepia officinalis*. Cela nous a permis de poser les bases indispensables à une meilleure compréhension du fonctionnement du système immunitaire de ce céphalopode. Ce travail a souligné l'importante activité de phagocytose dont sont capables ces cellules ainsi que le rôle de l'Hcy en tant que modulateur de ce processus. La mise en place de tests de toxicité réalisés ensuite a permis de valider leur utilisation en conditions *in vitro* pour l'étude de l'impact de différents contaminants (e.g. Cd^{2+} et Zn^{2+}) sur leurs fonctions primaires (i.e. phagocytose et production de ROS). La culture primaire d'hémocytes offre la possibilité de mesurer rapidement la toxicité d'une large gamme de contaminants, mais pourrait également être associée au développement de l'emploi de sondes plus spécifiques d'un comportement donné de ce type de cellules, tels que l'excrétion ou la synthèse de ligands impliqués dans la détoxification. Des travaux préliminaires visant à mettre en évidence la production de ligands présentant des groupements thiols (sonde CMFDA) ou des MTs (marquage à l'aide d'anticorps) ont donné des résultats prometteurs quant au développement de ce genre d'outils sur les hémocytes de seiche.

La principale contrainte relative au travail sur ces cellules restant la durée pendant laquelle l'approvisionnement en animaux est possible (dans le meilleur des cas, cinq mois dans l'année), des travaux de cryopréservation pourraient permettre d'augmenter la période d'étude de ces cellules, comme déjà entrepris avec les hémocytes d'*Haliotis tuberculata* (Poncet et Lebel, 2003).

Références bibliographiques

Bibliographie

- ACCORSI, A., BUCCI, L., de EGUILEOR, M., OTTAVIANI, E. et MALAGOLI, D. (2013). Comparative analysis of circulating hemocytes of the freshwater snail *Pomacea canaliculata*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(5):1260–8.
- ADEMA, C. M., van DEUTEKOM-MULDER, E. C., van der KNAAP, W. P. W., MEULEMAN, E. A. et SMINIA, T. (1991). Generation of oxygen radicals in hemocytes of the snail *Lymnaea stagnalis* in relation to the rate of phagocytosis. *Developmental & Comparative Immunology*, 15(1-2):17–26.
- AGARWALA, K. L., KAWABATA, S.-i., MIURA, Y., KUROKI, Y. et IWANAGA, S. (1996). Limulus intracellular coagulation inhibitor type 3 : Purification, characterization, cDNA cloning, and tissue localization. *Journal of Biological Chemistry*, 271(39):23768–23774.
- AHSANULLAH, M. (1976). Acute toxicity of cadmium and zinc to seven invertebrates species from Western Port, Victoria. *Marine and Freshwater Research*, 27(2):187–196.
- ALADAILEH, S., RODNEY, P., NAIR, S. V. et RAFTOS, D. A. (2007). Characterization of phenoloxidase activity in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry & Molecular Biology*, 148(4):470–80.
- ALBERTS, I. L., NADASSY, K. et WODAK, S. J. (1998). Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures. *Protein Science*, 7(8):1700–16.
- ALLAM, B., ASHTON-ALCOX, K. et FORD, S. (2002). Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology*, 13(2):141–158.
- ALPUCHE, J., PEREYRA, A., MENDOZA-HERNÁNDEZ, G., AGUNDIS, C., ROSAS, C. et ZENTENO, E. (2010). Purification and partial characterization of an agglutinin from *Octopus maya* serum. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry & Molecular Biology*, 156(1):1–5.
- ALZIEU, C., ABARNOU, A., BASSOULLET, P., BOUTIER, B., CHIFFOLEAU, J.-F., CRENN, I., DERRIEN, A., ERARD-LE DENN, E., GOURMELON, M., GUILIAUD, J.-F., SILVA JACINTO, R., LE CANN, P., LE GUYADER, F., LE HIR, P., L’YAVANC, J., MAUVAIS, JEAN-LOUIS MENARD, DOMINIQUE MICHEL, P., MONBET, Y., POMMEPUY, M. et QUINIOU, F. (1999). Dredging and Marine Environment State of the Art. Rapport technique.

- AMADO FILHO, G. M., KAREZ, C. S., ANDRADE, L. R., YONESHIGUE-VALENTIN, Y. et PFEIFFER, W. C. (1997). Effects on growth and accumulation of zinc in six seaweed species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 37(3):223–8.
- AMIARD, J.-C., AMIARD-TRIQUET, C., BARKA, S., PELLERIN, J. et RAINBOW, P. S. (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates : their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 76(2):160–202.
- AMIARD, J.-C., AMIARD-TRIQUET, C., METAYER, C. et MARCHAND, J. (1980). Etude du transfert de Cd, Pb, Cu et Zn dans les chaines trophiques néritiques et estuariennes - I. Etat dans l'estuaire interne de la Loire (France) au cours de l'été 1978. *Water Research*, 14:665–673.
- AMIARD-TRIQUET, C., BERTHET, B., METAYER, C. et AMIARD, J.-C. (1986). Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, copper and zinc in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 92:7–13.
- AMIARD-TRIQUET, C., METAYER, C. et AMIARD, J.-C. (1980). Etude du transfert de Cd, Pb, Cu et Zn dans les chaines trophiques néritiques et estuariennes - II. Accumulation biologique chez les poissons planctonophages. *Water Research*, 14:1327–1332.
- AMPARYUP, P., CHAROENSAPSRI, W. et TASSANAKAJON, A. (2013). Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(4):990–1001.
- ANANDRAJ, A., MARSHALL, D. J., GREGORY, M. A. et MCCLURG, T. P. (2002). Metal accumulation, filtration and O₂ uptake rates in the mussel *Perna perna* (Mollusca : Bivalvia) exposed to Hg²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, 132(3):355–63.
- ANDREWS, P. L. R., DARMAILLACQ, A.-S., DENNISON, N., GLEADALL, I. G., HAWKINS, P., MESSENGER, J. B., OSORIO, D., SMITH, V. J. et SMITH, J. A. (2013). The identification and management of pain, suffering and distress in cephalopods, including anaesthesia, analgesia and humane killing. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 447:46–64.
- ANSARI, Z. A., DESILVA, C. et BADESAB, S. (2012). Total petroleum hydrocarbon in the tissues of some commercially important fishes of the Bay of Bengal. *Marine Pollution Bulletin*, 64(11):2564–8.
- ARAKANE, Y., MUTHUKRISHNAN, S., BEEMAN, R. W., KANOST, M. R. et KRAMER, K. J. (2005). *Laccase 2* is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(32):11337–11342.
- ARMSTRONG, P. B. (1992). Humoral immunity : α_2 -macroglobulin activity in the plasma of mollusks. *The Veliger*, 35(3):161–164.
- ARMSTRONG, P. B. (2006). Proteases and protease inhibitors : a balance of activities in host-pathogen interaction. *Immunobiology*, 211(4):263–281.

- ARMSTRONG, P. B. (2010). Role of α_2 -macroglobulin in the immune responses of invertebrates. *Invertebrate Survival Journal*, 7(2):165–180.
- ASANO, T. et ASHIDA, M. (2001). Cuticular pro-phenoloxidase of the silkworm, *Bombyx mori*. Purification and demonstration of its transport from hemolymph. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(14):11100–11112.
- AUFFRET, M., MUJZIC, N., CORPOREAU, C. et MORAGA, D. (2002). Xenobiotic-induced immunomodulation in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Marine Environmental Research*, 54(3-5):585–9.
- AUFFRET, M., ROUSSEAU, S., BOUTET, I., TANGUY, A., BARON, J., MORAGA, D. et DUCHEMIN, M. (2006). A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(3):393–405.
- AUSTRALIA AND NEW ZEALAND ENVIRONMENT & CONSERVATION COUNCIL (1992). Australian Water Quality Guidelines. Rapport technique, ANZECC, Melbourne.
- AUZOUX-BORDENAVE, S., FOUCHEREAU-PERON, M., HELLEÉOUE, M.-N. et DOUMENC, D. (2007). CGRP regulates the activity of mantle cells and hemocytes in abalone primary cell culture (*Haliotis tuberculata*). *Journal of Shellfish Research*, 26(3):887–894.
- BABO, S. et VASSEUR, P. (1992). In vitro effects of Thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 22:61–68.
- BACHÈRE, E., CHAGOT, D. et GRIZEL, H. (1988). Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Developmental & Comparative Immunology*, 12(3):549–559.
- BAEZA-ROJANO, E., GARCÍA, S., GARRIDO, D., GUERRA-GARCÍA, J. M. et DOMINGUES, P. M. (2010). Use of Amphipods as alternative prey to culture cuttlefish (*Sepia officinalis*) hatchlings. *Aquaculture*, 300(1-4):243–246.
- BAKHAYOKO, M. (1983). Biology of the cuttlefish *Sepia officinalis* hierreda off Senegalese coast. In CADDY, J. F., éditeur : *Advances in assessment of world cephalopod resources*, pages 204–263. Rome, Italy.
- BALLARIN, L., CIMA, F. et SABBADIN, A. (1994). Phagocytosis in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. *Developmental & Comparative Immunology*, 18(6):467–481.
- BALLATORI, N. (2002). Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environmental Health Perspectives*, 110(Suppl 5):689–94.
- BALTI, R., BARKIA, A., BOUGATEF, A., KTARI, N. et NASRI, M. (2009). A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*) : Purification and characterisation. *Food Chemistry*, 113(1):146–154.

- BALTI, R., BOUGHERRA, F., BOUGATEF, A., HAYET, B. K., NEDJAR-ARROUME, N., DHULSTER, P., GUILLOCHON, D. et NASRI, M. (2012). Chymotrypsin from the hepatopancreas of cuttlefish (*Sepia officinalis*) with high activity in the hydrolysis of long chain peptide substrates : Purification and biochemical characterisation. *Food Chemistry*, 130(3):475–484.
- BALTI, R., HMIDET, N., JELLOULI, K., NEDJAR-ARROUME, N., GUILLOCHON, D. et NASRI, M. (2010). Cathepsin D from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*) : purification and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19):10623–30.
- BARBER, V. C. et GRAZIADEI, P. (1965). The fine structure of cephalopod blood vessels I. Some smaller peripheral vessels. *Zeitschrift für Zellforschung*, 66:765–781.
- BARRACCO, M. A., MEDEIROS, I. D. et MOREIRA, F. M. (1999). Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*. *Fish & Shellfish Immunology*, 9(5):387–404.
- BARRACCO, M. A., STEIL, A. A. et GARGIONI, R. (1993). Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88(1):73–83.
- BASSAGLIA, Y., BURESI, A., FRANKO, D., ANDOUCHE, A., BARATTE, S. et BONNAUD, L. (2013). *Sepia officinalis* : A new biological model for eco-evo-devo studies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 447:4–13.
- BATHIGE, S. D. N. K., UMASUTHAN, N., WHANG, I., LIM, B.-S., JUNG, H.-B. et LEE, J. (2013). Evidences for the involvement of an invertebrate goose-type lysozyme in disk abalone immunity : cloning, expression analysis and antimicrobial activity. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(5):1369–79.
- BEBIANNO, M. J. et LANGSTON, W. J. (1991). Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. *Marine Biology*, 96:91–96.
- BECKMANN, N., MORSE, M. P. et MOORE, C. M. (1992). Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 59:124–132.
- BENGTTSSON, B. E. (1974). Effect of zinc on growth of the minnow *Phoxinus phoxinus*. *Oikos*, pages 370–373.
- BENINGER, P. G., LE PENNEC, G. et LE PENNEC, M. (2003). Demonstration of nutrient pathway from the digestive system to oocytes in the gonad intestinal loop of the scallop *Pecten maximus* L. *The Biological Bulletin*, 205(1):83–92.
- BERGER, E. (2010). Aquaculture of *Octopus* species : present status, problems and perspectives. *The Plymouth Student Scientist*, 4(1):384–399.
- BERGMANN, S., LIEB, B., RUTH, P. et MARKL, J. (2006). The hemocyanin from a living fossil, the cephalopod *Nautilus pompilius* : protein structure, gene organization, and evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 62(3):362–74.

- BETTGER, W. J. et O'DELL, B. L. (1981). A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sciences*, 28(8661):1425–1438.
- BEUERLEIN, K., LÖHR, S., WESTERMANN, B., RUTH, P. et SCHIPP, R. (2002a). Components of the cellular defense and detoxification system of the common cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca, Cephalopoda). *Tissue & Cell*, 34(6):390–396.
- BEUERLEIN, K., RUTH, P., WESTERMANN, B., LÖHR, S. et SCHIPP, R. (2002b). Hemocyanin and the branchial heart complex of *Sepia officinalis* : are the hemocytes involved in hemocyanin metabolism of coleoid cephalopods? *Cell and Tissue Research*, 310(3):373–381.
- BEUERLEIN, K., SCHIMMELPFENNIG, R., WESTERMANN, B., RUTH, P. et SCHIPP, R. (1998). Cytobiological studies on hemocyanin metabolism in the branchial heart complex of the common cuttlefish *Sepia officinalis* (Cephalopoda, Dibranchiata). *Cell and Tissue Research*, 292(3):587–595.
- BEUERLEIN, K. et SCHIPP, R. (1998). Cytomorphological aspects on the response of the branchial heart complex of *Sepia officinalis* L. (Cephalopoda) to xenobiotics and bacterial infection. *Tissue & Cell*, 30(6):662–671.
- BEUERLEIN, K., WESTERMANN, B., RUTH, P., SCHIMMELPFENNIG, R. et SCHIPP, R. (2000). Hemocyanin re-uptake in the renal and branchial heart appendages of the coleoid cephalopod *Sepia officinalis*. *Cell and Tissue Research*, 301(3):413–421.
- BLACKMORE, G. et WANG, W.-X. (2002). Uptake and efflux of Cd and Zn by the green mussel *Perna viridis* after metal preexposure. *Environmental Science & Technology*, 36(5):989–995.
- BLASCHKO, H. (1941). Amine oxidase in *Sepia officinalis*. *The Journal of Physiology*, 99:364–369.
- BLASCHKO, H. et HAWKINS, J. (1952). Observations on amine oxidase in cephalopods. *The Journal of Physiology*, 118(1):88–93.
- BLASCO, J., PUPPO, J. et SARASQUETE, M. C. (1993). Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Marine Biology*, 115:113–118.
- BLOOR, I. S. M., ATTRILL, M. J. et JACKSON, E. L. (2013). A review of the factors influencing spawning, early life stage survival and recruitment variability in the common cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Advances in Marine Biology*, 65:1–65.
- BOCK, C. W., KATZ, A. K., MARKHAM, G. D. et GLUSKER, J. P. (1999). Manganese as a replacement for magnesium and zinc : functional comparison of the divalent ions. *Journal of the American Chemical Society*, 121:7360–7372.
- BOISSET, N. et MOUCHE, F. (2000). *Sepia officinalis* hemocyanin : A refined 3D structure from field emission gun cryoelectron microscopy. *Journal of Molecular Biology*, 296(2):459–72.

- BOLOGNARI, A. (1951). Morfologia, struttura e funzione del "corpo bianco" dei cefalopodi. II. Struttura e funzione. *Archivio Zoologico Italiano*, 36:252–287.
- BONETE, M. J., MANJON, A., LLORCA, F. et IBORRA, J. L. (1984). Acid proteinase activity in fish - I. Comparative study of extraction of cathepsins B and D from *Mujil auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry & Molecular Biology*, 78(1):203–206.
- BOUCAUD-CAMOU, E. (1973). *Etude de l'appareil digestif de Sepia officinalis L. (Mollusque Céphalopode). Essai d'analyse expérimentale des phénomènes digestifs*. Thèse de doctorat, Université de Caen.
- BOUCAUD-CAMOU, E. (1974). Localisation d'activités enzymatiques impliquées dans la digestion chez *Sepia officinalis* L. *Archives de Zoologie Expérimentale & Générale*, 115(1):5–27.
- BOUCAUD-CAMOU, E. et BOISMERY, J. (1991). The migrations of the cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) in the English Channel. In BOUCAUD-CAMOU, E., éditeur : *La seiche / The Cuttlefish*, pages 179–189. Centre de publication de l'Université de Caen, Caen, France.
- BOUCAUD-CAMOU, E. et BOUCHER-RODONI, R. (1983). Feeding and digestion in Cephalopods. In WILBUR, K. et SALEUDINN, A., éditeurs : *The Mollusca Vol. 5 Physiology Part. 2*, pages 149–187. New York and London, academic p édition.
- BOUCAUD-CAMOU, E. et ROPER, C. F. E. (1995). Digestive enzymes in paralarval cephalopods. *Bulletin of Marine Science*, 57(2):313–327.
- BOUCAUD-CAMOU, E. et YIM, M. (1980). Fine structure and function of the digestive cell *Sepia officinalis* (Mollusca : Cephalopoda). *Journal of Zoology London*, 191:89–105.
- BOUCAUD-CAMOU, E., YIM, M. et TRESGORT, A. (1985). Feeding and digestion of young *Sepia officinalis* L. (Mollusca : Cephalopoda) during post-hatching development. *Vie Et Milieu - Life & Environment*, 35(3/4):263–266.
- BOUST, D., FISCHER, J.-C., OUDDANE, B., PETIT, F. et WARTEL, M. (2004). Fer et manganèse : réactivités et recyclages. Rapport technique 1.
- BOYLE, P. et RODHOUSE, P. G. K. (2005). *Ecology and Fisheries*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, 1st édition.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254.
- BRAY, T. M. et BETTGER, W. J. (1990). The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radical Biology & Medicine*, 8:281–291.

- BRDIČKA, A. R. (1933). Polarographic studies with the dropping mercury method. A new test for proteins in the presence of cobalt salts in ammoniacal solution of ammonium chloride. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 7:112–28.
- BRERETON, A., LORD, H., THORNTON, I. et WEBB, J. S. (1973). Effect of zinc on growth and development of larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 19(2):96–101.
- BRETELIER, R. J., WILLIAMS, J. W. et BUHL, R. L. (1982). Measurement of chronic toxicity using the opossum shrimp *Mysidopsis bahia*. *Hydrobiologia*, 93:189–194.
- BRIDGES, C. C. et ZALUPS, R. K. (2005). Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 204(3):274–308.
- BROUSSEAU, P., PELLERIN, J., MORIN, Y., CYR, D., BLAKLEY, B., BOERMANS, H. et FOURNIER, M. (2000). Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following in vitro exposure to heavy metals. *Toxicology*, 142(2):145–56.
- BURMESTER, T. (2002). Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *Journal of Comparative Physiology B : Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 172(2):95–107.
- BUSTAMANTE, P., BERTRAND, M., BOUCAUD-CAMOU, E. et MIRAMAND, P. (2006a). Subcellular distribution of Ag, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Pb, and Zn in the digestive gland of the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Journal of Shellfish Research*, 25(3):987–993.
- BUSTAMANTE, P., CAURANT, F., FOWLER, S. W. et MIRAMAND, P. (1998a). Cephalopods as a vector for the transfer of cadmium to top marine predators in the north-east Atlantic Ocean. *The Science of the Total Environment*, 220(1):71–80.
- BUSTAMANTE, P., CHEREL, Y., CAURANT, F. et MIRAMAND, P. (1998b). Cadmium, copper and zinc in octopuses from Kerguelen Islands, Southern Indian Ocean. *Polar Biology*, 19(4):264–271.
- BUSTAMANTE, P., COSSON, R. P., GALLIEN, I., CAURANT, F. et MIRAMAND, P. (2002a). Cadmium detoxification processes in the digestive gland of cephalopods in relation to accumulated cadmium concentrations. *Marine Environmental Research*, 53(3):227–241.
- BUSTAMANTE, P., GONZÁLEZ, A. F., ROCHA, F., MIRAMAND, P. et GUERRA, A. (2008). Metal and metalloid concentrations in the giant squid *Architeuthis dux* from Iberian waters. *Marine Environmental Research*, 66(2):278–287.
- BUSTAMANTE, P., GRIGIONI, S., BOUCHER-RODONI, R., CAURANT, F. et MIRAMAND, P. (2000). Bioaccumulation of 12 trace elements in the tissues of the Nautilus *Nautilus macromphalus* from New Caledonia. *Marine Pollution Bulletin*, 40(8):688–696.

- BUSTAMANTE, P., LAHAYE, V., DURNEZ, C., CHURLAUD, C. et CAURANT, F. (2006b). Total and organic Hg concentrations in cephalopods from the North Eastern Atlantic waters : influence of geographical origin and feeding ecology. *The Science of the Total Environment*, 368(2-3):585–96.
- BUSTAMANTE, P., TEYSSIE, J.-L., DANIS, B., FOWLER, S. W., MIRAMAND, P., COTRET, O. et WARNAU, M. (2004). Uptake, transfer and distribution of silver and cobalt in tissues of the common cuttlefish *Sepia officinalis* at different stages of its life cycle. *Marine Ecology Progress Series*, 269:185–195.
- BUSTAMANTE, P., TEYSSIE, J.-L., FOWLER, S. W., COTRET, O., DANIS, B., MIRAMAND, P. et WARNAU, M. (2002b). Biokinetics of cadmium and zinc accumulation and depuration at different stages in the life cycle of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Marine Ecology Progress Series*, 231:167–177.
- BUSTAMANTE, P., TEYSSIE, J.-L., FOWLER, S. W. et WARNAU, M. (2006c). Assessment of the exposure pathway in the uptake and distribution of americium and cesium in cuttlefish (*Sepia officinalis*) at different stages of its life cycle. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 331(2):198–207.
- CAI, L., SATOH, M., TOHYAMA, C. et CHERIAN, M. G. (1999). Metallothionein in radiation exposure : its induction and protective role. *Toxicology*, 132(2-3):85–98.
- CAIRNS, M. A., GARTRON, R. R. et TUBB, R. A. (1982). Use of fish ventilation frequency to estimate chronically safe toxicant concentration. *Transactions of the American Fisheries Society*, 111:70–77.
- CALABRESE, A., COLLIER, S., NELSON, D. A. et MACINNES, J. R. (1973). The toxicity of heavy metals to embryos of the american oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biology*, 18:162–166.
- CALABRESE, A., MACINNES, J. R., NELSON, D. A., GREIG, R. A. et YEVICH, P. P. (1984). Effects of long-term exposure to silver or copper on growth, bioaccumulation and histopathology in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 11:253–274.
- CALABRESE, A. et NELSON, D. A. (1974). Inhibition of embryonic development of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, by heavy metals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 11(1):92–7.
- CAMPELLO, S., BELTRAMINI, M., GIORDANO, G., DI MURO, P., MARINO, S. M. et BUBACCO, L. (2008). Role of the tertiary structure in the diphenol oxidase activity of *Octopus vulgaris* hemocyanin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 471(2):159–167.
- CANESI, L., GALLO, G., GAVIOLI, M. et PRUZZO, C. (2002). Bacteria-hemocytic interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique*, 57(6):469–76.
- CARBALLAL, M. J., LÓPEZ, C., AZEVEDO, C. et VILLALBA, A. (1997a). Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 70(2):96–105.
- CARBALLAL, M. J., LÓPEZ, C., AZEVEDO, C. et VILLALBA, A. (1997b). *In vitro* study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 7:403–416.

- CASTAGNA, A., SINATRA, F. et CAPODICASA, V. (1981). Observations of the effect of zinc on the gametes and various development phases of *Arbacia lixula*. *Marine Biology*, 64:285–289.
- CASTELLANOS-MARTÍNEZ, S. (2013). *Coccidiosis and molecular basis of the immune response of common octopus (Octopus vulgaris Cuvier, 1797)*. Thèse de doctorat, Universida de Vigo.
- CASTELLANOS-MARTÍNEZ, S. et GESTAL, C. (2013). Pathogens and immune response of cephalopods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 447:14–22.
- CASTELLANOS-MARTÍNEZ, S., PRADO-ALVAREZ, M., Lobo-da CUNHA, A., AZEVEDO, C. et GESTAL, C. (2014). Morphologic, cytometric and functional characterization of the common octopus (*Octopus vulgaris*) hemocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 44(1):50–58.
- CASTILLO, M. G., GOODSON, M. S. et MCFALL-NGAI, M. J. (2009). Identification and molecular characterization of a complement C3 molecule in a lophotrochozoan, the Hawaiian bobtail squid *Euprymna scolopes*. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(1):69–76.
- CERENIUS, L., LEE, B. L. et SÖDERHÄLL, K. (2008). The proPO-system : pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*, 29(6):263–271.
- CERENIUS, L. et SÖDERHÄLL, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198(1):116–126.
- CHALLIER, L. (2005). *Variabilité de la croissance des Céphalopodes juvéniles (Sepia officinalis, Loligo forbesi) et relation avec les fluctuations du recrutement, en Manche*. Thèse de doctorat, Université de Caen Basse-Normandie.
- CHALLIER, L., ROYER, J. et ROBIN, J.-p. (2002). Variability in age-at-recruitment and early growth in English Channel *Sepia officinalis* described with statolith analysis. *Aquatic Living Resources*, 15:303–311.
- CHAN, H. M. (1988). Accumulation and tolerance to cadmium, copper, lead and zinc by the green mussel *Perna viridis*. *Marine Ecology Progress Series*, 48:295–303.
- CHANDRA, R. K. (1984). Excessive intake of zinc impairs immune responses. *The Journal of the American Medical Association*, 252(11):1443–1446.
- CHANDRAN, R., SIVAKUMAR, A. A., MOHANDASS, S. et ARUCHAMI, M. (2005). Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, 140(3-4):422–6.
- CHANG, S.-j., TSENG, S.-m. et CHOU, H.-y. (2005). Morphological characterization via light and electron microscopy of two cultured bivalves : A comparison study between the Hard clam (*Meretrix lusoria*) and Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *Zoological Studies*, 44(1):144–152.

- CHENG, T. C. (1981). Bivalves. In RATCLIFFE, N. A. et ROWLEY, A. F., éditeurs : *Invertebrate Blood Cells. General Aspects, Animals without True Circulatory Systems to Cephalopods*, pages 233–300. Academic press, London.
- CHENG, T. C., CHORNEY, M. J. et YOSHINO, T. P. (1977). Lysozyme like activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* challenged with bacterial. *Journal of Invertebrate Pathology*, 29:170–174.
- CHENG, T. C., RODRICK, G. E., FOLEY, D. A. et KOEHLER, S. a. (1975). Release of lysozyme from hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis. *Journal of Invertebrate Pathology*, 25(2):261–5.
- CHENG, T. C. et SULLIVAN, J. T. (1984). Effects of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes. *Marine Environmental Research*, 14:305–315.
- CHENG, W., HSIAO, I.-S., HSU, C.-H. et CHEN, J.-C. (2004). Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 17(3):235–243.
- CHICHERY, M. P. (1976). *Etude de la répartition des cholinestérases dans le système nerveux central de Sepia officinalis L. (Mollusque Céphalopode)*. Thèse de doctorat, Université de Caen.
- CHIFFOLEAU, J.-F., CLAISSE, D., COSSA, D., FICHT, A., GONZALEZ, J.-L., GUYOT, T., MICHEL, P., MIRAMAND, P., OGER, C. et PETIT, F. (2001). *La contamination métallique*. Numéro 1.
- CHOUVELON, T., SPITZ, J., CHEREL, Y., CAURANT, F., SIRMEL, R., MÈNDEZ-FERNANDEZ, P. et BUSTAMANTE, P. (2011). Inter-specific and ontogenic differences in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values and Hg and Cd concentrations in cephalopods. *Marine Ecology Progress Series*, 433:107–120.
- CHVAPIL, M. (1973). New aspects in the biological role of zinc : a stabilizer of macromolecules and biological membranes. *Life Sciences*, 13(6):1041–1049.
- CIJI, P. P. et BIJOY NANDAN, S. (2014). Toxicity of copper and zinc to *Puntius parrah* (Day, 1865). *Marine Environmental Research*, 93:38–46.
- CIMA, F., MARIN, M. G., MATOZZO, V., ROS, L. D. et BALLARIN, L. (1999). Biomarkers for TBT immunotoxicity studies on the cultivated clam *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850). *Marine Pollution Bulletin*, 39(1-12):112–115.
- CIMA, F., MATOZZO, V., MARIN, M. G. et BALLARIN, L. (2000). Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) : morphofunctional characterisation. *Fish & Shellfish Immunology*, 10(8):677–93.
- CLAES, M. F. (1996). Functional morphology of the white bodies of the cephalopod mollusc *Sepia officinalis*. *Acta Zoologica*, 77(2):173–190.

- CLARKE, A., RODHOUSE, P. G. K., HOLMES, L. J. et PASCOE, P. L. (1989). Growth rate and nucleic acid ratio in cultured cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca : Cephalopoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 133:229–240.
- CLARKE, M. R. (1996). Cephalopods as prey. III. Cetaceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences*, 351(1343):1053–1065.
- COATES, C. J. et NAIRN, J. (2014). Diverse immune functions of hemocyanins. *Developmental & Comparative Immunology*, 45(1):43–55.
- COELHO, M. L. et MARTINS, M. C. (1991). Preliminary observations on the biology of *Sepia officinalis* in Ria Formosa, Portugal. In BOUCAUD-CAMOU, E., éditeur : *La seiche / The Cuttlefish*, pages 131–140. Centre de Publications de l'Université de Caen, Caen, France.
- COLAS, S. (2011). Pollutions et qualité du milieu marin. Rapport technique, Commissariat général au développement durable - Service de l'observation et des statistiques, Nancy, France.
- COLES, J. A. et PIPE, R. K. (1994). Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 4(5):337–352.
- COLLINS, A. J. et NYHOLM, S. V. (2010). Obtaining hemocytes from the Hawaiian bobtail squid *Euprymna scolopes* and observing their adherence to symbiotic and non-symbiotic bacteria. *Journal of Visualized Experiments*, (36):3–5.
- COLLINS, A. J., SCHLEICHER, T. R., RADER, B. A. et NYHOLM, S. V. (2012). Understanding the role of host hemocytes in a squid/*Vibrio* symbiosis using transcriptomics and proteomics. *Frontiers in Immunology*, 3(May):91.
- COMPANY, R., SERAFIM, A., BEBIANNO, M. J., COSSON, R. P., SHILLITO, B. et FIALA-MÉDIONI, A. (2004). Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Marine Environmental Research*, 58(2-5):377–81.
- COMPANY, R., SERAFIM, A., COSSON, R. P., FIALA-MÉDIONI, A., CAMUS, L., COLAÇO, A., Serrão SANTOS, R. et BEBIANNO, M. J. a. (2008). Antioxidant biochemical responses to long-term copper exposure in *Bathymodiolus azoricus* from Menez-Gwen hydrothermal vent. *The Science of the Total Environment*, 389(2-3):407–17.
- COMPANY, R., SERAFIM, A., COSSON, R. P., FIALA-MÉDIONI, A., CAMUS, L., Serrão SANTOS, R. et JOÃO BEBIANNO, M. (2010). Sub-lethal effects of cadmium on the antioxidant defence system of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(5):788–95.
- CORREIA, M., DOMINGUES, P. M., SYKES, A. V. et ANDRADE, J. P. (2005). Effects of culture density on growth and broodstock management of the cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 245(1-4):163–173.

- CORREIA, M., PALMA, J. et ANDRADE, J. P. (2008a). Effects of live prey availability on growth and survival in the early stages of cuttlefish *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758) life cycle. *Aquaculture Research*, 39(1):33–40.
- CORREIA, M., PALMA, J., KIRAKOWSKI, T. et ANDRADE, J. P. (2008b). Effects of prey nutritional quality on the growth and survival of juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research*, 39(8):869–876.
- COSSON, R. P. (1991). Metallothioneins and detoxification. Is the use of detoxification protein for MTs a language abuse? *Water, Air and Soil Pollution*, (57-58):555–567.
- COSTA, P. M., RODRIGO, A. P. et COSTA, M. H. (2014). Microstructural and histochemical advances on the digestive gland of the common cuttlefish, *Sepia officinalis* L. *Zoomorphology*, 133(1):59–69.
- COWDEN, R. R. (1972). Some cytological and cytochemical observations on the leucopoietic organs, the "White Bodies", of *Octopus vulgaris*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 19:113–119.
- COWDEN, R. R. et CURTIS, S. K. (1973). Observations on living cells dissociated from the leukopoietic organ of *Octopus briareus*. *Experimental and Molecular Pathology*, 19:178–185.
- COWDEN, R. R. et CURTIS, S. K. (1981). Cephalopods. In RATCLIFFE, N. A. et ROWLEY, A. F., éditeurs : *Invertebrate Blood Cells. General Aspects, Animals without True Circulatory Systems to Cephalopods*, pages 301–323. Academic press, London.
- D'ANIELLO, A., STRAZZULLO, L., D'ONOFRIO, G. et PISCHETOLA, M. (1986). Electrolytes and nitrogen compounds of body fluids and tissues of *Octopus vulgaris* Lam. *Journal of Comparative Physiology B : Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 156(4):503–509.
- DANIS, B., BUSTAMANTE, P., COTRET, O., TEYSSIE, J.-L., FOWLER, S. W. et WARNAU, M. (2005). Bioaccumulation of PCBs in the cuttlefish *Sepia officinalis* from seawater, sediment and food pathways. *Environmental Pollution*, 134(1):113–122.
- DECKER, H. (1998). Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 273(40):25889–25892.
- DECKER, H. et JAENICKE, E. (2004). Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Developmental & Comparative Immunology*, 28(7-8):673–87.
- DECKER, H., SCHWEIKARDT, T., NILLIUS, D., SALZBRUNN, U., JAENICKE, E. et TUCZEK, F. (2007). Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases. *Gene*, 398(1-2):183–91.
- DECKER, H. et TUCZEK, F. (2000). Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins : structural basis and molecular mechanism. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(8):392–397.

- DECLEIR, W., LEMAIRE, J. et RICHARD, A. (1970). Determination of copper in embryos and very young specimens of *Sepia officinalis*. *Marine Biology*, 5(3):256–258.
- DECLEIR, W., LEMAIRE, J. et RICHARD, A. (1971). The differentiation of blood proteins during ontogeny in *Sepia officinalis* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 40B:923–930.
- DECLEIR, W., RICHARD, A., LEMAIRE, J. et WOLF, G. (1976). L'hémocyanine et la glande branchiale de *Sepia officinalis* L. (mollusque céphalopode). *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique*, 106(2-4):133–144.
- DECLEIR, W., VLAEMINCK, A., GELADI, P. et VAN GRIEKEN, R. (1978). Determination of protein-bound copper and zinc in some organs of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 60B:347–350.
- DEMPSEY, L. A. (2013). Zinc deprivation. *Nature Immunology*, 14(12):1211–1211.
- DENIS, V. et ROBIN, J.-p. (2001). Present status of the French Atlantic fishery for cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Fisheries Research*, 52(1-2):11–22.
- DEVOS, A., VOISEUX, C., CAPLAT, C. et FIEVET, B. (2012). Effect of chronic exposure to zinc in young spat of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(12):2841–7.
- DI, G., ZHANG, Z. et KE, C. (2013). Phagocytosis and respiratory burst activity of haemocytes from the ivory snail, *Babylonia areolata*. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(2):366–374.
- DI POI, C., BIDEL, F., DICKEL, L. et BELLANGER, C. (2014). Cryptic and biochemical responses of young cuttlefish *Sepia officinalis* exposed to environmentally relevant concentrations of fluoxetine. *Aquatic Toxicology*, 151:36–45.
- DI POI, C., DARMAILLACQ, A.-S., DICKEL, L., BOULOUARD, M. et BELLANGER, C. (2013). Effects of perinatal exposure to waterborne fluoxetine on memory processing in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Aquatic Toxicology*, 132-133:84–91.
- DI SALVATORE, P., CALCAGNO, J. A., ORTÍZ, N., RÍOS DE MOLINA, M. D. C. et SABATINI, S. E. (2013). Effect of seasonality on oxidative stress responses and metal accumulation in soft tissues of *Aulacomya atra*, a mussel from the South Atlantic Patagonian coast. *Marine Environmental Research*, 92:244–52.
- DICKEL, L., CHICHERY, M. P. et CHICHERY, R. (1997). Postembryonic maturation of the vertical lobe complex and early development of predatory behavior in the cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Neurobiology of Learning and Memory*, 67(2):150–60.
- DICKINSON, D. A. et FORMAN, H. J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 64(5-6):1019–26.

- DILLY, P. N. et MESSENGER, J. B. (1972). The branchial gland : a site of haemocyanin synthesis in *Octopus*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 132(2):193–201.
- DODOR, D. E., HWANG, H.-M. et EKUNWE, S. I. N. (2004). Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2-3):210–217.
- DOMART-COULON, I., DOUMENC, D. et AUZOUX-BORDENAVE, S. (1994). Identification of media supplements that improve the viability of primarily cell cultures of *Crassostrea gigas* oysters. *Cytotechnology*, 16:109–120.
- DOMINGUES, P. M., FORES, R., TURK, P. E., LEE, P. G. et ANDRADE, J. P. (2000). Mysid culture : lowering costs with alternative diets. *Aquaculture Research*, 31(8-9):719–728.
- DOMINGUES, P. M., KINGSTON, T., SYKES, A. V. et ANDRADE, J. P. (2001a). Growth of young cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus 1758) at the upper end of the biological distribution temperature range. *Aquaculture Research*, 32:923–930.
- DOMINGUES, P. M., MARQUEZ, L., LÓPEZ, N. et ROSAS, C. (2009). Effects of food thermal treatment on growth, absorption, and assimilation efficiency of juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Aquaculture International*, 17(3):283–299.
- DOMINGUES, P. M., SYKES, A. V. et ANDRADE, J. P. (2001b). The use of *Artemia* sp. or mysids as food source for hatchlings of the cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) ; effects on growth and survival throughout the life cycle. *Aquaculture International*, 9:319–331.
- DOMINGUES, P. M., SYKES, A. V. et ANDRADE, J. P. (2002). The effects of temperature in the life cycle of two consecutive generations of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758), cultured in the Algarve (South Portugal). *Aquaculture International*, 10:207–220.
- DOMINGUES, P. M., SYKES, A. V., SOMMERFIELD, A., ALMANSA, E., LORENZO, A. et ANDRADE, J. P. (2004). Growth and survival of cuttlefish (*Sepia officinalis*) of different ages fed crustaceans and fish. Effects of frozen and live prey. *Aquaculture*, 229(1-4):239–254.
- DOMINGUES, P. M., SYKES, A. V., SOMMERFIELD, A. et ANDRADE, J. P. (2003). Effects of feeding live or frozen prey on growth, survival and the life cycle of the cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture International*, 11:397–410.
- DOMINGUES, P. M., TURK, P. E., ANDRADE, J. P. et LEE, P. G. (1998). Pilot-scale production of mysid shrimp in a static water system. *Aquaculture International*, 6:387–402.
- DOMINGUES, P. M., TURK, P. E., ANDRADE, J. P. et LEE, P. G. (1999). Culture of the mysid, *Mysidopsis almyra* (Bowman), (Crustacea : Mysidacea) in a static water system : effects of density and temperature on production, survival and growth. *Aquaculture Research*, 30:135–143.

- DOMINGUES, P. M., TURK, P. E., ANDRADE, J. P. et LEE, P. G. (2001c). Effects of enriched *Artemia* nauplii on production, survival and growth of the mysid shrimp *Mysidopsis almyra* Bowman 1964 (Crustacea : Mysidacea). *Aquaculture Research*, 32(7):599–603.
- DONAGHY, L., HONG, H.-K., LAMBERT, C., PARK, H.-S., SHIM, W. J. et CHOI, K.-S. (2010). First characterisation of the populations and immune-related activities of hemocytes from two edible gastropod species, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the spiny top shell, *Turbo cornutus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(1):87–97.
- DONAGHY, L., JAUZEIN, C. et VOLETY, A. K. (2012). First report of severe hemocytopenia and immunodepression in the sunray venus clam, *Macrocallista nimbosa*, a potential new aquaculture species in Florida. *Aquaculture*, 364-365:247–251.
- DONAGHY, L., KIM, B.-K., HONG, H.-K., PARK, H.-S. et CHOI, K.-S. (2009a). Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(2):296–301.
- DONAGHY, L., LAMBERT, C., CHOI, K.-S. et SOUDANT, P. (2009b). Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) : Current knowledge and future prospects. *Aquaculture*, 297(1-4):10–24.
- DONAGHY, L. et VOLETY, A. K. (2011). Functional and metabolic characterization of hemocytes of the green mussel, *Perna viridis* : *in vitro* impacts of temperature. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(6):808–14.
- DORGELO, J., MEESTER, H. et VELZEN, C. (1995). Effects of diet and heavy metals on growth rate and fertility in the deposit-feeding snail *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith) (Gastropoda : Hydrobiidae). *Hydrobiologia*, 316(3):199–210.
- D’SILVA, C. et KUREISHY, T. W. (1978). Experimental studies on the accumulation of copper and zinc in the green mussel. *Marine Pollution Bulletin*, 9:187–190.
- DUNN, M. R. (1999). Aspects of the stock dynamics and exploitation of cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758), in the English Channel. *Fisheries Research*, 40(3):277–293.
- ENSERINK, E. L., MAAS-DIEPEVEEN, J. L. et VAN LEEUWEN, C. J. (1991). Combined effects of metals ; an ecotoxicological evaluation. *Water Research*, 25(6):679–687.
- ERK, M., MUYSSSEN, B. T. A., GHEKIERE, A. et JANSSEN, C. R. (2008a). Metallothionein and cellular energy allocation in the estuarine mysid shrimp *Neomysis integer* exposed to cadmium at different salinities. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 357(2):172–180.
- ERK, M., MUYSSSEN, B. T. A., GHEKIERE, A. et JANSSEN, C. R. (2008b). Metallothioneins and cytosolic metals in *Neomysis integer* exposed to cadmium at different salinities. *Marine Environmental Research*, 65(5):437–44.

- ESTABLIER, R. et PASCUAL, E. (1983). Efecto del cadmio y el cobre sobre el desarrollo de los huevos de *Sepia officinalis* Linneo. *Investigacion Pesquera*, 47(1):143–150.
- ETOURNEAU, C., FRANÇOISE, S., LAMORT, L., MARY, C., PARRAD, S., NORMAND, J. et MENET-NÉDELEC, F. (2013). Bulletin de la Surveillance de la Qualité du Milieu Marin Littoral 2012 - Départements : Seine Maritime, Eure, Calvados, Manche. Rapport technique, Ifremer.
- EUROPEAN COMMISSION JOINT RESEARCH CENTRE INSTITUTE FOR HEALTH AND CONSUMER PROTECTION (2010). European Union Risk Assessment Report - Zinc metal. Rapport technique, European Union, Italy.
- FAGOTTI, A., DI ROSA, I., SIMONCELLI, F., PIPE, R. K., PANARA, F. et PASCOLINI, R. (1996). The effects of copper on actin and fibronectin organization in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 20(6):383–91.
- FAGOTTO, F. (1995). Regulation of yolk degradation, or how to make sleepy lysosomes. *Journal of Cell Science*, 108:3645–7.
- FAN, T., LI, M., WANG, J., YANG, L. et CONG, R. (2009). Purification and characterization of phenoloxidase from *Octopus ocellatus*. *Acta Biochimica Biophysica Sinica*, 41(10):865–872.
- FATHALLAH, S., MEDHIOUB, M. N., MEDHIOUB, A. et KRAIEM, M. M. (2010). Toxicity of Hg, Cu and Zn on early developmental stages of the European clam (*Ruditapes decussatus*) with potential application in marine water quality assessment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 171(1-4):661–9.
- FAUCET, J., MAURICE, M., GAGNAIRE, B., RENAULT, T. et BURGEOT, T. (2003). Isolation and primary culture of gill and digestive gland cells from the common mussel *Mytilus edulis*. *Methods in Cell Science*, 25(3-4):177–84.
- FERREIRA, A., MARQUEZ, L., ALMANSA, E., ANDRADE, J. P., LORENZO, A. et DOMINGUES, P. M. (2009). The use of alternative diets to culture juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis* : effects on growth and lipid composition. *Aquaculture Nutrition*, 16(3):262–275.
- FIEDLER, A. et SCHIPP, R. (1987). The role of the branchial heart complex in circulation of coleoid cephalopods. *Experientia*, 43(5):544–553.
- FILIPIAK, M., BILSKA, E., TYLKO, G. et PYZA, E. (2010). Effects of zinc on programmed cell death of *Musca domestica* and *Drosophila melanogaster* blood cells. *Journal of Insect Physiology*, 56(4):383–90.
- FINGER, J. M. et SMITH, J. D. (1987). Molecular association of Cu, Zn, Cd and ^{210}Po in the digestive gland of the squid *Nototodarus gouldi*. *Marine Biology*, 95:87–91.
- FIOŁKA, M. J., ZAGAJA, M. P., HULAS-STASIAK, M. et WIELBO, J. (2012). Activity and immunodetection of lysozyme in earthworm *Dendrobaena veneta* (Annelida). *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(1):83–90.

- FIGORE, G., POLI, A., DI COSMO, A., D'ISCHIA, M. et PALUMBO, A. (2004). Dopamine in the ink defence system of *Sepia officinalis* : biosynthesis, vesicular compartmentation in mature ink gland cells, nitric oxide (NO)/cGMP-induced depletion and fate in secreted ink. *Biochemical Journal*, 378(Pt 3):785.
- FOCKEDEV, N. (2005). *Diet and growth of Neomysis integer (Leach, 1814) (Crustacea, Mysidacea)*. Thèse de doctorat, Wetenschappen Faculteit.
- FOCKEDEV, N. et MEES, J. (1999). Feeding of the hyperbenthic mysid *Neomysis integer* in the maximum turbidity zone of the Elbe , Westerschelde and Gironde estuaries. *Journal of Marine Systems*, 22(2-3):207–228.
- FOCKEDEV, N., MEES, J., VANGHELUWE, M., VERSLYCKE, T., JANSSEN, C. R. et VINCX, M. (2005). Temperature and salinity effects on post-marsupial growth of *Neomysis integer* (Crustacea : Mysidacea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 326(1):27–47.
- FORD, L. A. (1992). Host defense mechanisms of cephalopods. *Annual Review of Fish Diseases*, 2:25–41.
- FORSYTHE, J., LEE, P., WALSH, L. et CLARK, T. (2002). The effects of crowding on growth of the European cuttlefish, *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758 reared at two temperatures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 269(2):173–185.
- FORSYTHE, J. W., DERUSHA, R. H. et HANLON, R. T. (1994). Growth, reproduction and life span of *Sepia officinalis* (Cephalopoda : Mollusca) cultured through seven consecutive generations. *Journal of Zoology London*, 233:175–192.
- FRANCO, J. L., TRIVELLA, D. B. B., TREVISAN, R., DINSLAKEN, D. F., MARQUES, M. R. F., BAINY, A. C. D. et DAFRE, A. L. (2006). Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. *Chemico-Biological Interactions*, 160(3):232–40.
- FRANSSENS, V., SIMONET, G., BREUGELMANS, B., VAN SOEST, S., VAN HOEF, V. et VANDEN BROECK, J. (2008). The role of hemocytes, serine protease inhibitors and pathogen-associated patterns in prophenoloxidase activation in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Peptides*, 29(2):235–41.
- FRAYSSE, B., BAUDIN, J., GARNIER-LAPLACE, J., ADAM, C. et BOUDOU, A. (2002). Effects of Cd and Zn waterborne exposure on the uptake and depuration of ^{57}Co , $^{110\text{m}}\text{Ag}$ and ^{134}Cs by the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) and the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) - whole organism study. *Environmental Pollution*, 118:297–306.
- FREDERICKSON, C. J., SUH, S. W., SILVA, D., FREDERICKSON, C. J. et THOMPSON, R. B. (2000). Importance of zinc in the central nervous system : the zinc-containing neuron. *The Journal of Nutrition*, 130:1471S–1483S.

- FRY, B. G., ROELANTS, K. et NORMAN, J. A. (2009). Tentacles of venom : toxic protein convergence in the Kingdom Animalia. *Journal of Molecular Evolution*, 68(4):311–321.
- FUJIMOTO, S., GOTOH, H., OHBAYASHI, T., YAZAKI, H. et OHARA, A. (1993). Purification and characterization of zinc-dependent acid phosphatase from bovine brain. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 16:745–750.
- FUJITA, T. (2002). Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2(5):346–353.
- FUNES, V., ALHAMA, J., NAVAS, J. I., LÓPEZ-BAREA, J. et PEINADO, J. (2006). Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral. *Environmental Pollution*, 139(2):214–23.
- GAUVRIT, E., LE GOFF, R. et DAGUZAN, J. (1997). Reproductive cycle of the cuttlefish, *Sepia officinalis* (L.) in the northern part of the Bay of Biscay. *Journal of Molluscan Studies*, 63(1):19–28.
- GÉRARD-MONNIER, D., ERDELMEIER, I., RÉGNARD, K., MOZE-HENRY, N., YADAN, J.-C. et CHAUDIÈRE, J. (1998). Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical Research in Toxicology*, 11(10):1176–83.
- GERET, F. et COSSON, R. P. (2002). Induction of specific isoforms of metallothionein in mussel tissues after exposure to cadmium or mercury. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42(1):36–42.
- GERET, F., SERAFIM, A., BARREIRA, L. et BEBIANNO, M. J. a. (2002). Response of antioxidant systems to copper in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Marine Environmental Research*, 54(3-5):413–7.
- GHAFOORI, Z., HEIDARI, B., FARZADFAR, F. et AGHAMAALI, M. (2014). Variations of serum and mucus lysozyme activity and total protein content in the male and female Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*, Kamensky 1901) during reproductive period. *Fish & Shellfish Immunology*, 37(1):139–46.
- GHIRETTI, F. (1966). Molluscan hemocyanins. In WILBURG, K. M. et YOUNG, C. M., éditeurs : *Physiology of Mollusca*. Vol. II, pages 233–248. Academic press, London, New York.
- GIGUÈRE, A., COUILLARD, Y., CAMPBELL, P. G., PERCEVAL, O., HARE, L., PINEL-ALLOUL, B. et PELLERIN, J. (2003). Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology*, 64(2):185–200.
- GILDBERG, A. r. (1987). Purification and characterisation of cathepsin D from the digestive gland of the pelagic squid *Todarodes sagittatus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 39:85–94.
- GOEDKEN, M. et DE GUISE, S. (2004). Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish & Shellfish Immunology*, 16(4):539–52.

- GOMEZ, D., SUNYER, J. O. et SALINAS, I. (2013). The mucosal immune system of fish : the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6):1729–39.
- GÓMEZ-MENDIKUTE, A. et CAJARAVILLE, M. P. (2003). Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicology in Vitro*, 17(5-6):539–546.
- GOODSON, M. S., KOJADINOVIC, M., TROLL, J. V., SCHEETZ, T. E., CASAVANT, T. L., SOARES, M. B. et MCFALL-NGAI, M. J. (2005). Identifying components of the NF- κ B pathway in the beneficial *Euprymna scolopes* - *Vibrio fischeri* light organ symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11):6934–6946.
- GORBUSHIN, A. M. et IAKOVLEVA, N. V. (2007). Functional characterization of *Littorina littorea* (Gastropoda : Prosobranchia) blood cells. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87(03):741.
- GOTO, T., ABE, Y., KAKUTA, Y., TAKESHITA, K., IMOTO, T. et UEDA, T. (2007). Crystal structure of *Tapes japonica* Lysozyme with substrate analogue : structural basis of the catalytic mechanism and manifestation of its chitinase activity accompanied by quaternary structural change. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(37):27459–67.
- GRAS, M. (2013). *Contribution des frayères côtières au recrutement du stock de seiche Sepia officinalis de Manche : lien entre le succès de la phase pré-recrutée et l'abondance de la ressource*. Thèse de doctorat, Université de Caen Basse-Normandie.
- GRIGORIOU, P. et RICHARDSON, C. A. (2004). Aspects of the growth of cultured cuttlefish *Sepia officinalis* (Linnaeus 1758). *Aquaculture Research*, 35(12):1141–1148.
- GRIGORIOU, P. et RICHARDSON, C. A. (2008). The effect of ration size, temperature and body weight on specific dynamic action of the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Marine Biology*, 154(6):1085–1095.
- GRIGORIOU, P. et RICHARDSON, C. A. (2009). Effect of body mass, temperature and food deprivation on oxygen consumption rate of common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Marine Biology*, 156(12):2473–2481.
- GRIMALDI, A. M., BELCARI, P., PAGANO, E., CACIALLI, F. et LOCATELLO, L. (2013). Immune responses of *Octopus vulgaris* (Mollusca : Cephalopoda) exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 447:123–127.
- GRISLEY, M. S. et BOYLE, P. R. (1987). Bioassay and proteolytic activity of digestive enzymes from octopus saliva. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Comparative Biochemistry*, 88(4):1117–1123.
- GUERRA, A. et CASTRO, B. G. (1988). On the life cycle of *Sepia officinalis* in the Ria de Vigo. *Cahiers de Biologie Marine*, 29:395–405.

- HABIG, W. H., PABST, M. J. et JAKOBY, W. B. (1974). Glutathione S-Transferases, the first enzymatic steps in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22):7130–7139.
- HAFFNER, B. et WIESER, W. (1981). Environmental effects on the dopa oxidase system in the skin of *Rana temporaria* and *R. esculenta*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Comparative Biochemistry*, 68(1):57–63.
- HALLIWELL, B. et GUTTERIDGET, J. M. C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219:1–14.
- HAMEED, K. S. et HAARD, N. F. (1985). Isolation and characterization of cathepsin C from Atlantic short finned squid *Illex illecebrosus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Comparative Biochemistry*, 82(2):241–246.
- HANLON, R. T. et MESSENGER, J. B. (1988). Adaptive coloration in young cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) : the morphology and development of body patterns and their relation to behaviour. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences*, 320(1200):437–487.
- HANSEN, G. et OLAFSEN, J. A. (1999). Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microbial Ecology*, 38(1):1–26.
- HARFORD, A. J., O'HALLORAN, K. et WRIGHT, P. F. a. (2006). Flow cytometric analysis and optimisation for measuring phagocytosis in three Australian freshwater fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(4):562–73.
- HARMS, C. A., LEWBART, G. A., MCALARNEY, R., CHRISTIAN, L. S., GEISLER, K. et LEMONS, C. (2006). Surgical excision of mycotic (*Cladosporium sp.*) granulomas from the mantle of a cuttlefish (*Sepia officinalis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 37(4):524–30.
- HEATH-HECKMAN, E. A. C. et MCFALL-NGAI, M. J. (2011). The occurrence of chitin in the hemocytes of invertebrates. *Zoology*, 114(4):191–198.
- HÉGARET, H., WIKFORS, G. H. et SOUDANT, P. (2003). Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 293(2):249–265.
- HEMING, T. A., VANOYE, C. G., BROWN, S. E. et BIDANI, A. (1990). Cytoplasmic pH recovery in acid-loaded haemocytes of squid (*Sepioteuthis lessoniana*). *The Journal of Experimental Biology*, 148:385–94.
- HENNIG, H. F. (1986). Metal-binding proteins as metal pollution indicators. *Environmental Health Perspectives*, 65:175–87.
- HERREWEGHE, J. M. V. et MICHIELS, C. W. (2012). Invertebrate lysozymes : Diversity and distribution, molecular mechanism and *in vivo* function. *Journal of Biosciences*, 37(2):327–348.

- HIKIMA, J., MINAGAWA, S., HIRONO, I. et AOKI, T. (2001). Molecular cloning, expression and evolution of the Japanese flounder goose-type lysozyme gene, and the lytic activity of its recombinant protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1520(1):35–44.
- HOCHBERG, F. G. (1990). Diseases of Mollusca : Cephalopoda. Diseases caused by Protistans and Metazoans. In KINNE, O., éditeur : *Diseases of marine animals. Introduction, Cephalopoda, Annelida, Crustacea, Chaetognatha, Echinodermata, Urochordata, III*, pages 46–202. Biologische Anstalt, Helgoland, Hamburg, Germany.
- HOGSTRAND, C. (2012). Zinc. *Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*, 31A(11):135–200.
- HOLCOMBE, G. W., BENOIT, D. A. et LEONARD, E. N. (1979). Long-term effects of zinc exposures on brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Transactions of the American Fisheries Society*, 108(1):76–87.
- HONG, H.-K., KANG, H.-S., LE, T. C. et CHOI, K.-S. (2013). Comparative study on the hemocytes of subtropical oysters *Saccostrea kegaki* (Torigoe & Inaba, 1981), *Ostrea circumpicta* (Pilsbry, 1904), and *Hyotissa hyotis* (Linnaeus, 1758) in Jeju Island, Korea : Morphology and functional aspe. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6):2020–5.
- HOOK, S. E. et FISHER, N. S. (2002). Relating the reproductive toxicity of five ingested metals in calanoid copepods with sulfur affinity. *Marine Environmental Research*, 53(2):161–74.
- HOOPER, C., DAY, R., SLOCOMBE, R., HANDLINGER, J. et BENKENDORFF, K. (2007). Stress and immune responses in abalone : limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish & Shellfish Immunology*, 22(4):363–79.
- HOROWITZ, A. et PRESLEY, B. J. (1977). Trace metal concentrations and partitioning in zooplankton, neuston, and benthos from the south Texas outer continental shelf. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 5(2):241–255.
- HUGHES, B. P. et BARRITT, G. J. (1989). Inhibition of the liver cell receptor-activated Ca^{2+} inflow system by metal ion inhibitors of voltage-operated Ca^{2+} channels but not by other inhibitors of Ca^{2+} inflow. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1013(3):197–205.
- HUNTINGTON, J. A., READ, R. J. et CARRELL, R. W. (2000). Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, 407(6806):923–6.
- IBS, K.-H. et RINK, L. (2003). Zinc-altered immune function. *The Journal of Nutrition*, 133:1452S–1456S.
- ICHIHASHI, H., KOHNO, H., KANNAN, K., TSUMURA, A. et YAMASAKI, S.-I. (2001a). Multielemental analysis of purpleback flying squid using high resolution inductively coupled plasma-mass spectrometry (HR ICP-MS). *Environmental Science & Technology*, 35:3103–3108.

- ICHIHASHI, H., NAKAMURA, Y., KANNAN, K., TSUMURA, A. et YAMASAKI, S. (2001b). Multi-elemental concentrations in tissues of Japanese common squid (*Todarodes pacificus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(4):483–90.
- IFREMER (2007). Les contaminants chimiques dans les huîtres et les moules du littoral français.
- IFREMER (2011). Contaminants chimiques - Réseau d'Observation de la Contamination Chimique du milieu marin (ROCCH).
- INERIS (2010). Zinc et principaux composés. Rapport technique.
- IREP (2010). Emissions du zinc et ses composés dans l'air.
- ISHIKAWA, S., NAKAMURA, K., SHUDO, K. et KITABAYASHI, K. (1966). Studies on fish soluble I-protease inhibitor in squid liver. *Suisancho Hokkaido-ku Suisan Kenkyusho Kenkyu Hokoku*, 31:112–119.
- ITOH, N., OKADA, Y., TAKAHASHI, K. G. et OSADA, M. (2010). Presence and characterization of multiple mantle lysozymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(1):126–135.
- ITOH, N. et TAKAHASHI, K. G. (2007). cDNA cloning and in situ hybridization of a novel lysozyme in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry & Molecular Biology*, 148(2):160–166.
- IWANAGA, S. et LEE, B. L. (2005). Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38(2):128–150.
- JACKSON, G. et MOLTSCHANIWSKYJ, N. (2002). Spatial and temporal variation in growth rates and maturity in the Indo-Pacific squid *Sepioteuthis lessoniana* (Cephalopoda : Loliginidae). *Marine Biology*, 140(4):747–754.
- JANKNEGT, P. J., RIJSTENBIL, J. W., van de POLL, W. H., GECHEV, T. S. et BUMA, A. G. J. (2007). A comparison of quantitative and qualitative superoxide dismutase assays for application to low temperature microalgae. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B : Biology*, 87(3):218–26.
- JAUZEIN, C., DONAGHY, L. et VOLETY, A. K. (2013). Flow cytometric characterization of hemocytes of the sunray venus clam *Macrocallista nimbosa* and influence of salinity variation. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(3):716–24.
- JEREB, P., ROPER, C. F. E. et VECCHIONE, M. (2005). Introduction. In JEREB, P. et ROPER, C. F. E., éditeurs : *Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species known to date. Volume 1. Chambered nautilus and sepioids (Nautilidae, Sepiidae, Sepiolidae, Sepiadariidae, Idiospiidae and Spirulidae)*, pages 1–19. Rome, fao édition.

- JING, G., LI, Y., XIE, L. et ZHANG, R. (2006). Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, 144(2):184–190.
- JORGE, R. A. D. L. V. C. et MOREIRA, G. S. (2005). Use of sodium dodecyl sulfate and zinc sulfate as reference substances for toxicity tests with the mussel *Perna perna* (Linnaeus, 1758) (Mollusca : Bivalvia). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(2):280–5.
- JUNG, K. et ZAUKE, G.-P. (2008). Bioaccumulation of trace metals in the brown shrimp *Crangon crangon* (Linnaeus, 1758) from the German Wadden Sea. *Aquatic Toxicology*, 88(4):243–9.
- KALOYIANNI, M., RAGIA, V., TZERANAKI, I. et DAILIANIS, S. (2006). The influence of Zn on signaling pathways and attachment of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes to extracellular matrix proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, 144(1):93–100.
- KANDA, A., IWAKOSHI-UKENA, E., TAKUWA-KURODA, K. et MINAKATA, H. (2003). Isolation and characterization of novel tachykinins from the posterior salivary gland of the common octopus *Octopus vulgaris*. *Peptides*, 24(1):35–43.
- KATSUMITI, A., GILLILAND, D., AROSTEGUI, I. et CAJARAVILLE, M. P. (2014). Cytotoxicity and cellular mechanisms involved in the toxicity of CdS quantum dots in hemocytes and gill cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 153:39–52.
- KING, A. J., HENDERSON, S. M., SCHMIDT, M. H., COLE, A. G. et ADAMO, S. A. (2005). Using ultrasound to understand vascular and mantle contributions to venous return in the cephalopod *Sepia officinalis* L. *The Journal of Experimental Biology*, 208(Pt 11):2071–2082.
- KING, C. K., GALE, S. A., HYNE, R. V., STAUBER, J. L., SIMPSON, S. L. et HICKEY, C. W. (2006). Sensitivities of Australian and New Zealand amphipods to copper and zinc in waters and metal-spiked sediments. *Chemosphere*, 63(9):1466–76.
- KISHIMURA, H., NAGAI, Y., FUKUMORITA, K., CHIBA, S., NAKAJIMA, S., KLOMKLAO, S., NALINANON, S., BENJAKUL, S. et CHUN, B.-S. (2010). Acid- and heat-stable trypsin inhibitory peptide from the viscera of japanese common squid (*Todarodes pacificus*). *Journal of Food Biochemistry*, 34(4):748–763.
- KISHIMURA, H., SAEKI, H. et HAYASHI, K. (2001). Isolation and characteristics of trypsin inhibitor from the hepatopancreas of a squid (*Todarodes pacificus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry & Molecular Biology*, 130(1):117–123.
- KOJADINOVIC, J., JACKSON, C. H., CHEREL, Y., JACKSON, G. D. et BUSTAMANTE, P. (2011). Multi-elemental concentrations in the tissues of the oceanic squid *Todarodes filippovae* from Tasmania and the southern Indian Ocean. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(5):1238–49.

- KOLARICH, D., LEPENIES, B. et SEEBERGER, P. H. (2012). Glycomics, glycoproteomics and the immune system. *Current Opinion in Chemical Biology*, 16(1-2):214–20.
- KONDO, M., TOMANAGA, S. et TAKAHASHI, Y. (2003). Morphology of octopus hemocytes. *Journal of National Fisheries University*, 4:157–164.
- KOUEA, N. et BOUCAUD-CAMOU, E. (1999). Food intake and growth in reared early juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 240(1):93–109.
- KOUEA, N. et BOUCAUD-CAMOU, E. (2001). Basic growth relations in experimental rearing of early juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca : Cephalopoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 265:75–87.
- KOUEA, N., BOUCAUD-CAMOU, E. et NOEL, B. (2002). Effect of enriched natural diet on survival and growth of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. *Aquaculture*, 203(3-4):293–310.
- KOUEA, N., CASTRO, B. G. et BOUCAUD-CAMOU, E. (2000). Biochemical indices for instantaneous growth estimation in young cephalopod *Sepia officinalis* L. *ICES Journal of Marine Sciences*, 57(1):1–7.
- KOUTSOGIANNAKI, S., EVANGELINOS, N., KOLIAKOS, G. et KALOYIANNI, M. (2006). Cytotoxic mechanisms of Zn^{2+} and Cd^{2+} involve Na^{+}/H^{+} exchanger (NHE) activation by ROS. *Aquatic Toxicology*, 78(4):315–24.
- KOYAMA, J., NANAMORI, N. et SEGAWA, S. (2000). Bioaccumulation of waterborne and dietary cadmium by oval squid, *Sepioteuthis lessoniana*, and its distribution among organs. *Marine Pollution Bulletin*, 40(11):961–967.
- LACHAMBRE, M. et FISSON, C. (2007a). La contamination chimique : quel risque en estuaire de Seine - Fiche substance : Argent. Rapport technique, GIP Seine-Aval.
- LACHAMBRE, M. et FISSON, C. (2007b). La contamination chimique : quel risque en estuaire de Seine - Fiche substance : Arsenic. Rapport technique, GIP Seine-Aval.
- LACHAMBRE, M. et FISSON, C. (2007c). La contamination chimique : quel risque en estuaire de Seine - Fiche substance : Zinc. Rapport technique, GIP Seine-Aval.
- LACOUÉ-LABARTHE, T. (2007). *Incorporation des métaux dans les œufs de la seiche commune Sepia officinalis et effets potentiels sur les fonctions digestives et immunitaires*. Thèse de doctorat, Université La Rochelle.
- LACOUÉ-LABARTHE, T., BUSTAMANTE, P., HÖRLIN, E., LUNA-ACOSTA, A., BADO-NILLES, A. et THOMAS-GUYON, H. (2009a). Phenoloxidase activation in the embryo of the common cuttlefish *Sepia officinalis* and responses to the Ag and Cu exposure. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(3):516–521.

- LACOUÉ-LABARTHE, T., LE BIHAN, E., BORG, D., KOUETA, N. et BUSTAMANTE, P. (2010a). Acid phosphatase and cathepsin activity in cuttlefish (*Sepia officinalis*) eggs : the effects of Ag, Cd, and Cu exposure. *ICES Journal of Marine Sciences*, 67:1517–1523.
- LACOUÉ-LABARTHE, T., MARTIN, S., OBERHÄNSLI, F., TEYSSIE, J.-L., MARKICH, S., JEFFREE, R. et BUSTAMANTE, P. (2009b). Effects of increased $p\text{CO}_2$ and temperature on trace element (Ag, Cd and Zn) bioaccumulation in the eggs of the common cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Biogeosciences*, 6(2):2561–2573.
- LACOUÉ-LABARTHE, T., VILLANUEVA, R., ROULEAU, C., OBERHÄNSLI, F., TEYSSIE, J.-L., JEFFREE, R. et BUSTAMANTE, P. (2011). Radioisotopes demonstrate the contrasting bioaccumulation capacities of heavy metals in embryonic stages of cephalopod species. *PLOS ONE*, 6(11):e27653.
- LACOUÉ-LABARTHE, T., WARNAU, M., METIAN, M., OBERHÄNSLI, F., ROULEAU, C. et BUSTAMANTE, P. (2009c). Biokinetics of Hg and Pb accumulation in the encapsulated egg of the common cuttlefish *Sepia officinalis* : radiotracer experiments. *The Science of the Total Environment*, 407(24):6188–6195.
- LACOUÉ-LABARTHE, T., WARNAU, M., OBERHÄNSLI, F., TEYSSIE, J.-L. et BUSTAMANTE, P. (2009d). Bioaccumulation of inorganic Hg by the juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* exposed to ^{203}Hg radiolabelled seawater and food. *Aquatic Biology*, 6:91–98.
- LACOUÉ-LABARTHE, T., WARNAU, M., OBERHÄNSLI, F., TEYSSIE, J.-L. et BUSTAMANTE, P. (2010b). Contrasting accumulation biokinetics and distribution of ^{241}Am , Co, Cs, Mn and Zn during the whole development time of the eggs of the common cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 382(2):131–138.
- LACOUÉ-LABARTHE, T., WARNAU, M., OBERHÄNSLI, F., TEYSSIE, J.-L., JEFFREE, R. et BUSTAMANTE, P. (2008a). First experiments on the maternal transfer of metals in the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Marine Pollution Bulletin*, 57:826–831.
- LACOUÉ-LABARTHE, T., WARNAU, M., OBERHÄNSLI, F., TEYSSIE, J.-L., KOUETA, N. et BUSTAMANTE, P. (2008b). Differential bioaccumulation behaviour of Ag and Cd during the early development of the cuttlefish *Sepia officinalis*. *Aquatic Toxicology*, 86(3):437–446.
- LAMBERT, C., SOUDANT, P., CHOQUET, G. et PAILLARD, C. (2003). Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish & Shellfish Immunology*, 15(3):225–240.
- LARSEN, A. N., SOLSTAD, T., SVINENG, G. r., SEPPOLA, M. et JØRGENSEN, T. O. (2009). Molecular characterisation of a goose-type lysozyme gene in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 26(1):122–32.

- LATIRE, T., LE PABIC, C., MOTTIN, E., MOTTIER, A., COSTIL, K., KOUETA, N., LEBEL, J.-M. et SERPENTINI, A. (2012). Responses of primary cultured haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata* under 10-day exposure to cadmium chloride. *Aquatic Toxicology*, 109:213–21.
- LAUGHLIN, R. et LINDEN, O. (1983). Oil pollution and Baltic mysids : acute and chronic effects of the water soluble fractions of light fuel oil on the mysid shrimp *Neomysis integer*. *Marine Ecology Progress Series*, 12:29–41.
- LE BIHAN, E., PERRIN, A. et KOUETA, N. (2004). Development of a bioassay from isolated digestive gland cells of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda) : effect of Cu, Zn and Ag on enzyme activities and cell viability. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 309(1):47–66.
- LE BRIS, C., LEPRETRE, M., PAILLARD, C. et GUÉRARD, F. (2014). Characterization of a laccase-like activity in the hemolymph of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Aquaculture*, 424-425:194–200.
- LE BRIS, C., PAILLARD, C., STIGER-POUVREAU, V. et GUÉRARD, F. (2013). Laccase-like activity in the hemolymph of *Venerupis philippinarum* : characterization and kinetic properties. *Fish & shellfish immunology*, 35(6):1804–12.
- LE GOFF, R. et DAGUZAN, J. (1991). Growth and life cycles of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca : Cephalopoda) in South Brittany (France). *Bulletin of Marine Science*, 49(1-2):341–348.
- LE PABIC, C. (2014). *Effets du zinc sur la physiologie du stade juvénile de la seiche commune Sepia officinalis et étude du système immunitaire pour le développement d'outils in vitro*. Thèse de doctorat, Université de Caen Basse-Normandie.
- LE PABIC, C., GOUX, D., SERPENTINI, A., LEBEL, J.-M. et KOUETA, N. (2012). Characterization of *Sepia officinalis* haemocytes, primary-culture development and enzymatic assays on serum and haemocyte fractions. In *Cephalopod International Advisory Council Symposium - Official Program*, page 41, Florianopolis, SC, Brazil.
- LEBEL, J. M., GIARD, W., FAVREL, P. et BOUCAUD-CAMOU, E. (1996). Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata*. *Biology of the Cell*, 86(1):67–72.
- LECOINTRE, G. et LE GUYADER, H. (2001). Les Mollusques. In *Classification phylogénétique du vivant*, chapitre 9, pages 268–299. Paris, bellin édition.
- LEHMANN, F., TIRALONGO, E. et TIRALONGO, J. (2006). Sialic acid-specific lectins : occurrence, specificity and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(12):1331–54.
- LEMAIRE, J., RICHARD, A. et DECLEIR, W. (1977). Le foie embryonnaire de *Sepia officinalis* L. (mollusque cephalopode) : 1. Organogenèse. *Haliotis*, 6:287–296.

- LEMOINE, S., BIGOT, Y., SELLOS, D., COSSON, R. P. et LAULIER, M. (2000). Metallothionein isoforms in *Mytilus edulis* (Mollusca, Bivalvia) : complementary DNA characterization and quantification of expression in different organs after exposure to cadmium, zinc, and copper. *Marine Biotechnology*, 2:195–203.
- LI, C., ZHAO, J. et SONG, L. (2009). A review of advances in research on marine molluscan antimicrobial peptides and their potential application in aquaculture. *Molluscan Research*, 29(1):17–26.
- LIU, F. et WANG, W.-X. (2013). Facilitated bioaccumulation of cadmium and copper in the oyster *Crassostrea hongkongensis* solely exposed to zinc. *Environmental Science & Technology*, 47(3):1670–7.
- LIU, F. et WANG, W.-X. (2014). Differential influences of Cu and Zn chronic exposure on Cd and Hg bioaccumulation in an estuarine oyster. *Aquatic Toxicology*, 148:204–10.
- LOCATELLO, L., FIORITO, G., FINOS, L. et RASOTTO, M. B. (2013). Behavioural and immunological responses to an immune challenge in *Octopus vulgaris*. *Physiology & Behavior*, 122:93–9.
- LOKER, E. S., ADEMA, C. M., ZHANG, S.-M. et KEPLER, T. B. (2004). Invertebrate immune systems-not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological Reviews*, 198:10–24.
- LÓPEZ, C., CARBALLAL, M. J., AZEVEDO, C. et VILLALBA, A. (1997a). Enzyme characterisation of the circulating haemocytes of the carpet shell clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca : bivalvia). *Fish & Shellfish Immunology*, 7(8):595–608.
- LÓPEZ, C., CARBALLAL, M. J., AZEVEDO, C. et VILLALBA, A. (1997b). Morphological characterization of the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca : Bivalvia). *Journal of Invertebrate Pathology*, 69(1):51–7.
- LOTZ, J. M. (1997). Special topic review : Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 13:405–413.
- LOWE, D. M., SOVERCHIAI, C. et MOORE, M. N. (1995). Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquatic Toxicology*, 33:105–112.
- LUNA-ACOSTA, A. (2010). *Les phénoloxydases chez l'huître creuse Crassostrea gigas : biomarqueurs potentiels de stress environnemental*. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle.
- LUNA-ACOSTA, A., KANAN, R., LE FLOCH, S., HUET, V., PINEAU, P., BUSTAMANTE, P. et THOMAS-GUYON, H. (2011a). Enhanced immunological and detoxification responses in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, exposed to chemically dispersed oil. *Water Research*, 45(14):4103–4118.
- LUNA-ACOSTA, A., ROSENFELD, E., AMARI, M., FRUITIER-ARNAUDIN, I., BUSTAMANTE, P. et THOMAS-GUYON, H. (2010). First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(4):719–726.

- LUNA-ACOSTA, A., THOMAS-GUYON, H., AMARI, M., ROSENFELD, E., BUSTAMANTE, P. et FRUITIER-ARNAUDIN, I. (2011b). Differential tissue distribution and specificity of phenoloxidases from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry & Molecular Biology*, 159(4):220–226.
- MACKINTOSH, J. A. (2001). The antimicrobial properties of melanocytes, melanosomes and melanin and the evolution of black skin. *Journal of Theoretical Biology*, 211(2):101–113.
- MAHILINI, H. M. et RAJENDRAN, A. (2008). Categorization of hemocytes of three gastropod species *Trachea vittata* (Muller), *Pila globosa* (Swainson) and *Indoplanorbis exustus* (Dehays). *Journal of Invertebrate Pathology*, 97(1):20–6.
- MAI, W., LIU, P., CHEN, H. et ZHOU, Y. (2014). Cloning and immune characterization of the c-type lysozyme gene in red-spotted grouper, *Epinephelus akaara*. *Fish & Shellfish Immunology*, 36(1):305–14.
- MALANGA, G., ESTEVEZ, M. S., CALVO, J. et PUNTARULO, S. (2004). Oxidative stress in limpets exposed to different environmental conditions in the Beagle Channel. *Aquatic Toxicology*, 69(4):299–309.
- MALHAM, S. K. (1996). *Immunobiology of Eledone cirrhosa (Lamarck)*. Thèse de doctorat, University of Wales, Bangor, North Wales, UK.
- MALHAM, S. K., COULSON, C. L. et RUNHAM, N. W. (1998a). Effects of repeated sampling on the haemocytes and haemolymph of *Eledone cirrhosa* (Lam.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Molecular & Integrative Physiology*, 121(4):431–440.
- MALHAM, S. K., LACOSTE, A., GÉLÉBART, F., CUEFF, A. et POULET, S. A. (2002). A first insight into stress-induced neuroendocrine and immune changes in the octopus *Eledone cirrhosa*. *Aquatic Living Resources*, 15(3):187–192.
- MALHAM, S. K., RUNHAM, N. W. et SECOMBES, C. J. (1997). Phagocytosis by haemocytes from the Lesser Octopus *Eledone cirrhosa*. *Iberus*, 15(2):1–11.
- MALHAM, S. K., RUNHAM, N. W. et SECOMBES, C. J. (1998b). Lysozyme and antiprotease activity in the lesser octopus *Eledone cirrhosa* (Lam.) (Cephalopoda). *Developmental & Comparative Immunology*, 22(1):27–37.
- MALIK, D. S., SASTRY, K. V. et HAMILTON, D. P. (1998). Effects of zinc toxicity on biochemical composition of muscle and liver of murrel (*Channa punctatus*). *Environment International*, 24(4):433–438.
- MANGOLD, K. (1966). *Sepia officinalis* de la mer Catalane. *Vie Et Milieu - Life & Environment*, 17:961–1012.
- MANGOLD, K. et BIDDER, A. M. (1989a). Appareils respiratoire et circulatoire : respiration et circulation. In *Traité de Zoologie, Anatomie, systématique, biologie. Céphalopodes, tome V*, pages 387–434. Grassé, Pierre-Paul, Paris, masson édition.

- MANGOLD, K. et BIDDER, A. M. (1989b). L'appareil digestif et la digestion. In *Traité de Zoologie, Anatomie, systématique, biologie. Céphalopodes, tome V*, pages 321–373. Grassé, Pierre-Paul, Paris, masson édition.
- MANUBENS, A., SALAZAR, F., HAUSSMANN, D., FIGUEROA, J., DEL CAMPO, M., PINTO, J. M., HUAQUÍN, L., VENEGAS, A. et BECKER, M. I. (2010). Concholepas hemocyanin biosynthesis takes place in the hepatopancreas, with hemocytes being involved in its metabolism. *Cell and Tissue Research*, 342(3):423–435.
- MAO, A., MAHAUT, M.-L., PINEAU, S., BARILLIER, D. et CAPLAT, C. (2011). Assessment of sacrificial anode impact by aluminum accumulation in mussel *Mytilus edulis* : a large-scale laboratory test. *Marine Pollution Bulletin*, 62(12):2707–13.
- MARIGÓMEZ, I., SOTO, M., CAJARAVILLE, M. P., ANGULO, E. et GIAMBERINI, L. (2002). Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique*, 56(5):358–92.
- MARTIN, J. H. et FLEGAL, A. R. (1975). High copper concentrations in squid livers in association with elevated levels of silver, cadmium, and zinc. *Marine Biology*, 30(1):51–55.
- MARTIN, M., OSBORN, K. E., BILLIG, P. et GLICKSTEIN, N. (1981). Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Marine Pollution Bulletin*, 12(9):305–308.
- MARTÍNEZ, M., DEL RAMO, J., TORREBLANCA, A. et DÍAZ-MAYANS, J. (1999). Effect of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp *Artemia parthenogenetica*. *Aquaculture*, 172:315–325.
- MARTÍNEZ, R., LÓPEZ-RIPOLL, E., AVILA-POVEDA, O., SANTOS-RICALDE, R., MASCARÓ, M. et ROSAS, C. (2011). Cytological ontogeny of the digestive gland in post-hatching *Octopus maya*, and cytological background of digestion in juveniles. *Aquatic Biology*, 11(3):249–261.
- MARTOJA, M. et MARCAILLOU, C. (1993). Localisation cytologique du cuivre et de quelques autres métaux dans la glande digestive de la seiche, *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50:542–550.
- MASON, A. Z. et JENKINS, K. D. (1995). Metal detoxification in aquatic organisms. In TESSIER, A. et TURNER, D. R., éditeurs : *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, pages 479–608. Chichester, UK, John Wiley édition.
- MASUDA, T., OTOMO, R., KUYAMA, H., MOMOJI, K., TONOMOTO, M., SAKAI, S., NISHIMURA, O., SUGAWARA, T. et HIRATA, T. (2012). A novel type of prophenoloxidase from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* contributes to the melanization of plasma in crustaceans. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(1):61–68.
- MATHER, J. A. (1986). Sand digging in *Sepia officinalis* : assessment of a cephalopod mollusc's "fixed" behavior pattern. *Journal of Comparative Psychology*, 100(3):315–320.

- MATOZZO, V., BALLARIN, L., PAMPANIN, D. M. et MARIN, M. G. (2001). Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(2):163–70.
- MATOZZO, V., ROVA, G. et MARIN, M. G. (2007). Haemocytes of the cockle *Cerastoderma glaucum* : morphological characterisation and involvement in immune responses. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(4): 732–46.
- MATRICON-GONDRAN, M. et LETOCART, M. (1999). Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74(3):248–54.
- MATSUBARA, H., OGAMA, T. et MURAMAOTO, K. (2006). Structures and functions of C-type lectins in marine invertebrates. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 57(1-2):71–86.
- MAZORRA, M. T., RUBIO, J. A. et BLASCO, J. (2002). Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana* : kinetic characteristics and effects of heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry & Molecular Biology*, 131(2):241–9.
- MCCALL, K. A., HUANG, C.-c. et FIERKE, C. A. (2000). Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *The Journal of Nutrition*, 130:1437S–1446S.
- McFALL-NGAI, M. J., NYHOLM, S. V. et CASTILLO, M. G. (2010). The role of the immune system in the initiation and persistence of the *Euprymna scolopes-Vibrio fischeri* symbiosis. *Seminars in Immunology*, 22(1):48–53.
- MELZNER, F., BOCK, C. et PÖRTNER, H.-O. (2007a). Allometry of thermal limitation in the cephalopod *Sepia officinalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Molecular & Integrative Physiology*, 146(2):149–54.
- MELZNER, F., MARK, F. C. et PÖRTNER, H.-O. (2007b). Role of blood-oxygen transport in thermal tolerance of the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Integrative and Comparative Biology*, 47(4):645–655.
- MESSENGER, J. B. (1968). The visual attack of the cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Animal Behaviour*, 16(2):342–57.
- MESSENGER, J. B. (2001). Cephalopod chromatophores : neurobiology and natural history. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 76(4):473–528.
- MIRAMAND, P. (1998). Concentrations en métaux lourds (Cd, Cu, Pb, Zn) observées le long du gradient de salinité dans le réseau trophique pélagique de l'estuaire de la Seine. *Oceanography*, 327:259–264.
- MIRAMAND, P. et BENTLEY, D. (1992). Concentration and distribution of heavy metals in tissues of two cephalopods, *Eledone cirrhosa* and *Sepia officinalis*, from the French coast of the English Channel. *Marine Biology*, 114:407–414.

- MIRAMAND, P., BUSTAMANTE, P., BENTLEY, D. et KOUETA, N. (2006). Variation of heavy metal concentrations (Ag, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, V, and Zn) during the life cycle of the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *The Science of the Total Environment*, 361(1-3):132–143.
- MIRAMAND, P. et GUARY, J. C. (1980). High concentrations of some heavy metals in tissues of the Mediterranean *Octopus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 24(1):783–788.
- MIRAMAND, P., GUARY, J. C. et FOWLER, S. W. (1980). Vanadium transfer in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Biology*, 293:281–293.
- MIRAMAND, P., RYBARCZYK, H., MOUNY, P., GUYOT, T., BESSINETON, C., ELKAIM, B. et DAUVIN, J.-C. (1998). Approche écosystémique de la contamination du compartiment biologique de l'estuaire de la Seine par les métaux lourds (Cd, Cu, Pb, Zn) : bilan (1995-1998). Rapport technique 1.
- MITTA, G., VANDENBULCKE, F., HUBERT, F. et ROCH, P. (1999). Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *Journal of Cell Science*, 112(23):4233–42.
- MONTES, J. F., DURFORT, M. et GARCÍA-VALERO, J. (1995). Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus* sp. *Cell and Tissue Research*, 279:529–538.
- MORISHITA, T. (1972). On the existence of cathepsins A, B and C in octopus liver. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 38(9):1057–1060.
- MOTTIN, E., CAPLAT, C., LATIRE, T., MOTTIER, A., MAHAUT, M.-L., COSTIL, K., BARILLIER, D., LEBEL, J.-M. et SERPENTINI, A. (2012). Effect of zinc sacrificial anode degradation on the defence system of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* : chronic and acute exposures. *Marine Pollution Bulletin*, 64(9):1911–20.
- MOTTIN, E., CAPLAT, C., MAHAUT, M.-L., COSTIL, K., BARILLIER, D., LEBEL, J.-M. et SERPENTINI, A. (2010). Effect of *in vitro* exposure to zinc on immunological parameters of haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(5):846–53.
- MOUNEYRAC, C., AMIARD, J.-C., AMIARD-TRIQUET, C., COTTIER, A., RAINBOW, P. S. et SMITH, B. D. (2002). Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestia gamma-rellus* : a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 57(4):225–42.
- MOUNT, A. S., WHEELER, A. P., PARADKAR, R. P. et SNIDER, D. (2004). Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. *Science*, 304(5668):297–300.
- MOYANO, F. J., DÍAZ, M., ALARCÓN, F. J. et SARASQUETE, M. C. (1996). Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 15(2):121–30.

- MUZII, E. (1981). Intracellular polymerized haemocyanin in the branchial gland of a cephalopod. *Cell and Tissue Research*, 220(2):435–438.
- NADELLA, S. R., TELLIS, M. S., DIAMOND, R., SMITH, S., BIANCHINI, A. et WOOD, C. M. (2013). Toxicity of lead and zinc to developing mussel and sea urchin embryos : critical tissue residues and effects of dissolved organic matter and salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, 158(2):72–83.
- NAGAI, H. (2012). Protein Toxin of Cephalopods. In FATTORUSSO, E., GERWICK, W. H. et TAGLIALATELA-SCAFATI, O., éditeurs : *Handbook of Marine Natural Products*, chapitre 29, pages 1412–1413. Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht.
- NAKAYAMA, K., NOMOTO, A., NISHIJIMA, M. et MARUYAMA, T. (1997). Morphological and functional characterization of hemocytes in the giant clam *Tridacna crocea*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 69(2):105–11.
- NAPOLEÃO, P., PINHEIRO, T. et SOUSA REIS, C. (2005). Elemental characterization of tissues of *Octopus vulgaris* along the Portuguese coast. *The Science of the Total Environment*, 345(1-3):41–9.
- NARAOKA, T., CHUNG, H.-S., UCHISAWA, H., SASAKI, J.-i. et MATSUE, H. (2000). Tyrosinase activity in antitumor compounds of squid ink. *Food Science and Technology Research*, 6(3):171–175.
- NARAOKA, T., UCHISAWA, H., MORI, H., MATSUE, H., CHIBA, S. et KIMURA, A. (2003). Purification, characterization and molecular cloning of tyrosinase from the cephalopod mollusk, *Illex argentinus*. *European Journal of Biochemistry*, 270(19):4026–4038.
- NATIONAL ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1989). Water Quality Standard for Fisheries. Rapport technique, GB 11607-89, Beijing.
- NEUMANN, N. F., STAFFORD, J. L., BARREDA, D., AINSWORTH, A. J. et BELOSEVIC, M. (2001). Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental & Comparative Immunology*, 25(8-9):807–825.
- NÍ SHÚILLEABHÁIN, S., MOTHERSILL, C., SHEEHAN, D., O'BRIEN, N. M., O' HALLORAN, J., van PELT, F. N. A. M., KILEMADE, M. et DAVOREN, M. (2006). Cellular responses in primary epidermal cultures from rainbow trout exposed to zinc chloride. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(3):332–41.
- NICHOLSON, S. (2003). Lysosomal membrane stability, phagocytosis and tolerance to emersion in the mussel *Perna viridis* (Bivalvia : Mytilidae) following exposure to acute, sublethal, copper. *Chemosphere*, 52(7):1147–51.
- NIEBÆR, E. et RICHARDSON, D. H. S. (1980). The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution*, 1:3–26.

- NIMMO, D. R. et HAMAKER, T. L. (1982). Mysids in toxicity testing - a review. *Hydrobiologia*, 93:171–178.
- NYHOLM, S. V. et MCFALL-NGAI, M. J. (1998). Sampling the light-organ microenvironment of *Euprymna scolopes* : description of a population of host cells in association with the bacterial symbiont *Vibrio fischeri*. *The Biological Bulletin*, 195(2):89–97.
- NZENGUE, Y., STEIMAN, R., GARREL, C., LEFÈBVRE, E. et GUIRAUD, P. (2008). Oxidative stress and DNA damage induced by cadmium in the human keratinocyte HaCaT cell line : role of glutathione in the resistance to cadmium. *Toxicology*, 243(1-2):193–206.
- O'DELL, B. L. (2000). Role of zinc in plasma membrane function. *The Journal of Nutrition*, 130:1432S–1436S.
- OESTMANN, D. J., SCIMECA, J. M., FORSYTHE, J., HANLON, R. T. et LEE, P. (1997). Special considerations for keeping cephalopods in laboratory facilities. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 36(2):89–93.
- OLABARRIETA, I., AZOU, B. L., YURIC, S., CAMBAR, J. et CAJARAVILLE, M. P. (2001). In vitro effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicology in Vitro*, 15:511–517.
- ORDAS, M. C., NOVOA, B. et FIGUERAS, A. (1999). Phagocytosis inhibition of clam and mussel haemocytes by *Perkinsus atlanticus* secretion products . *Fish & Shellfish Immunology*, 9:491–503.
- PALUMBO, A., di COSMO, A., GESUALDO, I. et HEARING, V. J. (1997). Subcellular localization and function of melanogenic enzymes in the ink gland of *Sepia officinalis*. *Biochemical Journal*, 323(Pt 3):749–756.
- PAMPANIN, D. M., MARIN, M. G. et BALLARIN, L. (2002). Morphological and cytoenzymatic characterization of haemocytes of the venus clam *Chamelea gallina*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 49(3):227–34.
- PAN, K. et WANG, W.-X. (2012). Reconstructing the biokinetic processes of oysters to counteract the metal challenges : physiological acclimation. *Environmental Science & Technology*, 46(19):10765–71.
- PANARA, F. (1997). Acid phosphatases of *Esox lucius* : tissue distribution and partial characterization. *Journal of Fish Biology*, 51:275–283.
- PANARA, F., ANGIOLILLO, A., DI ROSA, I. et PASCOLINI, R. (1993). Comparative biochemistry of vertebrate acid phosphatases. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*, 1:675–692.
- PAOLETTI, F., ALDINUCCI, D., MOCALI, A. et CAPARRINI, A. (1986). A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, 154:536–541.
- PARK, J.-W., KIM, C.-H., KIM, J.-H., JE, B.-R., ROH, K.-B., KIM, S.-J., LEE, H.-H., RYU, J.-H., LIM, J.-H., OH, B.-H., LEE, W.-J., HA, N.-C. et LEE, B.-L. (2007). Clustering of peptidoglycan recognition protein-SA is required for sensing lysine-type peptidoglycan in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(16):6602–7.

- PAYNE, A. G., AGNEW, D. J. et PIERCE, G. J. (2006). Trends and assessment of cephalopod fisheries. *Fisheries Research*, 78(1):1–3.
- PÉREZ-LOSADA, M., GUERRA, A., CARVALHO, G. R., SANJUAN, A. et SHAW, P. W. (2002). Extensive population subdivision of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca : Cephalopoda) around the Iberian Peninsula indicated by microsatellite DNA variation. *Heredity*, 89(6):417–424.
- PÉREZ-LOSADA, M., NOLTE, M. J., CRANDALL, K. a. et SHAW, P. W. (2007). Testing hypotheses of population structuring in the Northeast Atlantic Ocean and Mediterranean Sea using the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Molecular Ecology*, 16(13):2667–2679.
- PERNICE, M., PICHON, D., DOMART-COULON, I., FAVET, J. et BOUCHER-RODONI, R. (2007). Primary co-culture as a complementary approach to explore the diversity of bacterial associations in marine invertebrates : the example of *Nautilus macromphalus* (Cephalopoda : Nautiloidea). *Marine Biology*, 150(5):749–757.
- PERRIN, A. (2004). *Etude expérimentale des capacités digestives chez la seiche, Sepia officinalis L. (Mollusque, Céphalopode) : Impact de l'alimentation, indice de condition nutritionnelle et formulation d'un aliment artificiel*. Thèse de doctorat, Université de Caen.
- PHILLIPS, B. M., ANDERSON, B. S. et HUNT, J. W. (1998). Spatial and temporal variation in results of purple urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) toxicity tests with zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(3):453–459.
- PICHON, D. et BOUCHER-RODONI, R. (2007). Cephalopod bacterial associations : characterization and isolation of the symbiotic complex in the Accessory Nidamental Glands. *Bollettino Malacologico*, 43(1-8):96–102.
- PIERCE, G. J., ALLCOCK, L., BRUNO, I., BUSTAMANTE, P., GONZÁLEZ, A., GUERRA, A., JEREB, P., LEFKADITOU, E., MALHAM, S. K., MORENO, A., PEREIRA, J. a., PIATKOWSKI, U., RASERO, M., SÁNCHEZ, P., SANTOS, M. B. n., SANTURTÚN, M., SEIXAS, S., SOBRINO, I. et VILLANUEVA, R. (2010). Cephalopod biology and fisheries in Europe. Rapport technique, ICES Cooperative Research Report, Copenhagen.
- PIERCE, G. J. et GUERRA, A. (1994). Stock assessment methods used for cephalopod fisheries. *Fisheries Research*, 21(1-2):255–285.
- PIERCE, G. J., VALAVANIS, V. D., GUERRA, A., JEREB, P., ORSI-RELINI, L., BELLIDO, J. M., KATARA, I., PIATKOWSKI, U., PEREIRA, J., BALGUERIAS, E., SOBRINO, I., LEFKADITOU, E., WANG, J., SANTURTÚN, M., BOYLE, P. R., HASTIE, L. C., MACLEOD, C. D., SMITH, J. M., VIANA, M., GONZÁLEZ, A. F. et ZUUR, A. F. (2008). A review of cephalopod - environment interactions in European Seas. *Hydrobiologia*, 612(1):49–70.

- PIPE, R. K. (1990). Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *The Histochemical Journal*, 22(11):595–603.
- PLOYSANGAM, A., FALCIGLIA, G. A. et BREHM, B. J. (1997). Effect of marginal zinc deficiency on human growth and development. *Journal of Tropical Pediatrics*, 43(4):192–8.
- PONCET, J.-M. et LEBEL, J.-M. (2003). Influence of cryoprotective agent and cooling rate on frozen and thawed hemocytes from the Mollusk *Haliotis tuberculata*. *Cryobiology*, 47(2):184–189.
- PONDER, W. F. et LINDBERG, D. R. (2008). Molluscan evolution and phylogeny : an introduction. In PONDER, W. F. et LINDBERG, D. R., éditeurs : *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*, chapitre 1, pages 1–18. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California.
- POPHAM, J. D. et D'AURIA, J. M. (1982). Effects of season and seawater concentrations on trace metal concentrations in organs of *Mytilus edulis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 11(3):273–82.
- PRADO-ALVAREZ, M., ROMERO, A., BALSEIRO, P., DIOS, S., NOVOA, B. et FIGUERAS, A. (2012). Morphological characterization and functional immune response of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) haemocytes after bacterial stimulation. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(1):69–78.
- PRUZZO, C., GALLO, G. et CANESI, L. (2005). Persistence of vibrios in marine bivalves : the role of interactions with haemolymph components. *Environmental Microbiology*, 7(6):761–772.
- PRYOR, M. G. M. (1940). On the hardening of the cuticle of insects. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, 128:393–407.
- RADWAN, M. A., EL-GENDY, K. S. et GAD, A. F. (2010). Oxidative stress biomarkers in the digestive gland of *Theba pisana* exposed to heavy metals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(3):828–35.
- RAIMUNDO, J., CAETANO, M. et VALE, C. (2004). Geographical variation and partition of metals in tissues of *Octopus vulgaris* along the Portuguese coast. *The Science of the Total Environment*, 325(1-3):71–81.
- RAIMUNDO, J., COSTA, P. M., VALE, C., COSTA, M. H. et MOURA, I. (2010a). DNA damage and metal accumulation in four tissues of feral *Octopus vulgaris* from two coastal areas in Portugal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(7):1543–1547.
- RAIMUNDO, J., COSTA, P. M., VALE, C., COSTA, M. H. et MOURA, I. (2010b). Metallothioneins and trace elements in digestive gland, gills, kidney and gonads of *Octopus vulgaris*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*, 152(2):139–146.
- RAIMUNDO, J., VALE, C. et ROSA, R. (2014). Trace element concentrations in the top predator jumbo squid (*Dosidicus gigas*) from the Gulf of California. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 102C:179–186.

- RAINBOW, P. S. (1985). Accumulation of Zn, Cu and Cd by crabs and barnacles. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 21:669–686.
- RAINBOW, P. S. (1995). Physiology, physicochemistry and metal uptake - a crustacean perspective. *Marine Pollution Bulletin*, 31(95):55–59.
- RAINBOW, P. S. (2002). Trace metal concentrations in aquatic invertebrates : why and so what ? *Environmental Pollution*, 120(3):497–507.
- RAINBOW, P. S. (2007). Trace metal bioaccumulation : models, metabolic availability and toxicity. *Environment International*, 33(4):576–82.
- RAINBOW, P. S., MALIK, I. et O'BRIEN, P. (1993). Physicochemical and physiological effects on the uptake of dissolved zinc and cadmium by the amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*. *Aquatic Toxicology*, 25:15–30.
- RAINBOW, P. S. et WHITE, S. L. (1989). Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans : zinc, copper and cadmium in a decapod, an amphipod and a barnacle. *Hydrobiologia*, 174(3):245–262.
- RAJALAKSHMI, S. et MOHANDAS, A. (2008). Impact of mercury on the activity pattern of a marker enzyme in a freshwater bivalve. *The Environmentalist*, 28(3):249–252.
- RAMAN, T., ARUMUGAM, M. et MULLAINADHAN, P. (2008). Agglutinin-mediated phagocytosis-associated generation of superoxide anion and nitric oxide by the hemocytes of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 24(3):337–45.
- RAO, X.-J., LING, E. et YU, X.-Q. (2010). The role of lysozyme in the prophenoloxidase activation system of *Manduca sexta* : an *in vitro* approach. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(3):264–71.
- REBELO, M. D. F., FIGUEIREDO, E. D. S., MARIANTE, R. M., NÓBREGA, A., de BARROS, C. M. et ALLODI, S. (2013). New insights from the oyster *Crassostrea rhizophorae* on bivalve circulating hemocytes. *PLOS ONE*, 8(2):e57384.
- REGOLI, F. et PRINCIPATO, G. (1995). Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions : implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 31:143–164.
- REID, A., JEREB, P. et ROPER, C. F. E. (2005). Family Sepiadariidae. In JEREB, P. et ROPER, C. F. E., éditeurs : *Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species known to date. Volume 1. Chambered nautilus and sepioids (Nautilidae, Sepiidae, Sepiolidae, Sepiadariidae, Idiosepiidae and Spirulidae)*, pages 57–152. Rome, fao édition.
- RICHARD, A. (1971). *Contribution à l'étude expérimentale de la croissance et de la maturation sexuelle de Sepia officinalis L. (Mollusque Céphalopode)*. Thèse de doctorat, Université de Lille.

- RINKEVICH, B. (2005). Marine invertebrate cell cultures : new millennium trends. *Marine Biotechnology*, 7(5):429–39.
- RJEIBI, M., METIAN, M., HAJJI, T., GUYOT, T., BEN CHAOUACHA-CHÉKIR, R. et BUSTAMANTE, P. (2014). Interspecific and geographical variations of trace metal concentrations in cephalopods from Tunisian waters. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(6):3767–83.
- ROCCA, E. (1969). Copper distribution in *Octopus vulgaris* Lam. hepatopancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 28(1):67–82.
- ROCHA, F. et GUERRA, A. (1999). Age and growth of two sympatric squid *Loligo vulgaris* and *Loligo forbesi*, in Galician waters (north-west Spain). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 79(4):697–707.
- RODRÍGUEZ-DOMÍNGUEZ, H., SOTO-BÚA, M., IGLESIAS-BLANCO, R., CRESPO-GONZÁLEZ, C., ARIAS-FERNÁNDEZ, C. et GARCÍA-ESTÉVEZ, J. (2006). Preliminary study on the phagocytic ability of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Mollusca : Cephalopoda) haemocytes in vitro. *Aquaculture*, 254(1-4):563–570.
- ROESIJADI, G. (1992). Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 22:81–114.
- RÖGENER, W., RENWRANTZ, L. et UNLENBRUCK, G. (1985). Isolation and characterization of a lectin from the hemolymph of the cephalopod *Octopus vulgaris* (Lam.) inhibited by α -D-lactose and N-acetyl-lactosamine. *Developmental & Comparative Immunology*, 9(4):605–616.
- ROMERO-ISART, N. et VAŠÁK, M. (2002). Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 88(3-4):388–96.
- ROSA, R., PIMENTEL, M. S., BOAVIDA-PORTUGAL, J., TEIXEIRA, T., TRÜBENBACH, K. et DINIZ, M. (2012). Ocean warming enhances malformations, premature hatching, metabolic suppression and oxidative stress in the early life stages of a keystone squid. *PLOS ONE*, 7(6):e38282.
- ROSSI, A., PELLEGRINIT, D., BELCARI, P. et BARGHIGIANI, C. (1993). Mercury in *Eledone cirrhosa* from the Northern Tyrrhenian Sea : contents and relations with life cycle. *Marine Pollution Bulletin*, 26(12):683–686.
- ROWLEY, A. F. et POWELL, A. (2007). Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific ? *Journal of Immunology*, 179(11):7209–7214.
- ROYER, J. (2002). Stock assessments of English Channel loliginid squids : updated depletion methods and new analytical methods. *ICES Journal of Marine Sciences*, 59(3):445–457.
- ROYER, J., PIERCE, G. J., FOUCHER, E. et ROBIN, J. (2006). The English Channel stock of *Sepia officinalis* : Modelling variability in abundance and impact of the fishery. *Fisheries Research*, 78(1):96–106.

- RUTH, P., BLUM, W. et BILLE, J. (1996). Immunocytochemical reaction of a haemocyanin antibody in the midgut gland of *Nautilus* (Cephalopoda, Tetrabranchiata). *Experientia*, 52(6):549–553.
- SAFI, G. (2013). *Etude de la variabilité spatio-temporelle des caractéristiques physiologiques des jeunes stades de vie de la seiche Sepia officinalis L. en Manche*. Thèse de doctorat, Université de Caen Basse-Normandie.
- SALIMI, L., JAMILI, S., MOTALEBI, A., EGHTESEADI-ARAGHI, P., RABBANI, M. et ROSTAMI-BESHMAN, M. (2009). Morphological characterization and size of hemocytes in *Anodonta cygnea*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(2):81–5.
- SALVATO, B., SANTAMARIA, M., BELTRAMINI, M., ALZUET, G. et CASELLA, L. (1998). The enzymatic properties of *Octopus vulgaris* hemocyanin : *o*-diphenol oxidase activity. *Biochemistry*, 37(40):14065–14077.
- SANTARÉM, M. M., ROBLEDO, J. A. F. et FIGUERAS, A. (1994). Seasonal changes in hemocytes and serum defense factors in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 18:217–222.
- SARABIA, R., DEL RAMO, J., VARÓ, I., DÍAZ-MAYANS, J. et TORREBLANCA, A. (2008). Sublethal zinc exposure has a detrimental effect on reproductive performance but not on the cyst hatching success of *Artemia parthenogenetica*. *The Science of the Total Environment*, 398(1-3):48–52.
- SAURABH, S. et SAHOO, P. K. (2008). Lysozyme : an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 39(3):223–239.
- SAUVÉ, S., BROUSSEAU, P., PELLERIN, J., MORIN, Y., SENÉCAL, L., GOUDREAU, P. et FOURNIER, M. (2002). Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves : in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology*, 58(3-4):189–200.
- SCHIPP, R. (1987a). General morphological and functional characteristics of the cephalopod circulatory system. An introduction. *Experientia*, 43:474–477.
- SCHIPP, R. (1987b). The blood vessels of cephalopods. A comparative morphological and functional survey. *Experientia*, 43(5):525–537.
- SCHIPP, R. et HEVERT, F. (1978). Distribution of copper and iron in some central organs of *Sepia officinalis* (Cephalopoda). A comparative study by flameless atomic absorption and electron microscopy. *Marine Biology*, 47(4):391–399.
- SCHIPP, R. et HEVERT, F. (1981). Ultrafiltration in the branchial heart appendage of dibranchiate cephalopods : a comparative ultrastructural and physiological study. *Journal of Experimental Biology*, 92(1):23–35.
- SCHIPP, R., HÖHN, P. et GINKEL, G. (1973). Elektronenmikroskopische und histochemische Untersuchungen zur funktion der branchialdrüse (parabranchialdrüse) der Cephalopoda. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 139(2):253–269.

- SCHIPP, R., HÖHN, P. et SCHÄFER, A. (1971). Elektronenmikroskopische und histochemische untersuchungen zur funktion des kiemenherzanhangs (pericardialdrüse) von *Sepia officinalis*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 117:252–274.
- SCHIPP, R., MOLLENHAUER, S. et von BOLETZKY, S. (1979). Electron microscopical and histochemical studies of differentiation and function of the cephalopod gill (*Sepia officinalis* L.). *Zoomorphologie*, 93:193–207.
- SCHIPP, R. et von BOLETZKY, S. (1975). Morphology and function of the excretory organs in dibranchiate Cephalopods. *Fortschritte der Zoologie*, 23(2/3):89–111.
- SCHIPP, R. et von BOLETZKY, S. (1976). The pancreatic appendages of dibranchiate cephalopods. I. The fine structure of the "Pancreas" in Sepioidea. *Zoomorphologie*, 86:81–98.
- SCHIRMER, K. (2006). Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. *Toxicology*, 224(3):163–83.
- SCHLEICHER, T. R. et NYHOLM, S. V. (2011). Characterizing the host and symbiont proteomes in the association between the Bobtail squid, *Euprymna scolopes*, and the bacterium, *Vibrio fischeri*. *PLOS ONE*, 6(10):e25649.
- SEIXAS, S., BUSTAMANTE, P. et PIERCE, G. J. (2005a). Accumulation of mercury in the tissues of the common octopus *Octopus vulgaris* (L.) in two localities on the Portuguese coast. *The Science of the Total Environment*, 340(1-3):113–22.
- SEIXAS, S., BUSTAMANTE, P. et PIERCE, G. J. (2005b). Interannual patterns of variation in concentrations of trace elements in arms of *Octopus vulgaris*. *Chemosphere*, 59(8):1113–1124.
- SEIXAS, S. et PIERCE, G. J. (2005). Bioaccumulation of lead, calcium and strontium and their relationships in the octopus *Octopus vulgaris*. *Water, Air and Soil Pollution*, 163:137–152.
- SEMEDO, M., REIS-HENRIQUES, M. A., REY-SALGUEIRO, L., OLIVEIRA, M., DELERUE-MATOS, C., MORAIS, S. et FERREIRA, M. (2012). Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in octopus (*Octopus vulgaris*) from Northwest Atlantic. *The Science of the Total Environment*, 433:230–237.
- SEN, H. et SUNLU, U. (2007). Effects of Cadmium (CdCl_2) on development and hatching of eggs in European squid (*Loligo vulgaris* Lamarck, 1798) (Cephalopoda : Loliginidae). *Environmental Monitoring and Assessment*, 133(1-3):371–8.
- SERAFIM, A. et BEBIANNO, M. J. (2007). Involvement of metallothionein in Zn accumulation and elimination strategies in *Ruditapes decussatus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52(2):189–199.
- SERAFIM, A. et BEBIANNO, M. J. (2010). Effect of a polymetallic mixture on metal accumulation and metallothionein response in the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Toxicology*, 99(3):370–8.

- SHADWICK, R. E. et NILSSON, E. K. (1990). The importance of vascular elasticity in the circulatory system of the cephalopod *Octopus vulgaris*. *Journal of Experimental Biology*, 152:471–484.
- SHANKAR, A. H. et PRASAD, A. S. (1998). Zinc and immune function : the biological basis of altered resistance of infection. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68:447S–63S.
- SHEAHAN, D., BROOKS, S., RAFFO, A., SMEDLEY, C. et LAW, R. (2007). A Review of the Contaminant Status of SEA 8 covering the Western Approaches, Celtic Sea and English Channel.
- SHI, D. et WANG, W.-X. (2004a). Modification of trace metal accumulation in the green mussel *Perna viridis* by exposure to Ag, Cu, and Zn. *Environmental Pollution*, 132(2):265–77.
- SHI, D. et WANG, W.-X. (2004b). Understanding the differences in Cd and Zn bioaccumulation and subcellular storage among different populations of marine clams. *Environmental Science & Technology*, 38(2):449–56.
- SHI, D. et WANG, W.-X. (2005). Uptake of aqueous and dietary metals by mussel *Perna viridis* with different Cd exposure histories. *Environmental Science & Technology*, 39(23):9363–9.
- SIDDIQUI, N. I., AKOSUNG, R. F. et GIELENS, C. (2006). Location of intrinsic and inducible phenoloxidase activity in molluscan hemocyanin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348(3):1138–1144.
- SIES, H. (1997). Oxidative stress : oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82:291–295.
- SINLEY, J. R., GOETTL, J. P. et DAVIES, P. H. (1974). The effects of zinc on rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in hard and soft water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 12(2):193–201.
- SMOLARZ, K. et BERGER, A. (2009). Long-term toxicity of hexabromocyclododecane (HBCDD) to the benthic clam *Macoma balthica* (L.) from the Baltic Sea. *Aquatic Toxicology*, 95(3):239–47.
- SÖDERHÄLL, K. et CERENIUS, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10(1):23–28.
- SOF'INA, E. Y., AKHNEDZHANOV, R. A., PIVNENKO, T. N. et EPSHTEIN, L. M. (1988). Trypsin inhibitor from liver of the squid *Berryteuthis magister*. *Chemistry of Natural Compounds*, 24(6):760–761.
- SOUDANT, P., E CHU, F.-L. et VOLETY, A. K. (2013). Host-parasite interactions : Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, *Perkinsus* species. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114(2):196–216.
- SPEAR, P. A. (1981). *Zinc in aquatic environment*. National Research Council Canada.
- SRINIVASA REDDY, M., BASHA, S., JOSHI, H. V. et RAMACHANDRAIAH, G. (2005). Seasonal distribution and contamination levels of total PHCs, PAHs and heavy metals in coastal waters of the Alang-Sosiya ship scrapping yard, Gulf of Cambay, India. *Chemosphere*, 61(11):1587–93.

- STOHS, S. J. et BAGCHI, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metals ions. *Free Radical Biology & Medicine*, 18(2):321–336.
- STROBEL, A., HU, M. Y. A., GUTOWSKA, M. A., LIEB, B., LUCASSEN, M., MELZNER, F., PÖRTNER, H. O. et MARK, F. C. (2012). Influence of temperature, hypercapnia, and development on the relative expression of different hemocyanin isoforms in the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Journal of Experimental Zoology. Part A, Ecological Genetics and Physiology*, 317(8):511–23.
- STUART, A. E. (1968). The reticulo-endothelial apparatus of the lesser octopus, *Eledone cirrhosa*. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 96:401–412.
- SYKES, A. V., ALMANSA, E., LORENZO, A. et ANDRADE, J. P. (2009). Lipid characterization of both wild and cultured eggs of cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) throughout the embryonic development. *Aquaculture Nutrition*, 15(1):38–53.
- SYKES, A. V., DOMINGUES, P. M. et ANDRADE, J. P. (2006a). Effects of using live grass shrimp (*Palaemonetes varians*) as the only source of food for the culture of cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture International*, 14(6):551–568.
- SYKES, A. V., DOMINGUES, P. M., CORREIA, M. et ANDRADE, J. P. (2006b). Cuttlefish culture - State of the art and future trends. *Life & Environment*, 56(2):129–137.
- SYKES, A. V., DOMINGUES, P. M., LOYD, M., SOMMERFIELD, A. et ANDRADE, J. P. (2003). The influence of culture density and enriched environments on the first stage culture of young cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture International*, 11(6):531–544.
- SYKES, A. V., DOMINGUES, P. M., MÁRQUEZ, L. et ANDRADE, J. P. (2010). The effects of tank colours on the growth and survival of cuttlefish (*Sepia officinalis*, Linnaeus 1758) hatchlings and juveniles. *Aquaculture Research*, 42(3):1–9.
- SYKES, A. V., GONÇALVES, R. A. et ANDRADE, J. P. (2012). Early weaning of cuttlefish (*Sepia officinalis*, L.) with frozen grass shrimp (*Palaemonetes varians*) from the first day after hatching. *Aquaculture Research*, 44(12):1815–1823.
- TANAKA, T., HAYASHI, Y. et ISHIZAWA, M. (1983). Subcellular distribution and binding of heavy metals in the untreated liver of the squid ; comparison with data from the livers of cadmium and silver-exposed rats. *Experientia*, 39:746–748.
- TATTERSALL, W. M. et TATTERSALL, O. S. (1951). *The British Mysidacea*. London, ray societ édition.
- TELLIS, M. S., LAUER, M. M., NADELLA, S. R., BIANCHINI, A. et WOOD, C. M. (2014). Sublethal mechanisms of Pb and Zn toxicity to the purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) during early development. *Aquatic Toxicology*, 146:220–9.

- THIAGARAJAN, R., GOPALAKRISHNAN, S. et THILAGAM, H. (2006). Immunomodulation the marine green mussel *Perna viridis* exposed to sub-lethal concentrations of Cu and Hg. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(3):392–9.
- THØGERSEN, I. B., SALVESEN, G., BRUCATO, F. H., PIZZO, S. V. et ENGHILD, J. J. (1992). Purification and characterization of an α -macroglobulin proteinase inhibitor from the mollusc *Octopus vulgaris*. *Biochemical Journal*, 285:521–527.
- THOMAS-GUYON, H., GAGNAIRE, B., BADO-NILLES, A., BOUILLY, K., LAPÈGUE, S. et RENAULT, T. (2009). Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Developmental & Comparative Immunology*, 33(5):653–659.
- THOMPSON, I., CHOUBERT, G., HOULIHAN, D. F. et SECOMBES, C. J. (1995). The effect of dietary vitamin A and astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout. *Aquaculture*, 133(2):91–102.
- THOMPSON, J. A. J. et COSSON, R. P. (1984). An improved electrochemical method for the quantification of metathioneins in marine organisms. *Marine Environmental Research*, 11:137–152.
- TONG, Y. et KANOST, M. R. (2005). *Manduca sexta* serpin-4 and serpin-5 inhibit the prophenol oxidase activation pathway : cDNA cloning, protein expression, and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(15):14923–31.
- TRAVERS, M.-A., MIRELLA DA SILVA, P., LE GOÏC, N., MARIE, D., DONVAL, A., HUCHETTE, S., KOKEN, M. et PAILLARD, C. (2008). Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 24(4):400–11.
- TROLL, J. V., ADIN, D. M., WIER, A. M., PAQUETTE, N., SILVERMAN, N., GOLDMAN, W. E., STADERMANN, F. J., STABB, E. V. et MCFALL-NGAI, M. J. (2009). Peptidoglycan induces loss of a nuclear peptidoglycan recognition protein during host tissue development in a beneficial animal-bacterial symbiosis. *Cellular Microbiology*, 11(7):1114–27.
- TRÜBENBACH, K., TEIXEIRA, T., DINIZ, M. et ROSA, R. (2013). Hypoxia tolerance and antioxidant defense system of juvenile jumbo squids in oxygen minimum zones. *Deep Sea Research Part II : Topical Studies in Oceanography*, 95:209–217.
- TSCHESCHE, H. et DIETL, T. (1972). Identifizierung der proteaseinhibitoren synthetisierenden organe der weinbergschnecke (*Helix pomatia*). *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 353:1189–1193.
- TSCHESCHE, H. et von RÜCKER, A. (1973). Über die organverteilung der proteinase-inhibitoren breiter spezifität aus Tintenfischen (*Loligo vulgaris*). *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 354: 1510–1512.

- TSUNEMATSU, H., NISHIMURA, H., MIZUSAKI, K. et MAKISUMI, S. (1985). Kinetics of hydrolysis of amide and anilide substrates of *p*-Guanidino-L-Phenylalanine by bovine and porcine trypsins. *The Journal of Biochemistry*, 97:617–623.
- UEDA, A., NAGAI, H., ISHIDA, M., NAGASHIMA, Y. et SHIOMI, K. (2008). Purification and molecular cloning of SE-cephalotoxin, a novel proteinaceous toxin from the posterior salivary gland of cuttlefish *Sepia esculenta*. *Toxicon*, 52(4):574–81.
- UMASUTHAN, N., BATHIGE, S. D. N. K., REVATHY, K. S., WICKRAMAARACHCHI, W. D. N., WAN, Q., WHANG, I., KIM, E., PARK, M.-A., PARK, H.-C. et LEE, J. (2014). A C1 inhibitor ortholog from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) : molecular perspectives of a central regulator in terms of its genomic arrangement, transcriptional profiles and anti-protease activities of recombinant peptide. *Developmental & Comparative Immunology*, 42(2):197–210.
- UNDHEIM, E. A. B., GEORGIEVA, D. N., THOEN, H. H., NORMAN, J. A., MORK, J., BETZEL, C. et FRY, B. G. (2010). Venom on ice : first insights into Antarctic octopus venoms. *Toxicon*, 56(6):897–913.
- URIARTE, I., IGLESIAS, J., DOMINGUES, P. M., ROSAS, C., VIANA, M. T., NAVARRO, J. C., SEIXAS, P., VIDAL, E. A. G., AUSBURGER, A., PEREDA, S., GODOY, F., PASCHKE, K., FARÍAS, A., OLIVARES, A. et ZUÑIGA, O. (2011). Current Status and Bottle Neck of Octopod Aquaculture : The Case of American Species. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(6):735–752.
- US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1987). Ambient Water Quality Criteria for Zinc. Rapport technique, DC : Criteria and Standards Division, Office of Water Regulations and Standards.
- VALLEE, B. L. (1986). *A synopsis of zinc biology and pathology in zinc enzymes*. Birkhauser, Boston.
- VANHOORELBEKE, K., GOOSSENS, A., GIELENS, C. et PRÉAUX, G. (1994). An α_2 -macroglobulin-like proteinase inhibitor in the haemolymph of the Decabrachia cephalopod *Sepia officinalis*. *Archives Internationales de Physiologie, de Biochimie et de Biophysique*, 102(1):B25.
- VASTA, G. R. (2009). Roles of galectins in infection. *Nature Reviews Microbiology*, 7(6):424–38.
- VASÁK, M. (1991). Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins. *Methods in Enzymology*, 205(1):452–458.
- VAZQUEZ, L., ALPUCHE, J., MALDONADO, G., AGUNDIS, C., PEREYRA-MORALES, A. et ZENTENO, E. (2009). Review : Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immunity*, 15(3):179–88.
- VENABLE, J. H. et COGGESHALL, R. (1965). A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 25(2):407–408.

- VERSLYCKE, T., VANGHELUWE, M., HEIJERICK, D., DE SCHAMPHELAERE, K., VAN SPRANG, P. et JANSSEN, C. R. (2003). The toxicity of metal mixtures to the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea : Mysidacea) under changing salinity. *Aquatic Toxicology*, 64(3):307–315.
- VIDAL, E. A. G., VILLANUEVA, R., ANDRADE, J. P., GLEADALL, I. G., IGLESIAS, J., KOUETA, N., ROSAS, C., SEGAWA, S., GRASSE, B., FRANCO-SANTOS, R. M., ALBERTIN, C. B., CAAMAL-MONSREAL, C., CHIMAL, M. E., EDSINGER-GONZALES, E., GALLARDO, P., LE PABIC, C., PASCUAL, C., ROUMBEDAKIS, K. et WOOD, J. (2014). Cephalopod culture : current status of main biological models and research priorities. In VIDAL, E. A. G., éditeur : *Advances in Marine Biology*, volume 67, chapitre 1, pages 1–98. Oxford : United Kingdom.
- VILAS, C., DRAKE, P. et FOCKEDEY, N. (2008). Feeding preferences of estuarine mysids *Neomysis integer* and *Rhopalophthalmus tartessicus* in a temperate estuary (Guadalquivir Estuary, SW Spain). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 77(3):345–356.
- VILLANUEVA, R. et BUSTAMANTE, P. (2006). Composition in essential and non-essential elements of early stages of cephalopods and dietary effects on the elemental profiles of *Octopus vulgaris* paralarvae. *Aquaculture*, 261(1):225–240.
- VLAHOGIANNI, T., DASSENAKIS, M., SCOULLOS, M. J. et VALAVANIDIS, A. (2007). Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Marine Pollution Bulletin*, 54(9):1361–71.
- von BOLETZKY, S. et HANLON, R. T. (1983). A review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod molluscs. *Memoirs of the National Museum Victoria*, 44:147–187.
- WALLACE, W., LEE, B. et LUOMA, S. (2003). Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Marine Ecology Progress Series*, 249:183–197.
- WANG, C., YUE, X., LU, X. et LIU, B. (2013a). The role of catalase in the immune response to oxidative stress and pathogen challenge in the clam *Meretrix meretrix*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(1):91–9.
- WANG, J., PIERCE, G. J., BOYLE, P. R., DENIS, V., ROBIN, J.-p. et BELLIDO, J. M. (2003). Spatial and temporal patterns of cuttlefish (*Sepia officinalis*) abundance and environmental influences - a case study using trawl fishery data in French Atlantic coastal , English Channel , and adjacent waters. *ICES Journal of Marine Sciences*, 3139(03):1149–1158.
- WANG, L., QIU, L., ZHOU, Z. et SONG, L. (2013b). Research progress on the mollusc immunity in China. *Developmental & Comparative Immunology*, 39(1-2):2–10.

- WANG, W.-X. et RAINBOW, P. S. (2005). Influence of metal exposure history on trace metal uptake and accumulation by marine invertebrates. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(2):145–59.
- WANG, Y., HU, M., CHIANG, M. W. L., SHIN, P. K. S. et CHEUNG, S. G. (2012). Characterization of subpopulations and immune-related parameters of hemocytes in the green-lipped mussel *Perna viridis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(3):381–90.
- WANG, Z. et ZHANG, S. (2010). The role of lysozyme and complement in the antibacterial activity of zebrafish (*Danio rerio*) egg cytosol. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(5):773–7.
- WARNAU, M. et BUSTAMANTE, P. (2007). Radiotracer techniques : a unique tool in marine ecotoxicological studies. *Environmental Bioindicators*, 2:217–218.
- WATLING, H. R. (1982). Comparative study of the effects of zinc, cadmium, and copper on the larval growth of three oyster species. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 28(2):195–201.
- WELLS, M. J. et WELLS, J. (1989). Water uptake in a cephalopod and the function of the so-called 'Pancreas'. *Journal of Experimental Biology*, 145:215–226.
- WHITE, S. L. et RAINBOW, P. S. (1982). Regulation and accumulation of copper, zinc and cadmium by the shrimp *Palaemon elegans*. *Marine Ecology Progress Series*, 8:95–101.
- WILDGUST, M. A. et JONES, M. B. (1998). Salinity change and the toxicity of the free cadmium ion $[Cd^{2+}_{(aq)}]$ to *Neomysis integer* (Crustacea : Mysidacea). *Aquatic Toxicology*, 41:187–192.
- WILSON, R. et RATCLIFFE, N. A. (2000). Effect of lysozyme on the lectin-mediated phagocytosis of *Bacillus cereus* by haemocytes of the cockroach, *Blaberus discoidalis*. *Journal of Insect Physiology*, 46(5):663–670.
- WON, J. H., HONG, S. H., SHIM, W. J., YIM, U. H. et KIM, G. B. (2009). Persistent organochlorine pollutants in Korean offshore waters : squid (*Todarodes pacificus*) as a biomonitor. *Marine Pollution Bulletin*, 58(8):1238–44.
- WOOTTON, E. C., DYRYNDA, E. A. et RATCLIFFE, N. A. (2003). Bivalve immunity : comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish & Shellfish Immunology*, 15(3):195–210.
- WOOTTON, E. C. et PIPE, R. K. (2003). Structural and functional characterisation of the blood cells of the bivalve mollusc, *Scrobicularia plana*. *Fish & Shellfish Immunology*, 15(3):249–262.
- XIE, Y., HU, B., WEN, C. et MU, S. (2011). Morphology and phagocytic ability of hemocytes from *Cristaria plicata*. *Aquaculture*, 310(3-4):245–251.
- XUE, Q., ITOH, N., SCHEY, K. L., COOPER, R. K. et LA PEYRE, J. F. (2009). Evidence indicating the existence of a novel family of serine protease inhibitors that may be involved in marine invertebrate immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(2):250–259.

- XUE, Q. et RENAULT, T. (2000). Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph. *Journal of Invertebrate Pathology*, 76:155–163.
- XUE, Q. G., RENAULT, T. et CHILMONCZYK, S. (2001). Flow cytometric assessment of haemocyte subpopulations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. *Fish & Shellfish Immunology*, 11(7): 557–67.
- YAMADA, H., TAKAYANAGI, K., TATEISHI, M., TAGATA, H. et IKEDA, K. (1997). Organotin compounds and polychlorinated biphenyls of livers in squid collected from coastal waters and open oceans. *Environmental Pollution*, 96(2):217–26.
- YIM, M. (1978). *Développement post-embryonnaire de la glande digestive de Sepia officinalis L. (Mollusque Céphalopode)*. Thèse de doctorat, Université de Caen.
- YIM, M. et BOUCAUD-CAMOU, E. (1980). Etude cytologique du développement post-embryonnaire de la glande digestive de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale*, 69(2):59–79.
- YOSHINO, T. P., BICKHAM, U. et BAYNE, C. J. (2013). Molluscan cells in culture : primary cell cultures and cell lines. *Canadian Journal of Zoology*, 91(6):1–45.
- ZANNA, P. T., MAIDA, I., ARCIULI, M., JIMENEZ-CERVANTES, C., GARCIA-BORRÓN, J. C., CICERO, R. et GUIDA, G. (2009). Molecular cloning and biochemical characterization of the skin tyrosinase from *Rana esculenta* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry & Molecular Biology*, 152(3):234–242.
- ZHANG, L. et WANG, W.-X. (2005). Effects of Zn pre-exposure on Cd and Zn bioaccumulation and metallothionein levels in two species of marine fish. *Aquatic Toxicology*, 73(4):353–69.
- ZHANG, W., WU, X. et WANG, M. (2006). Morphological, structural, and functional characterization of the haemocytes of the scallop, *Argopecten irradians*. *Aquaculture*, 251(1):19–32.
- ZHAO, J., QIU, L., NING, X., CHEN, A., WU, H. et LI, C. (2010). Cloning and characterization of an invertebrate type lysozyme from *Venerupis philippinarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry & Molecular Biology*, 156(1):56–60.
- ZHAO, J., SONG, L., LI, C., NI, D., WU, L., ZHU, L., WANG, H. et XU, W. (2007). Molecular cloning, expression of a big defensin gene from bay scallop *Argopecten irradians* and the antimicrobial activity of its recombinant protein. *Molecular Immunology*, 44(4):360–8.
- ZHOU, Z., NI, D., WANG, M., WANG, L., WANG, L., SHI, X., YUE, F., LIU, R. et SONG, L. (2012). The phenoloxidase activity and antibacterial function of a tyrosinase from scallop *Chlamys farreri*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33(2):375–81.

- ZIELINSKI, S. et PÖRTNER, H.-O. (2000). Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods : a function of metabolic rate or age? *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry & Molecular Biology*, 125(2):147–160.

ANNEXES

Nitrite (NO_2^-)

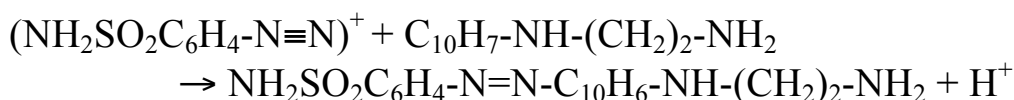
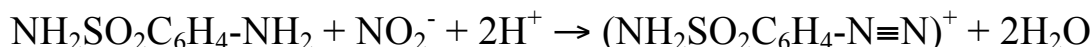
$M_{\text{NO}_2} = 46 \text{ g mol}^{-1}$



(tiré de Aminot A., Kérouel R., 2004. *Hydrologie des écosystèmes marins. Paramètres et analyses*. Éd. Ifremer, 336 p.)

Le principe de base est la réaction de Griess où le nitrite réagit avec une première amine aromatique pour former un diazoïque qui est couplé à une seconde amine aromatique pour produire le colorant rose.

Bendschneider & Robinson (1952) ont réexaminé cette réaction et proposé une version optimisée dans laquelle la sulfanilamide réagit d'abord avec le nitrite en milieu acide, puis le diazoïque avec le N-naphtyl-éthylènediamine :



Le coefficient d'absorption est de $\sim 46\,000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à la longueur d'onde de 543 nm, ce qui permet le dosage de très faibles concentrations de nitrite.

Bendschneider & Robinson (1952) ont proposé que chaque amine soit dissoute dans un réactif spécifique et ajoutée séparément à l'échantillon en ménageant un intervalle de 2 minutes.

Gamme de concentrations : 0.1 à 20 $\mu\text{mol/l}$ (soit 4.6 à 920 $\mu\text{g/l}$) ;
il est conseillé de diluer l'échantillon avec de l'eau déminéralisée au-delà de 3 $\mu\text{mol/l}$ pour éviter de réduire le trajet optique (Hansen & Koroleff, 1999).

Réactifs :

- Réactif 1: solution de sulfanilamide

produits à utiliser : HCl fumant (37 % ; 1.19 kg/l), sulfanilamide ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$; $M = 172 \text{ g/mol}$).

- Diluer 100 ml d'HCl dans environ 500 ml d'eau déminéralisée.
- Ajouter et dissoudre 10 g de sulfanilamide, puis compléter à 1 litre. Conserver à l'abri de la lumière, cette solution est stable plusieurs mois.

- Réactif 2 : solution de N-naphtyl-éthylènediamine

produit à utiliser : dichlorhydrate de N-(1-naphtyl)-éthylènediamine (NED ; $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2$, 2HCl ; $M = 259 \text{ g/mol}$).

- Dissoudre 1.0 g de NED dans 1 litre d'eau déminéralisée.
- Conserver cette solution au froid et à l'abri de la lumière. La renouveler tous les mois ou dès qu'elle prend une coloration brune.

Les solution étalons de nitrite ne doivent jamais être conservées par addition d'acide ou de sels mercuriques, ces conditions accélérant leur dégradation (Zafiriou & True, 1977 ; Aminot et Kérouel, 1996).

Solution étalon :

produit à utiliser : nitrite de sodium anhydre ($\text{Na}(33.3\%) \text{NO}_2(66.7\%)$) ; $M = 69 \text{ g/mol}$

préparation des étalons :

Un étalonnage à 4 ou 5 niveaux de concentrations doit être fait. Préparer une gamme étalon correspondant aux concentrations usuelles. Par exemple, 0.1-0.2-0.5-1.0 $\mu\text{mol/l}$ **à faire en fiole jaugée !!!**

Faire 2 dosages de chacun des étalons, ainsi que des blancs de turbidité et des réactifs.

préparation des échantillons :

Si la concentration est présumée supérieure à 3 $\mu\text{mol/l}$, il est préférable de diluer l'échantillon.

procédure générale de dosage :

La température des solutions à doser doit être comprise entre 15 et 25°C.

- Rincer le récipient de dosage avec l'eau à analyser.
- Prélever $50 \text{ ml} \pm 1 \text{ ml}$.
- Ajouter 1.0 ml du réactif 1, mélanger et attendre 2 à 5 minutes.
- Ajouter 1.0 ml du réactif 2, mélanger et laisser réagir au moins 10 minutes (mais moins d'une heure).
- Mesurer l'absorbance à la longueur d'onde de 543 nm (référence : eau déminéralisée). Soit A_{brut} cette valeur.

blancs :

Le **blanc de turbidité** est l'absorbance engendrée par les particules. L'acidité du milieu réactionnel pouvant modifier la turbidité, cette dernière est mesurée après avoir ajouté à l'échantillon le réactif 1 seul : soit b_t cette valeur (référence : eau déminéralisée).

Le **blanc des réactifs** est l'absorbance produite par les réactifs eux-mêmes (coloration propre ou présence de nitrite). Il est impératif de le mesurer avec chaque série d'échantillons, et au moins chaque jour. Faire deux déterminations : soit b_r la moyenne.

courbe d'étalonnage, facteur de conversion F :

- Tracer la droite d'étalonnage : Absorbance = $f(\text{concentration})$. Ne pas omettre les valeurs de l'eau déminéralisée non dopée. En cuves de 10 cm de trajet optique, l'absorbance est d'environ 0,45 pour 1 $\mu\text{mol/l}$.
- Etablir l'équation $A = a.C + b$, et calculer le facteur de conversion $F = 1/a$ ($\mu\text{mol/l}$ par unité d'absorbance)

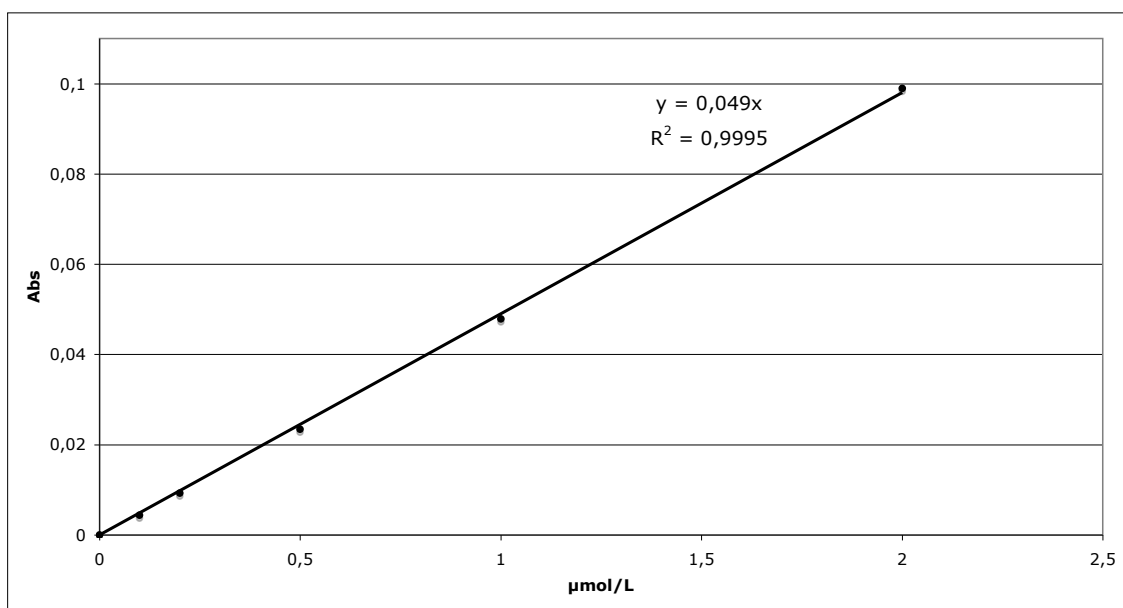
L'absorbance nette est : $A = A_{\text{brut}} - b_t - b_r$

Si les échantillons ont été dilués avant dosage, multiplier les concentrations trouvées par le facteur de dilution.

Les équivalences molaires ou massiques sont les suivantes :

1 $\mu\text{mol/l}$ de nitrite (NO_2^-) = 1 $\mu\text{mol/l}$ d'azote nitreux (N-NO_2^-)
0.014 mg/l d'azote nitreux (N-NO_2^-)
0.046 mg/l de nitrite (NO_2^-)

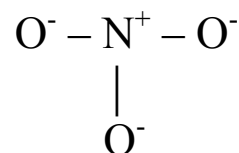
Strickland & Parsons (1972) précisent que les résultats de deux mesures sur le même échantillon doivent être rejetés si leurs absorbances diffèrent de : 0.03 entre 0.5 et 1 $\mu\text{mol/l}$; 0.02 entre 0.1 et 0.5 $\mu\text{mol/l}$; 0.005 entre 0.03 et 0.1 $\mu\text{mol/l}$.



Exemple de droite d'étalonnage

Nitrate (NO_3^-)

$$M_{\text{NO}_3} = 62 \text{ g mol}^{-1}$$



(tiré de Method 10049, adaptée de Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, part 4500- NO_3 -B)

- gamme de 1 à 10,0 mg/l NO_3 -N (précise à 0,1 mg/l)
- les échantillons turbides doivent être filtrés avant analyse (pour enlever la matière organique)
- l'ajout d'HCl permet d'empêcher l'interférence des ions hydroxydes et carbonates jusqu'à 1g/l de CaCO_3

besoins :

- 1 ml d'acide chlorhydrique à 1 M ;
- eau osmosée ;
- 1 bécher de 100 ml ;
- cuves en quartz.

technique :

- blanc avec de l'eau osmosée ; blanc des réactifs avec de l'eau osmosée et de l'HCl
- lecture des échantillons à 220 nm (longueur d'onde UV à laquelle la M.O. et les nitrates absorbent) et 275 nm (longueur d'onde UV à laquelle seule la M.O. absorbe) ;
- prise d'échantillon de 50 ml auquel on ajoute 1 ml d'HCl 1 M ;
- gamme étalon à faire à partir de $(\text{K}(38.67\%)\text{NO}_3(61.32\%))$; $M = 101.1 \text{ g/mol}$
- solution mère à 32.6 mg/l de KNO_3 soit 20 mg/l de NO_3 à préparer dans de l'eau osmosée et dont la longueur d'onde est mesurée à 220 nm (mesurer également à 275 nm pour voir) sans ajout d'HCl ;

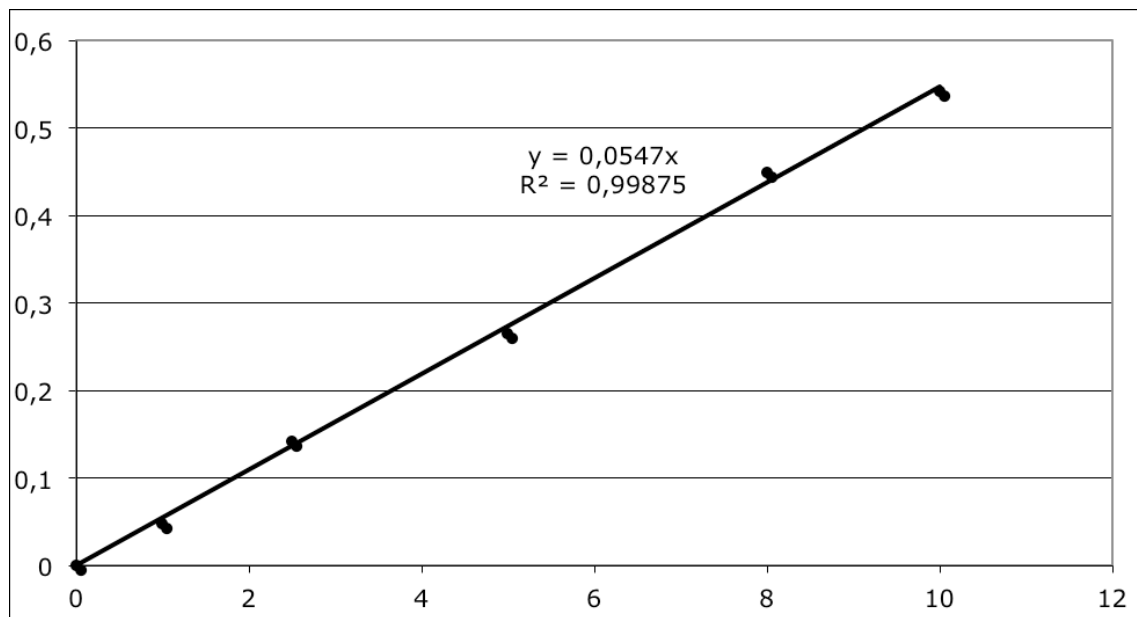
KNO_3 (en mg)	NO_3^- (en mg)	facteur de dilution de la SM
16.3	10	2
13.04	8	2.5
8.15	5	4
4.07	2.5	8
1.63	1	20
0	0	0

- C 1 mg/l : diluer 1 ml dans 19 ml d'eau osmosée ; **à faire en fiole jaugée !!!**
- C 2.5 mg/l : diluer 1,25 ml dans 8,75 ml d'eau osmosée ;
- C 5 mg/l : diluer 2.5 ml dans 7.5 ml d'eau osmosée ;

- C 8 mg/l : diluer 4 ml dans 6 ml d'eau osmosée ;
- C 10 mg/l : diluer 5 ml dans 5 ml d'eau osmosée.

- mesurer au moins 2 fois chaque concentration

- idéalement, faire 3 courbes étalons ; une à l'eau déminéralisée, une dans de l'eau à 5 psu, et une dans de l'eau de mer (attention pour les deux dernières aux blancs de la matrice de dilution)



Exemple de droite d'étalonnage

SECTION 14 TEST METHOD

MYSID, *MYSIDOPSIS BAHIA*, SURVIVAL, GROWTH, AND FECUNDITY TEST METHOD 1007.0

14.1 SCOPE AND APPLICATION

14.1.1 This method, adapted in part from USEPA (1987d), estimates the chronic toxicity of effluents and receiving waters to the mysid, *Mysidopsis bahia*, during a seven-day, static renewal exposure. The effects include the synergistic, antagonistic, and additive effects of all the chemical, physical, and additive components which adversely affect the physiological and biochemical functions of the test organisms.

14.1.2 Daily observations on mortality make it possible to also calculate acute toxicity for desired exposure periods (i.e., 24-h, 48-h, 96-h LC50s).

14.1.3 Detection limits of the toxicity of an effluent or pure substance are organism dependent.

14.1.4 Brief excursions in toxicity may not be detected using 24-h composite samples. Also, because of the long sample collection period involved in composite sampling and because the test chambers are not sealed, highly volatile and highly degradable toxicants present in the source may not be detected in the test.

14.1.5 This test is commonly used in one of two forms: (1) a definitive test, consisting of a minimum of five effluent concentrations and a control, and (2) a receiving water test(s), consisting of one or more receiving water concentrations and a control.

14.2 SUMMARY OF METHOD

14.2.1 *Mysidopsis bahia* 7-day old juveniles are exposed to different concentrations of effluent, or to receiving water in a static system, during the period of egg development. The test endpoints are survival, growth (measured as dry weight), and fecundity (measured as the percentage of females with eggs in the oviduct and/or brood pouch).

14.3 INTERFERENCES

14.3.1 Toxic substances may be introduced by contaminants in dilution water, glassware, sample hardware, and testing equipment (see Section 5, Facilities, Equipment, and Supplies).

14.3.2 Improper effluent sampling and handling may adversely affect test results (see Section 8, Effluent and Receiving Water Sampling, Sample Handling, and Sample Preparation for Toxicity Tests).

14.3.3 The test results can be confounded by (1) the presence of pathogenic and/or predatory organisms in the dilution water, effluent, and receiving water, (2) the condition of the brood stock from which the test animals were taken, (3) the amount and type of natural food in the effluent, receiving water, or dilution water, (4) nutritional value of the brine shrimp, *Artemia* nauplii, fed during the test, and (5) the quantity of brine shrimp, *Artemia* nauplii, or other food added during the test, which may sequester metals and other toxic substances, and lower the DO.

14.3.4 pH drift during the test may contribute to artifactual toxicity when ammonia or other pH-dependent toxicants (such as metals) are present. As pH increases, the toxicity of ammonia also increases (see Subsection 8.8.6), so upward pH drift may increase sample toxicity. For metals, toxicity may increase or decrease with increasing pH. Lead and copper were found to be more acutely toxic at pH 6.5 than at pH 8.0 or 8.5, while nickel and zinc were more toxic at pH 8.5 than at pH 6.5 (USEPA, 1992). In situations where sample toxicity is confirmed

to be artifactual and due to pH drift (as determined by parallel testing as described in Subsection 14.3.4.1), the regulatory authority may allow for control of sample pH during testing using procedures outlined in Subsection 14.3.4.2. It should be noted that artifactual toxicity due to pH drift is not likely to occur unless pH drift is large (more than 1 pH unit) and/or the concentration of some pH-dependent toxicant in the sample is near the threshold for toxicity.

14.3.4.1 To confirm that toxicity is artifactual and due to pH drift, parallel tests must be conducted, one with controlled pH and one with uncontrolled pH. In the uncontrolled-pH treatment, the pH is allowed to drift during the test. In the controlled-pH treatment, the pH is maintained using the procedures described in Subsection 14.3.4.2. The pH to be maintained in the controlled-pH treatment (or target pH) will depend on the objective of the test. If the objective of the WET test is to determine the toxicity of the effluent in the receiving water, the pH should be maintained at the pH of the receiving water (measured at the edge of the regulatory mixing zone). If the objective of the WET test is to determine the absolute toxicity of the effluent, the pH should be maintained at the pH of the sample after adjusting the sample salinity for use in marine testing.

14.3.4.1.1 During parallel testing, the pH must be measured in each treatment at the beginning (i.e., initial pH) and end (i.e., final pH) of each 24-h exposure period. For each treatment, the mean initial pH (e.g., averaging the initial pH measured each day for a given treatment) and the mean final pH (e.g., averaging the final pH measured each day for a given treatment) must be reported. pH measurements taken during the test must confirm that pH was effectively maintained at the target pH in the controlled-pH treatment. For each treatment, the mean initial pH and the mean final pH should be within ± 0.3 pH units of the target pH. Test procedures for conducting toxicity identification evaluations (TIEs) also recommend maintaining pH within ± 0.3 pH units in pH-controlled tests (USEPA, 1996).

14.3.4.1.2 Total ammonia also should be measured in each treatment at the outset of parallel testing. Total ammonia concentrations greater than 5 mg/L in the 100% effluent are an indicator that toxicity observed in the test may be due to ammonia (USEPA, 1992).

14.3.4.1.3 Results from both of the parallel tests (pH-controlled and uncontrolled treatments) must be reported to the regulatory authority. If the uncontrolled test meets test acceptability criteria and shows no toxicity at the permitted instream waste concentration, then the results from this test should be used for determining compliance. If the uncontrolled test shows toxicity at the permitted instream waste concentration, then the results from the pH-controlled test should be used for determining compliance, provided that this test meets test acceptability criteria and pH was properly controlled (see Subsection 14.3.4.1.1).

14.3.4.1.4 To confirm that toxicity observed in the uncontrolled test was artifactual and due to pH drift, the results of the controlled and uncontrolled-pH tests are compared. If toxicity is removed or reduced in the pH-controlled treatment, artifactual toxicity due to pH drift is confirmed for the sample. To demonstrate that a sample result of artifactual toxicity is representative of a given effluent, the regulatory authority may require additional information or additional parallel testing before pH control (as described in Subsection 14.3.4.2) is applied routinely to subsequent testing of the effluent.

14.3.4.2 The pH can be controlled with the addition of acids and bases and/or the use of a CO₂-controlled atmosphere over the test chambers. pH is adjusted with acids and bases by dropwise adding 1N NaOH or 1N HCl (see Subsection 8.8.9). The addition of acids and bases should be minimized to reduce the amount of additional ions (Na or Cl) added to the sample. pH is then controlled using the CO₂-controlled atmosphere technique. This may be accomplished by placing test solutions and test organisms in closed headspace test chambers, and then injecting a predetermined volume of CO₂ into the headspace of each test chamber (USEPA, 1991b; USEPA, 1992); or by placing test chambers in an atmosphere flushed with a predetermined mixture of CO₂ and air (USEPA, 1996). Prior experimentation will be needed to determine the appropriate CO₂/air ratio or the appropriate volume of CO₂ to inject. This volume will depend upon the sample pH, sample volume, container volume, and sample constituents. If more than 5% CO₂ is needed, adjust the solutions with acids (1N HCl) and then flush the headspace with no more than 5% CO₂ (USEPA, 1992). If the objective of the WET test is to determine the toxicity of the effluent in the

receiving water, atmospheric CO₂ in the test chambers is adjusted to maintain the test pH at the pH of the receiving water (measured at the edge of the regulatory mixing zone). If the objective of the WET test is to determine the absolute toxicity of the effluent, atmospheric CO₂ in the test chambers is adjusted to maintain the test pH at the pH of the sample after adjusting the sample salinity for use in marine testing. USEPA (1996) and Mount and Mount (1992) provide techniques and guidance for controlling test pH using a CO₂-controlled atmosphere. In pH-controlled testing, control treatments must be subjected to all manipulations that sample treatments are subjected to. These manipulations must be shown to cause no lethal or sublethal effects on control organisms. In pH-controlled testing, the pH also must be measured in each treatment at the beginning and end of each 24-h exposure period to confirm that pH was effectively controlled at the target pH level.

14.4 SAFETY

14.4.1 See Section 3, Health and Safety.

14.5 APPARATUS AND EQUIPMENT

14.5.1 Facilities for holding and acclimating test organisms.

14.5.2 Brine shrimp, *Artemia*, culture unit -- see Subsection 14.6.12 below and Section 4, Quality Assurance.

14.5.3 Mysid, *Mysidopsis bahia*, culture unit -- see Subsection 14.13 below. This test requires a minimum of 240 7-day old (juvenile) mysids. It is preferable to obtain the test organisms from an in-house culture unit. If it is not feasible to culture mysids in-house, juveniles can be obtained from other sources, if shipped in well oxygenated saline water in insulated containers.

14.5.4 Samplers -- automatic sampler, preferably with sample cooling capability, that can collect a 24-h composite sample of 5 L.

14.5.5 Environmental chamber or equivalent facility with temperature control ($26 \pm 1^\circ\text{C}$).

14.5.6 Water purification system -- Millipore Milli-Q[®], deionized water or equivalent.

14.5.7 Balance -- Analytical, capable of accurately weighing to 0.00001 g.

14.5.8 Reference weights, Class S -- for checking performance of balance. Weights should bracket the expected weights of the weighing pans and weighing pans plus organisms.

14.5.9 Drying oven -- 50-105°C range, for drying organisms.

14.5.10 Desiccator -- for holding dried organisms.

14.5.11 Air pump -- for oil-free air supply.

14.5.12 Air lines, and air stones -- for aerating cultures, brood chambers, and holding tanks, and supplying air to test solutions with low DO.

14.5.13 Meters, pH and DO -- for routine physical and chemical measurements.

14.5.14 Tray -- for test vessels; approximately 90 X 48 cm to hold 56 vessels.

14.5.15 Standard or micro-Winkler apparatus -- for determining DO and checking DO meters.

- 14.5.16 Dissecting microscope (350-400X magnification) -- for examining organisms in the test vessels to determine their sex and to check for the presence of eggs in the oviducts of the females.
- 14.5.17 Light box -- for illuminating organisms during examination.
- 14.5.18 Refractometer or other method -- for determining salinity.
- 14.5.19 Thermometers, glass or electronic, laboratory grade -- for measuring water temperatures.
- 14.5.20 Thermometers, bulb-thermograph or electronic-chart type -- for continuously recording temperature.
- 14.5.21 Thermometer, National Bureau of Standards Certified (see USEPA Method 170.1, USEPA, 1979b) -- to calibrate laboratory thermometers.
- 14.5.22 Test chambers -- 200 mL borosilicate glass beakers or non-toxic 8 oz disposable plastic cups or other similar containers. Forty-eight (48) test vessels are required for each test (eight replicates at each of five effluent concentrations and a control). To avoid potential contamination from the air and excessive evaporation of test solutions during the test, the chambers should be covered with safety glass plates or sheet plastic (6 mm thick).
- 14.5.23 Beakers or flasks -- six, borosilicate glass or non-toxic plasticware, 2000 mL for making test solutions.
- 14.5.24 Wash bottles -- for deionized water, for washing organisms from containers and for rinsing small glassware and instrument electrodes and probes.
- 14.5.25 Volumetric flasks and graduated cylinders -- Class A, borosilicate glass or non-toxic plastic labware, 50-2000 mL for making test solutions.
- 14.5.26 Separatory funnels, 2-L -- Two-four for culturing *Artemia*.
- 14.5.27 Pipets, volumetric -- Class A, 1-100 mL.
- 14.5.28 Pipets, automatic -- adjustable, 1-100 mL.
- 14.5.29 Pipets, serological -- 1-10 mL, graduated.
- 14.5.30 Pipet bulbs and fillers -- PROPIPET[®], or equivalent.
- 14.5.31 Droppers, and glass tubing with fire polished edges, 4 mm ID -- for transferring organisms.
- 14.5.32 Forceps -- for transferring organisms to weighing pans.
- 14.5.33 NITEX[®] or stainless steel mesh sieves ($\leq 150\ \mu\text{m}$, 500-1000 μm , 3-5 mm) -- for concentrating organisms.
- 14.5.34 Depression glass slides or depression spot plates -- two, for observing organisms.

14.6 REAGENTS AND CONSUMABLE MATERIALS

- 14.6.1 Sample containers -- for sample shipment and storage (see Section 8, Effluent and Receiving Water Sampling, Sample Handling, and Sample Preparation for Toxicity Tests).
- 14.6.2 Data sheets (one set per test) -- for data recording (Figures 2, 7, and 8).
- 14.6.3 Tape, colored -- for labeling test chambers.

14.6.4 Markers, waterproof -- for marking containers, etc.

14.6.5 Weighing pans, aluminum -- to determine the dry weight of organisms.

14.6.6 Buffers, pH 4, pH 7, and pH 10 (or as per instructions of instrument manufacturer) -- for standards and calibration check (see USEPA Method 150.1, USEPA, 1979b).

14.6.7 Membranes and filling solutions -- for dissolved oxygen probe (see USEPA Method 360.1, USEPA, 1979b), or reagents for modified Winkler analysis.

14.6.8 Laboratory quality assurance samples and standards -- for the above methods.

14.6.9 Reference toxicant solutions -- see Section 4, Quality Assurance.

14.6.10 Reagent water -- defined as distilled or deionized water that does not contain substances which are toxic to the test organisms (see Section 5, Facilities, Equipment, and Supplies).

14.6.11 Effluent, receiving water, and dilution water -- see Section 7, Dilution Water, and Section 8, Effluent and Receiving Water Sampling, Sample Handling, and Sample Preparation for Toxicity Tests. Dilution water containing organisms that might prey upon or otherwise interfere with the test organisms should be filtered through a fine mesh net (with 150 μ m or smaller openings).

14.6.11.1 Saline test and dilution water -- The salinity of the test water must be in the range of 20‰ to 30‰. The salinity should vary by no more than $\pm 2\%$ among the chambers on a given day. If effluent and receiving water tests are conducted concurrently, the salinities of these tests should be similar.

14.6.11.2 The overwhelming majority of industrial and sewage treatment effluents entering marine and estuarine systems contain little or no measurable salts. Exposure of mysids to these effluents will require adjustments in the salinity of the test solutions. It is important to maintain a constant salinity across all treatments. In addition, it may be desirable to match the test salinity with that of the receiving water. Two methods are available to adjust salinities -- a hypersaline brine (HSB) derived from natural seawater or artificial sea salts.

14.6.11.3 HSB has several advantages that make it desirable for use in toxicity testing. It can be made from any high quality, filtered seawater by evaporation, and can be added to the effluent or to deionized water to increase the salinity. Brine derived from natural seawater contains the necessary trace metals, biogenic colloids, and some of the microbial components necessary for adequate growth, survival, and/or reproduction of marine and estuarine organisms, and may be stored for prolonged periods without any apparent degradation. However, if 100% HSB is used as a diluent, the maximum concentration of effluent that can be tested is 80% effluent at 30‰ salinity and 70% effluent at 30‰ salinity.

14.6.11.3.1 The ideal container for making brine from natural seawater is one that (1) has a high surface to volume ratio, (2) is made of a non-corrosive material, and (3) is easily cleaned (fiberglass containers are ideal). Special care should be used to prevent any toxic materials from coming in contact with the seawater being used to generate the brine. If a heater is immersed directly into the seawater, ensure that the heater materials do not corrode or leach any substances that would contaminate the brine. One successful method used is a thermostatically controlled heat exchanger made from fiberglass. If aeration is used, only oil-free air compressors should be used to prevent contamination.

14.6.11.3.2 Before adding seawater to the brine generator, thoroughly clean the generator, aeration supply tube, heater, and any other materials that will be in direct contact with the brine. A good quality biodegradable detergent should be used, followed by several (at least three) thorough deionized water rinses.

14.6.11.3.3 High quality (and preferably high salinity) seawater should be filtered to at least 10 µm before placing into the brine generator. Water should be collected on an incoming tide to minimize the possibility of contamination.

14.6.11.3.4 The temperature of the seawater is increased slowly to 40°C. The water should be aerated to prevent temperature stratification and to increase water evaporation. The brine should be checked daily (depending on the volume being generated) to ensure that the salinity does not exceed 100‰ and that the temperature does not exceed 40°C. Additional seawater may be added to the brine to obtain the volume of brine required.

14.6.11.3.5 After the required salinity is attained, the HSB should be filtered a second time through a 1 mm filter and poured directly into portable containers (20-L cubitainers or polycarbonate water cooler jugs are suitable). The containers should be capped and labeled with the date the brine was generated and its salinity. Containers of HSB should be stored in the dark and maintained under room temperature until used.

14.6.11.3.6 If a source of HSB is available, test solutions can be made by following the directions below. Thoroughly mix together the deionized water and HSB before mixing in the effluent.

14.6.11.3.7 Divide the salinity of the HSB by the expected test salinity to determine the proportion of deionized water to brine. For example, if the salinity of the brine is 100‰ and the test is to be conducted at 20‰, $100‰ \div 20‰ = 5.0$. The proportion of brine is 1 part in 5 (one part brine to four parts deionized water). To make 1 L of seawater at 20‰ salinity from a HSB of 100‰, 200 mL of brine and 800 mL of deionized water are required.

14.6.11.3.8 Table 2 illustrates the composition of 1800 mL test solutions at 20‰ if they are made by combining effluent (0‰), deionized water and HSB of 100‰ (only). The volume (mL) of brine required is determined by using the amount calculated above. In this case, 200 mL of brine is required for 1 L; therefore, 360 mL would be required for 1.8 L of solution. The volumes of HSB required are constant. The volumes of deionized water are determined by subtracting the volumes of effluent and brine from the total volume of solution: $1800 \text{ mL} - \text{mL effluent} - \text{mL brine} = \text{mL deionized water}$.

14.6.11.4 Artificial sea salts: FORTY FATHOMS® brand sea salts have been used successfully to culture and perform life cycle tests with mysids (Horne, et al., 1983; ASTM, 1993) (see Section 7, Dilution Water). HW MARINEMIX® sea salts have been used successfully to culture mysids and perform the mysid toxicity test (USEPA Region 6 Houston Laboratory; EMSL-Cincinnati). In addition, a slightly modified version of the GP2 medium (Spotte et al., 1984) has been successfully used to perform the mysid survival, growth, and fecundity test (Table 1).

14.6.11.4.1 Synthetic sea salts are packaged in plastic bags and mixed with deionized water or equivalent. The instructions on the package of sea salts should be followed carefully, and the salts should be mixed in a separate container -- not in the culture tank. The deionized water used in hydration should be in the temperature range of 21-26°C. Seawater made from artificial sea salts is conditioned (Spotte, 1973; Spotte, et al., 1984; Bower, 1983) before it is used for culturing or testing. After adding the water, place an airstone in the container, cover, and aerate the solution mildly for 24 h before use.

14.6.11.4.2 The GP2 reagent grade chemicals (Table 1) should be mixed with deionized (DI) water or its equivalent in a container other than the culture or testing tanks. The deionized water used for hydration should be between 21-26°C. The artificial seawater must be conditioned (aerated) for 24 h before use as the testing medium. If the solution is to be autoclaved, sodium bicarbonate is added after the solution has cooled. A stock solution of sodium bicarbonate is made up by dissolving 33.6 g NaHCO₃ in 500 mL of deionized water. Add 2.5 mL of this stock solution for each liter of the GP2 artificial seawater.

TABLE 1. REAGENT GRADE CHEMICALS USED IN THE PREPARATION OF GP2 ARTIFICIAL SEAWATER FOR THE MYSID, *MYSIDOPSIS BAHIA*, TOXICITY TEST^{1,2,3}

Compound	Concentration (g/L)	Amount (g) Required for 20L
NaCl	21.03	420.6
Na ₂ SO ₄	3.52	70.4
Kcl	0.61	12.2
KBr	0.088	1.76
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10 H ₂ O	0.034	0.68
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	9.50	190.0
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	1.32	26.4
SrCl ₂ ·6 H ₂ O	0.02	0.400
NaHCO ₃	0.17	3.40

¹ Modified GP2 from Spotte et al. (1984).

² The constituent salts and concentrations were taken from USEPA (1990b). The salinity is 30.89 g/L.

³ GP2 can be diluted with deionized (DI) water to the desired test salinity.

14.6.12 BRINE SHRIMP, *ARTEMIA*, NAUPLII -- for feeding cultures and test organisms.

14.6.12.1 Newly hatched *Artemia* nauplii are used for food for the stock cultures and test organisms. Although there are many commercial sources of brine shrimp cysts, the Brazilian or Colombian strains are preferred because the supplies examined have had low concentrations of chemical residues and produce nauplii of suitably small size.

TABLE 2. QUANTITIES OF EFFLUENT, DEIONIZED WATER, AND HYPERSALINE BRINE (100‰) NEEDED TO PREPARE 1800 ML VOLUMES OF TEST SOLUTION WITH A SALINITY OF 20‰

Effluent Concentration (%)	Volume of Effluent (0‰) (mL)	Volume of Deionized Water (mL)	Volume of Hypersaline Brine (mL)	Total Volume (mL)
80	1440	0	360	1800
40	720	720	360	1800
20	360	1080	360	1800
10	180	1260	360	1800
5	90	1350	360	1800
Control	0	1440	360	1800
Total	2790	5850	2160	10800

14.6.12.2 Each new batch of *Artemia* cysts must be evaluated for size (Vanhaecke and Sorgeloos, 1980, and Vanhaecke et al., 1980) and nutritional suitability (Leger, et al., 1985, Leger, et al., 1986) against known suitable reference cysts by performing a side-by-side larval growth test using the "new" and "reference" cysts. The "reference" cysts used in the suitability test may be a previously tested and acceptable batch of cysts. A sample of newly-hatched *Artemia* nauplii from each new batch of cysts should be chemically analyzed. The *Artemia* cysts should not be used if the concentration of total organic chlorine exceeds 0.15 µg/g wet weight or the total concentration of organochlorine pesticides plus PCBs exceeds 0.30 µg/g wet weight (For analytical methods see USEPA, 1982).

14.6.12.2.1 *Artemia* nauplii are obtained as follows:

1. Add 1 L of seawater, or an aqueous uniodized salt (NaCl) solution prepared with 35 g salt or artificial sea salts to 1 L of deionized water, to a 2-L separatory funnel, or equivalent.
2. Add 10 mL *Artemia* cysts to the separatory funnel and aerate for 24 h at 27°C. Hatching time varies with incubation temperature and the geographic strain of *Artemia* used (see USEPA, 1985a; USEPA, 2002a; ASTM, 1993).
3. After 24 h, cut off the air supply in the separatory funnel. *Artemia* nauplii are phototactic, and will concentrate at the bottom of the funnel if it is covered for 5-10 minutes. To prevent mortality, do not leave the concentrated nauplii at the bottom of the funnel more than 10 min without aeration.
4. Drain the nauplii into a beaker or funnel fitted with a 150 µm NITEX® or stainless steel screen, and rinse with seawater or equivalent before use.

14.6.12.3 Testing *Artemia* nauplii as food for toxicity test organisms.

14.6.12.3.1 The primary criteria for acceptability of each new supply of brine shrimp, cysts is adequate survival, growth, and reproduction of the mysids. The mysids used to evaluate the acceptability of the brine shrimp nauplii must be of the same geographical origin and stage of development (7 days old) as those used routinely in the toxicity tests. Sufficient data to detect differences in survival and growth should be obtained by using eight replicate test chambers, each containing 5 mysids, for each type of food.

14.6.12.3.2 The feeding rate and frequency, test vessels, volume of control water, duration of the test, and age of the *Artemia* nauplii at the start of the test, should be the same as used for the routine toxicity tests.

14.6.12.3.3 Results of the brine shrimp, *Artemia*, nauplii nutrition assay, where there are only two treatments, can be evaluated statistically by use of a t test. The "new" food is acceptable if there are no statistically significant differences in the survival, growth, and reproduction of the mysids fed the two sources of nauplii.

14.6.13 TEST ORGANISMS, *Mysidopsis bahia* (see Rodgers et al., 1986 and USEPA, 2002a for information on mysid ecology). The genus name of this organism was formally changed to *Americamysis* (Price et al., 1994); however, the method manual will continue to refer to *Mysidopsis bahia* to maintain consistency with previous versions of the method.

14.6.13.1 Brood Stock

14.6.13.1.1 To provide an adequate supply of juveniles for a test, mysid, *Mysidopsis bahia*, cultures should be started at least four weeks before the test animals are needed. At least 200 mysids, *Mysidopsis bahia*, should be placed in each culture tank to ensure that 1500 to 2000 animals will be available by the time preparations for a test are initiated.

14.6.13.1.2 Mysids, *Mysidopsis bahia*, may be shipped or otherwise transported in polyethylene bottles or CUBITAINERS®. Place 50 animals in 700 mL of seawater in a 1-L shipping container. To control bacterial growth and prevent DO depletion during shipment, do not add food. Before closing the shipping container, oxygenate the water for 10 min. The mysids, *Mysidopsis bahia*, will starve if not fed within 36 h, therefore, they should be shipped so that they are not in transit more than 24 h.

14.6.13.1.3 The identification of the *Mysidopsis bahia* stock culture should be verified using the key from Heard (1982), Price (1978), Price, (1982), Stuck et al. (1979a), and Stuck et al. (1979b). Records of the verification should be retained along with a few of the preserved specimens.

14.6.13.1.4 Glass aquaria (120- to 200-L) are recommended for cultures. Other types of culture chambers may also be convenient. Three or more separate cultures should be maintained to protect against loss of the entire culture stock in case of accident, low DO, or high nitrite levels, and to provide sufficient numbers of juvenile mysids, *Mysidopsis bahia*, for toxicity tests. Fill the aquaria about three-fourths full of seawater. A flow-through system is recommended if sufficient natural seawater is available, but a closed, recirculating or static renewal system may be used if proper water conditioning is provided and care is exercised to keep the pH above 7.8 and nitrite levels below 0.05 mg/L.

14.6.13.1.5 Standard aquarium undergravel filters should be used with either the flow-through or recirculating system to provide aeration and a current conducive to feeding (Gentile et al., 1983). The undergravel filter is covered with a prewashed, coarse (2-5 mm) dolomite substrate, 2.5 cm deep for flow-through cultures or 10 cm deep for recirculating cultures.

14.6.13.1.6 The recirculating culture system is conditioned as follows:

1. After the dolomite has been added, the filter is attached to the air supply and operated for 24 h.
2. Approximately 4 L of seed water obtained from a successfully operating culture is added to the culture chamber.
3. The nitrite level is checked daily with an aquarium test kit or with EPA Method 354.1 (USEPA, 1979b).
4. Add about 30 mL of concentrated *Artemia* nauplii every other day until the nitrite level reaches at least 2.0 mg/L. The nitrite will continue to rise for several days without adding more *Artemia* nauplii and will then slowly decrease to less than 0.05 mg/L.

5. After the nitrite level falls below 0.05 mg/L, add another 30 mL of *Artemia* nauplii concentrate and check the nitrite concentration every day.
6. Continue this cycle until the addition of *Artemia* nauplii does not cause a rise in the nitrite concentration. The culture chamber is then conditioned and is ready to receive mysids.
7. Add only a few (5-20) mysids at first, to determine if conditions are favorable. If these mysids are still doing well after a week, several hundred more can be added.

14.6.13.1.7 It is important to add enough food to keep the adult animals from cannibalizing the young, but not so much that the DO is depleted or that there is a buildup of toxic concentrations of ammonia and nitrite. Just enough newly-hatched *Artemia* nauplii are fed twice a day so that each feeding is consumed before the next feeding.

14.6.13.1.8 Natural seawater is recommended as the culture medium, but HSB may be used to make up the culture water if natural seawater is not available. EMSL-Cincinnati has successfully used FORTY FATHOMS® artificial sea salts for culturing and toxicity tests of mysids, and USEPA, Region 6 has used HW MARINEMIX® artificial sea salts.

14.6.13.1.9 Mysids, *Mysidopsis bahia*, should be cultured at a temperature of $26 \pm 1^\circ\text{C}$. No water temperature control equipment is needed if the ambient laboratory temperature remains in the recommended range, and if there are no frequent, rapid, large temperature excursions in the culture room.

14.6.13.1.10 The salinity should be maintained at $30 \pm 2\text{‰}$, or at a lower salinity (but not less than 20‰) if most of the tests will be conducted at a lower salinity.

14.6.13.1.11 Day/night cycles prevailing in most laboratories will provide adequate illumination for normal growth and reproduction. A 16-h/8-h day/night cycle in which the light is gradually increased and decreased to simulate dawn and dusk conditions, is recommended.

14.6.13.1.12 Mysid, *Mysidopsis bahia*, culture may suffer if DOs fall below 5 mg/L for extended periods. The undergravel filter will usually provide sufficient DO. If the DO drops below 5 mg/L at 25°C and 30‰, additional aeration should be provided. Measure the DO in the cultures daily the first week and then at least weekly thereafter.

14.6.13.1.13 Suspend a clear glass or plastic panel over the cultures, or use some other means of excluding dust and dirt, but leave enough space between the covers and culture tanks to allow circulation of air over the cultures.

14.6.13.1.14 If hydroids or worms appear in the cultures, remove the mysids and clean the chambers thoroughly, using soap and hot water. Rinse once with acid (10% HCl) and three times with distilled or deionized water. Mysids with attached hydroids should be discarded. Those without hydroids should be transferred by hand pipetting into three changes of clean seawater before returning them to the cleaned culture chamber. To guard against predators, natural seawater should be filtered through a net with 30 μm mesh openings before entering the culture vessels.

14.6.13.1.15 Mysids, *Mysidopsis bahia*, are very sensitive to low pH and sudden changes in temperature. Care should be taken to maintain the pH at 8.0 ± 0.3 , and to limit rapid changes in water temperature to less than 3°C .

14.6.13.1.16 Mysids, *Mysidopsis bahia*, should be handled carefully and as little as possible so that they are not unnecessarily stressed or injured. They should be transferred between culture chambers with long handled cups with netted bottoms. Animals should be transferred to the test vessels with a large bore pipette (4-mm), taking care to release the animals under the surface of the water. Discard any mysids that are injured during handling.

14.6.13.1.17 Culture Maintenance (Also See USEPA, 2002a)

14.6.13.1.17.1 Cultures in closed, recirculating systems are fed twice a day. If no nauplii are present in the culture chamber after four hours, the amount of food should be increased slightly. In flow-through systems, excess food can be a problem by promoting bacterial growth and low dissolved oxygen.

14.6.13.1.17.2 Careful culture maintenance is essential. The organisms should not be allowed to become too crowded. The cultures should be cropped as often as necessary to maintain a density of about 20 mysids per liter. At this density, at least 70% of the females should have eggs in their brood pouch. If they do not, the cultures are probably under stress, and the cause should be found and corrected. If the cause cannot be found, it may be necessary to restart the cultures with a clean culture chamber, a new batch of culture water, and clean gravel.

14.6.13.1.17.3 In closed, recirculating systems, about one third of the culture water should be replaced with newly prepared seawater every week. Before siphoning the old media from the culture, it is recommended that the sides of the vessel be scraped and the gravel carefully turned over to prevent excessive buildup of algal growth. Twice a year the mysids should be removed from the recirculating cultures, the gravel rinsed in clean seawater, the sides of the chamber washed with clean seawater, and the gravel and animals returned to the culture vessel with newly conditioned seawater. No detergent should be used, and care should be taken not to rinse all the bacteria from the gravel.

14.6.13.2 Test Organisms

14.6.13.2.1 The test is begun with 7-day-old juveniles. To have the test animals available and acclimated to test conditions at the start of the test, gravid females must be obtained from the stock culture eight days in advance of the test. Whenever possible, brood stock should be obtained from cultures having similar salinity, temperature, light regime, etc., as are to be used in the toxicity test.

14.6.13.2.2 Eight days before the test is to start, sufficient gravid females are placed in brood chambers. Assuming that 240 juveniles are needed for each test, approximately half this number (120) of gravid females should be transferred to brood chambers. The mysids are removed from the culture tank with a net or netted cup and placed in 20-cm diameter finger bowls. The gravid females are transferred from the finger bowls to the brood chambers with a large-bore pipette or, alternatively, are transferred by pouring the contents of the finger bowls into the water in the brood chambers.

14.6.13.2.3 The mysid juveniles may be collected for the toxicity tests by transferring gravid females from the stock cultures to netted (1000 μ m) flow-through containers (Figure 1) held within 4-L glass, wide-mouth separatory funnels. Newly released juveniles can pass through the netting, whereas the females are retained. The gravid females are fed newly hatched *Artemia* nauplii, and are held overnight to permit the release of young. The juvenile mysids are collected by opening the stopcock on the funnel and collecting them in another container from which they are transferred to holding tanks using a wide bore (4 mm ID) pipette. The brood chambers usually require aeration to maintain sufficient DO and to keep the food in suspension.

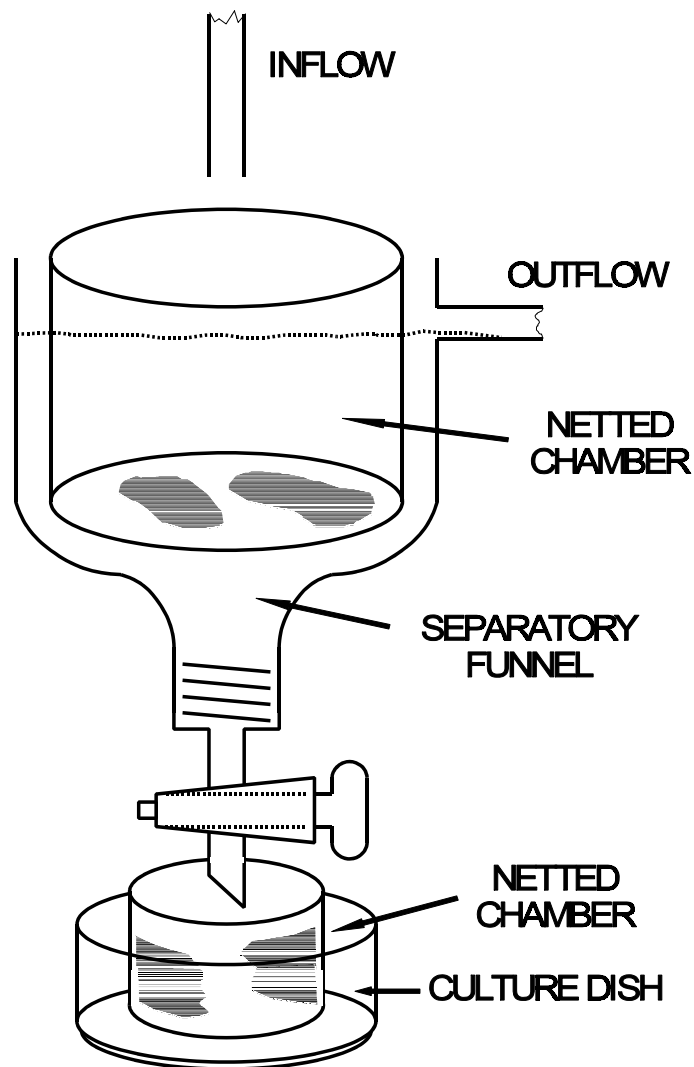


Figure 1. Apparatus (brood chamber) for collection of juvenile mysids, *Mysidopsis bahia*. From USEPA (1987d).

14.6.13.2.4 The temperature in the brood chamber should be maintained at the upper acceptable culture limit (26 - 27°C), or 1°C higher than the cultures, to encourage faster brood release. At this temperature, sufficient juveniles should be produced for the test.

14.6.13.2.5 The newly released juveniles (age = 0 days) are transferred to 20-L glass aquaria (holding vessels) which are gently aerated. Smaller holding vessels may be used, but the density of organisms should not exceed 10 mysids per liter. The test animals are held in the holding vessel for six days prior to initiation of the test. The holding medium is renewed every other day.

14.6.13.2.6 During the holding period, the mysids are acclimated to the salinity at which the test will be conducted, unless already at that salinity. The salinity should be changed no more than 2‰ per 24 h to minimize stress on the juveniles.

14.6.13.2.7 The temperature during the holding period is critical to mysid development, and must be maintained at $26 \pm 1^\circ\text{C}$. If the temperature cannot be maintained in this range, it is advisable to hold the juveniles an additional day before beginning the test.

14.6.13.2.8 During the holding period, just enough newly-hatched *Artemia* nauplii are fed twice a day (a total of at least 150 nauplii per mysid per day) so that some food is constantly present.

14.6.13.2.9 If the test is to be performed in the field, the juvenile mysids, *Mysidopsis bahia*, should be gently siphoned into 1-L polyethylene wide-mouth jars with screw-cap lids filled two-thirds full with clean seawater from the holding tank. The water in these jars is aerated for 10 min, and the jars are capped and packed in insulated boxes for shipment to the test site. Food should not be added to the jars to prevent the development of excessive bacterial growth and a reduction in DO.

14.6.13.2.10 Upon arrival at the test site (in less than 24 h) the mysids, *Mysidopsis bahia*, are gently poured from the jars into 20-cm diameter glass culture dishes. The jars are rinsed with salt water to dislodge any mysids that may adhere to the sides. If the water appears milky, siphon off half of it with a netted funnel (to avoid siphoning the mysids) and replace with clean salt water of the same salinity and temperature. If no *Artemia* nauplii are present in the dishes, feed about 150 *Artemia* nauplii per mysid.

14.6.13.2.11 The pre-test holding conditions of test organisms (as well as the test conditions) have been shown to significantly influence the success of achieving the test acceptability criteria for the fecundity endpoint (egg production by 50% or more of control females). Temperature, feeding, and organism density are important factors in the rate of mysid development. Laboratories should optimize these factors (within the limits of the test procedure) during both the pre-test holding period and the testing period to encourage achieving the test acceptability criteria for the fecundity endpoint. If test organisms are purchased, the testing laboratory should also confer with the supplier to ensure that pre-test holding conditions are optimized to successfully achieve the fecundity endpoint. Lussier *et al.* (1999) found that by increasing holding temperature and test temperature from $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ to $26^\circ\text{C} - 27^\circ\text{C}$ and maintaining holding densities to ≤ 10 organisms / L, the percentage of tests meeting the test acceptability criteria for fecundity increased from 60% to 97%. While the fecundity endpoint is an optional endpoint, it is often the most sensitive measure of toxicity, and the 7-d mysid test estimates the chronic toxicity of effluents most effectively when all three endpoints (survival, growth, and fecundity) are measured (Lussier *et al.* 1999).

14.7 EFFLUENT AND RECEIVING WATER COLLECTION, PRESERVATION, AND STORAGE

14.7.1 See Section 8, Effluent and Receiving Water Sampling, Sample Handling, and Sample Preparation for Toxicity Tests.

14.8 CALIBRATION AND STANDARDIZATION

14.8.1 See Section 4, Quality Assurance.

14.9 QUALITY CONTROL

14.9.1 See Section 4, Quality Assurance.

14.9.2 The reference toxicant recommended for use with the mysid 7-day test is copper sulfate or sodium dodecyl sulfate.

14.10 TEST PROCEDURES

14.10.1 TEST DESIGN

14.10.1.1 The test consists of at least five effluent concentrations plus a site water control and a reference water treatment (natural seawater or seawater made up from hypersaline brine, or equivalent).

14.10.1.2 Effluent concentrations are expressed as percent effluent.

14.10.1.3 Eight replicate test vessels, each containing 5 to 7 day old animals, are used per effluent concentration and control.

14.10.2 TEST SOLUTIONS

14.10.2.1 Receiving waters

14.10.2.1.1 The sampling point(s) is determined by the objectives of the test. At estuarine and marine sites, samples are usually collected at mid-depth. Receiving water toxicity is determined with samples used directly as collected or with samples passed through a 60 μm NITEX[®] filter and compared without dilution, against a control. Using eight replicate chambers per test, each containing 150 mL, and 400 mL for chemical analysis, would require approximately 1.6 L or more of sample per test per day.

14.10.2.2 Effluents

14.10.2.2.1 The selection of the effluent test concentrations should be based on the objectives of the study. A dilution factor of 0.5 is commonly used. A dilution factor of 0.5 provides precision of $\pm 100\%$, and testing of concentrations between 6.25% and 100% effluent using only five effluent concentrations (6.25%, 12.5%, 25%, 50%, and 100%). Test precision shows little improvement as dilution factors are increased beyond 0.5 and declines rapidly if smaller dilution factors are used. **Therefore, USEPA recommends the use of the ≥ 0.5 dilution factor.** If 100‰ HSB is used as a diluent, the maximum concentration of effluent that can be tested will be 80% at 20‰ and 70% at 30‰ salinity.

14.10.2.2.2 If the effluent is known or suspected to be highly toxic, a lower range of effluent concentrations should be used (such as 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, and 1.56%). If high mortality is observed during the first 1-to-2 h of the test, additional dilutions at the lower range of effluent concentrations should be added.

14.10.2.2.3 The volume of effluent required for daily renewal of eight replicates per concentration for five concentrations of effluent and a control, each containing 150 mL of test solution, is approximately 1200 mL. Prepare enough test solution (approximately 1600 mL) at each effluent concentration to provide 400 mL additional volume for chemical analyses.

14.10.2.2.4 Just prior to test initiation (approximately 1 h), the temperature of a sufficient quantity of the sample to make the test solutions should be adjusted to the test temperature ($26 \pm 1^\circ\text{C}$) and maintained at that temperature during the addition of dilution water.

14.10.2.2.5 Higher effluent concentrations (i.e., 25%, 50%, and 100%) may require aeration to maintain adequate dissolved oxygen concentrations. However, if one solution is aerated, all concentrations must be aerated. Aerate effluent as it warms and continue to gently aerate test solutions in the test chambers for the duration of the test.

14.10.2.2.6 Effluent dilutions should be prepared for all replicates in each treatment in one flask to minimize variability among the replicates. The test chambers (cups) are labeled with the test concentration and replicate number. Dispense 150 mL of the appropriate effluent dilution to each test chamber.

14.10.2.3 Dilution Water

14.10.2.3.1 Dilution water may be uncontaminated natural seawater (receiving water), HSB prepared from natural seawater, or artificial seawater prepared from FORTY FATHOMS® or GP2 sea salts (see Table 1 and Section 7, Dilution Water). Other artificial sea salts may be used for culturing mysid and for the survival, growth, and fecundity test if the control criteria for acceptability of test data are satisfied.

14.10.3 START OF THE TEST

14.10.3.1 The test should begin as soon as possible, preferably within 24 h after sample collection. The maximum holding time following retrieval of the sample from the sampling device should not exceed 36 h for off-site toxicity tests unless permission is granted by the permitting authority. In no case should the test be started more than 72 h after sample collection (see Section 8, Effluent and Receiving Water Sampling, Sample Handling, and Sample Preparation for Toxicity Tests).

14.10.3.2 Begin the test by randomly placing five animals (one at a time) in each test cup of each treatment using a large bore (4 mm ID) pipette (see Appendix A for an example of randomization). It is easier to capture the animals if the volume of water in the dish is reduced and the dish is placed on a light table. It is recommended that the transfer pipette be rinsed frequently because mysids tend to adhere to the inside surface.

14.10.4 LIGHT, PHOTOPERIOD, SALINITY AND TEMPERATURE

14.10.4.1 The light quality and intensity under ambient laboratory conditions are generally adequate. Light intensity of 10-20 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, or 50 to 100 foot candles (ft-c), with a photoperiod of 16 h light and 8 h darkness. It is critical that the test water temperature be maintained at $26 \pm 1^\circ\text{C}$. It is recommended that the test water temperature be continuously recorded. The salinity should vary no more than $\pm 2\%$ among chambers on a given day. If effluent and receiving water tests are conducted concurrently, the salinities of these tests should be similar.

14.10.4.1.1 If a water bath is used to maintain the test temperature, the water depth surrounding the test cups should be at least 2.5 cm deep.

14.10.4.1.2 Rooms or incubators with high volume ventilation should be used with caution because the volatilization of the test solutions and evaporation of dilution water may cause wide fluctuations in salinity. Covering the test cups with clear polyethylene plastic may help prevent volatilization and evaporation of the test solutions.

14.10.5 DISSOLVED OXYGEN (DO) CONCENTRATION

14.10.5.1 Aeration may affect the toxicity of effluents and should be used only as a last resort to maintain a satisfactory DO. The DO should be measured on new solutions at the start of the test (Day 0) and before daily renewal of test solutions on subsequent days. The DO should not fall below 4.0 mg/L (see Section 8, Effluent and Receiving Water Sampling, Sample Handling, and Sample Preparation for Toxicity Tests). If it is necessary to aerate, all treatments and the control should be aerated. The aeration rate should not exceed 100 bubbles/minute, using a pipet with a 1-2 mm orifice, such as a 1-mL KIMAX® serological pipet, or equivalent. Care should be taken to ensure that turbulence resulting from aeration does not cause undue stress on the mysid.

14.10.6 FEEDING

14.10.6.1 *Artemia* nauplii are prepared as described above.

14.10.6.2 During the test, the mysids in each test chamber should be fed *Artemia* nauplii, (less than 24-h old), at the rate of 150 nauplii per mysid per day. Adding the entire daily ration at a single feeding immediately after test solution renewal may result in a significant DO depression. Therefore, it is preferable to feed half of the daily

ration immediately after test solution renewal, and the second half 8 - 12 h later. Increase the feeding if the nauplii are consumed in less than 4 h. It is important that the nauplii be washed before introduction to the test chamber.

14.10.7 DAILY CLEANING OF TEST CHAMBERS

14.10.7.1 Before the daily renewal of test solutions, uneaten and dead *Artemia*, dead mysids and other debris are removed from the bottom of the test chambers with a pipette. As much of the uneaten *Artemia* as possible should be removed from each chamber to ensure that the mysids principally eat new hatched nauplii. By placing the test chambers on a light box, inadvertent removal of live mysids can be greatly reduced because they can be more easily seen. Any incidence of removal of live mysids from the test chambers during cleaning, and subsequent return to the chambers should be noted in the test records.

14.10.8 OBSERVATIONS DURING THE TEST

14.10.8.1 Routine Chemical and Physical Determinations

14.10.8.1.1 DO is measured at the beginning and end of each 24-h exposure period in one test chamber at each test concentration and in the control.

14.10.8.1.2 Temperature, pH, and salinity are measured at the end of each 24-h exposure period in one test chamber at each concentration and in the control. Temperature should also be monitored continuously observed and recorded daily for at least two locations in the environmental control system or the samples. Temperature should be measured in a sufficient number of test chambers at least at the end of the test to determine temperature variation in environmental chamber.

14.10.8.1.3 The pH is measured in the effluent sample each day before new test solutions are made.

14.10.8.2 Routine Biological Observations

14.10.8.2.1 The number of live mysids are counted and recorded each day when the test solutions are renewed (Figure 7). Dead animals and excess food should be removed with a pipette before test solutions are renewed.

14.10.8.2.2 Protect the mysids from unnecessary disturbance during the test by carrying out the daily test observations, solution renewals, and removal of the dead mysids, carefully. Make sure the mysids remain immersed during the performance of the above operations.

14.10.9 TEST SOLUTION RENEWAL

14.10.9.1 Before the daily renewal of test solutions, slowly pour off all but 10 mL of the old test medium into a 20 cm diameter culture dish on a light table. Be sure to check for animals that may have adhered to the sides of the test chamber. Rinse them back into the test cups. Add 150 mL of new test solution slowly to each cup. Check the culture dish for animals that may have been poured out with the old media, and return them to the test chamber.

14.10.10 TERMINATION OF THE TEST

14.10.10.1 After measuring the DO, pH, temperature, and salinity and recording survival, terminate the test by pouring off the test solution in all the cups to a one cm depth and refilling the cups with clean seawater. This will keep the animals alive, but not exposed to the toxicant, while waiting to be examined for sex and the presence of eggs.

14.10.10.2 The live animals must be examined for eggs and the sexes determined within 12 h of the termination of the test. If the test was conducted in the field, and the animals cannot be examined on site, the live animals should be shipped back to the laboratory for processing. Pour each replicate into a labeled 100 mL plastic screw capped

jar, and send to the laboratory immediately.

14.10.10.3 If the test was conducted in the laboratory, or when the test animals arrive in the laboratory from the field test site, the test organisms must be processed immediately while still alive as follows:

14.10.10.3.1 Examine each replicate under a stereomicroscope (240X) to determine the number of immature animals, the sex of the mature animals, and the presence or absence of eggs in the oviducts or brood sacs of the females (see Figures 3-6). This must be done while the mysids are alive because they turn opaque upon dying. This step should not be attempted by a person who has not had specialized training in the determination of sex and presence of eggs in the oviduct. NOTE: Adult females without eggs in the oviduct or brood sac look like immature mysids (see Figure 6).

MATURE FEMALE, EGGS IN OVIDUCTS

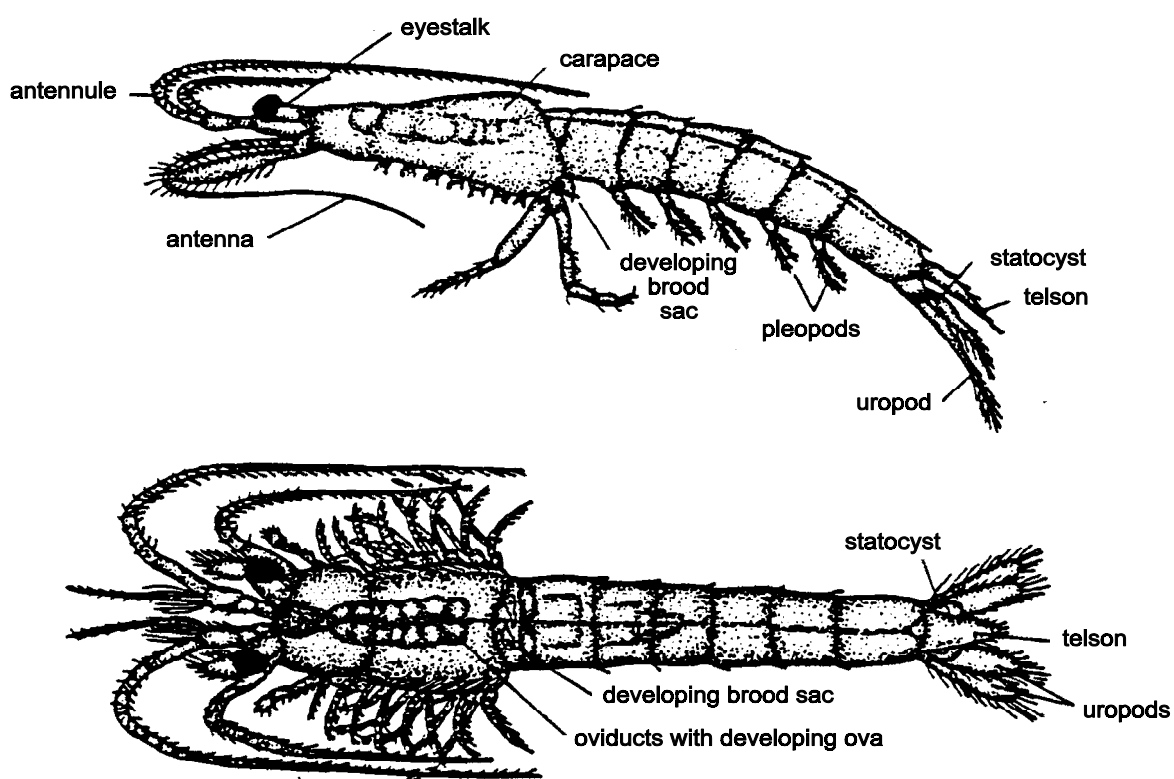


Figure 3. Mature female mysid, *Mysidopsis bahia*, with eggs in oviducts. From USEPA (1987d).

MATURE FEMALE, EGGS IN BROOD SAC

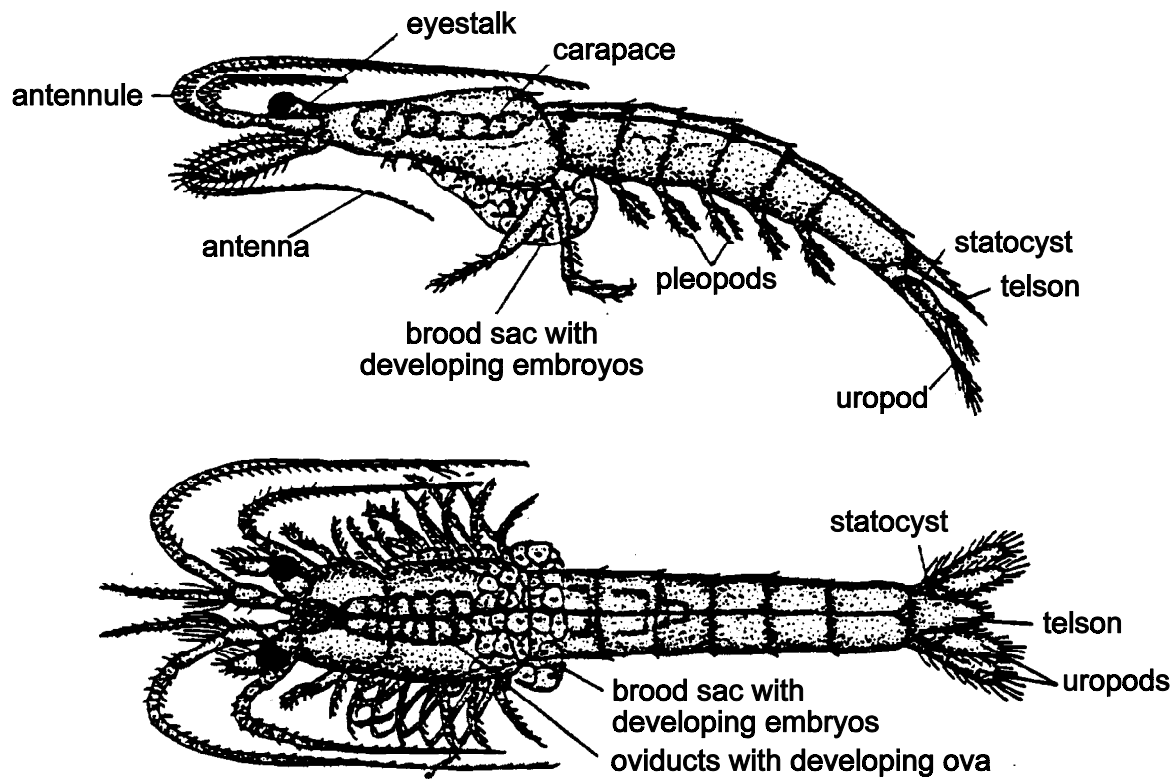


Figure 4. Mature female mysid, *Mysidopsis bahia*, with eggs in oviducts and developing embryos in the brood sac. Above: lateral view. Below: dorsal view. From USEPA (1987d).

14.10.10.3.2 Record the number of immatures, males, females with eggs and females without eggs on data sheets (Figure 7).

14.10.10.3.3 Rinse the mysids by pipetting them into a small netted cup and dipping the cup into a dish containing deionized water. Using forceps, place the mysids from each replicate cup on tared weighing boats and dry at 60°C for 24 h or at 105°C for at least 6 h.

14.10.10.3.4 Immediately upon removal from the drying oven, the weighing pans were placed in a dessicator until weighed, to prevent absorption of moisture from the air. Weigh to the nearest mg. Record weighing pans and subtract the tare weight to determine the dry weight of the mysid in each replicate. Record the weights (Figure 8). For each test chamber, divide the first dry weight by the number of original mysids per replicate to determine the average individual dry weight and record data. For the controls also calculate the mean weight per surviving mysid in the test chamber to evaluate if weights met test acceptability criteria (see Subsection 14.12).

14.10.9.3.5 Pieces of aluminum foil (1-cm square) or small aluminum weighing pans can be used for dry weight analyses. The weighing pans should not exceed 10 mg in weight.

14.10.9.3.6 Number each pan with a waterproof pen with the treatment concentration and replicate number. Forty-eight (48) weigh pans are required per test if all the organisms survive.

MATURE MALE

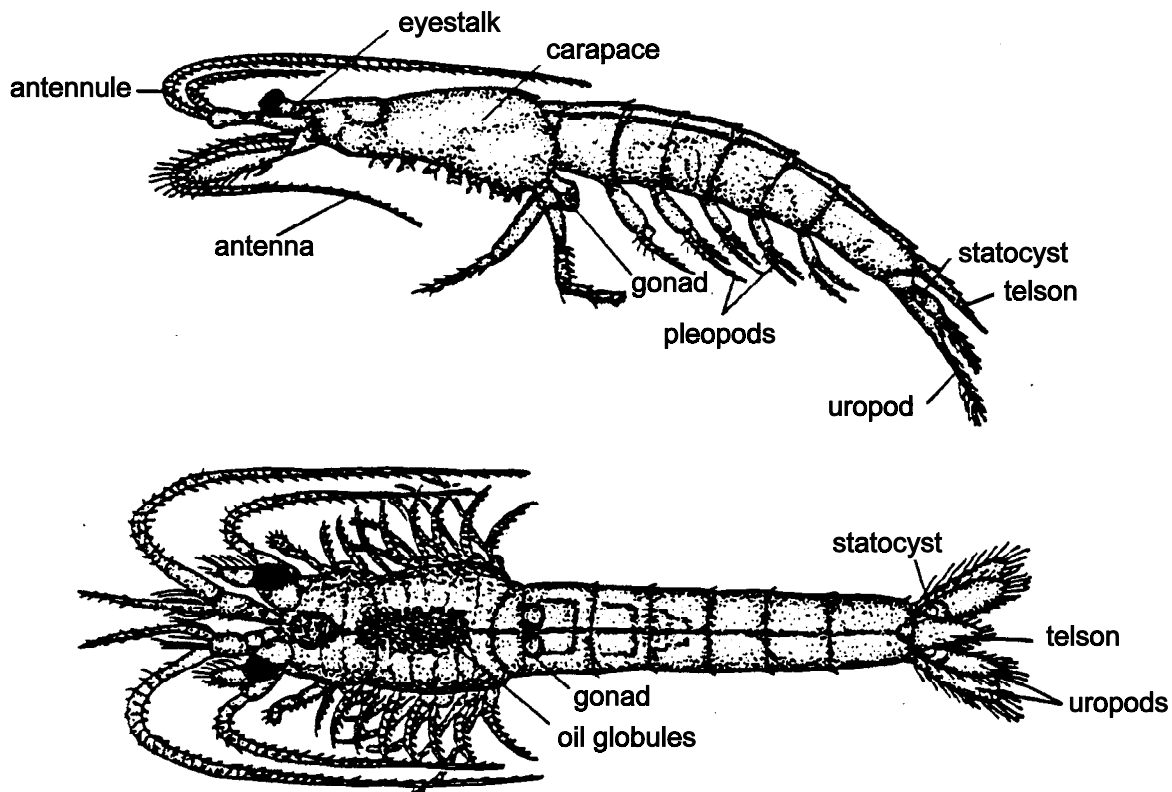


Figure 5. Mature male mysid, *Mysidopsis bahia*. From USEPA (1987d).

14.11 SUMMARY OF TEST CONDITIONS AND TEST ACCEPTABILITY CRITERIA

14.11.1 A summary of test conditions and test acceptability criteria is listed in Table 3.

14.12 ACCEPTABILITY OF TEST RESULTS

14.12.1 The minimum requirements for an acceptable test are 80% survival and an average weight of at least 0.20 mg/surviving mysid in the controls. If fecundity in the controls is adequate (egg production by 50% of females), fecundity should be used as a criterion of effect in addition to survival and growth.

IMMATURE

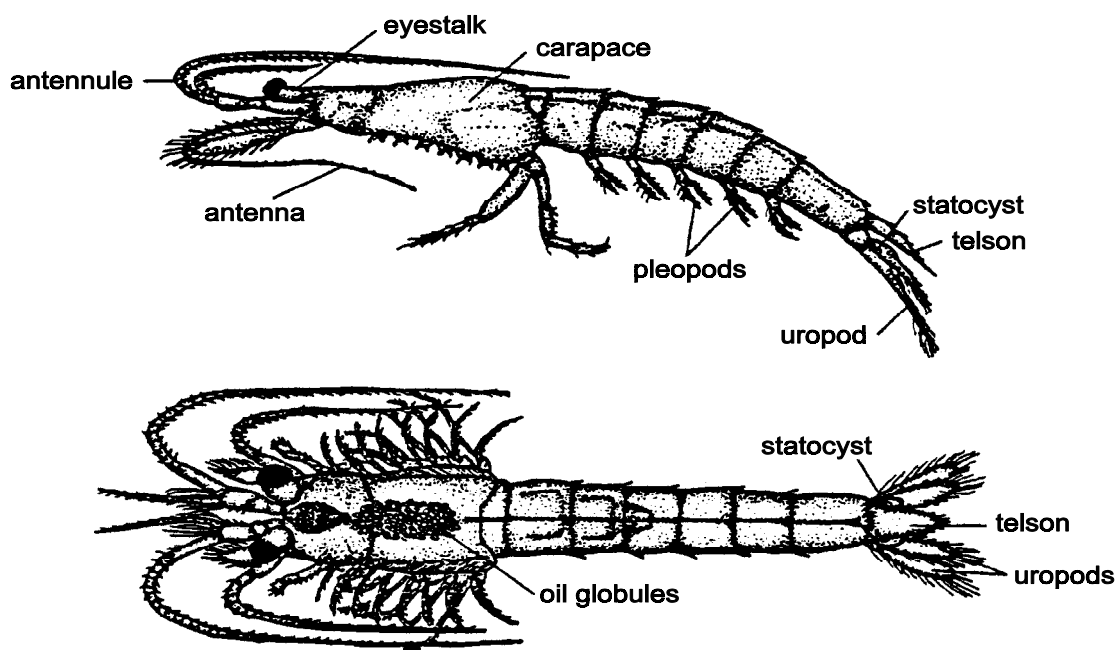


Figure 6. Immature mysid, *Mysidopsis bahia*, (A) lateral view, (B) dorsal view. From USEPA (1987d).

14.13 DATA ANALYSIS

14.13.1 GENERAL

14.13.1.1 Tabulate and summarize the data. Table 4 presents a sample set of survival, growth, and fecundity data.

14.13.1.2 The endpoints of the mysid 7-day chronic test are based on the adverse effects on survival, growth, and egg development. The LC50, the IC25, and the IC50 are calculated using point estimation techniques (see Section 9, Chronic Toxicity Test Endpoints and Data Analysis). LOEC and NOEC values for survival, growth, and fecundity are obtained using a hypothesis testing approach such as Dunnett's Procedure (Dunnett, 1955) or Steel's Many-one Rank Test (Steel, 1959; Miller, 1981) (see Section 9). Separate analyses are performed for the estimation of the LOEC and NOEC endpoints and for the estimation of the LC50, IC25, and IC50. Concentrations at which there is no survival in any of the test chambers are excluded from the statistical analysis of the NOEC and LOEC for survival, growth, and fecundity, but included in the estimation of the LC50, IC25, and IC50. See the Appendices for examples of the manual computations, and examples of data input and program output.

14.13.1.3 The statistical tests described here must be used with a knowledge of the assumptions upon which the tests are contingent. The assistance of a statistician is recommended for analysts who are not proficient in statistics.

Résumé : Le développement des oeufs et des juvéniles de seiche se déroule près des côtes où la contamination anthropique est la plus forte. A la suite des travaux s'intéressant à l'impact des éléments traces sur le stade oeuf de *Sepia officinalis*, nous avons cherché à déterminer la sensibilité du stade juvénile de cette espèce vis-à-vis d'un contaminant : le zinc, en diversifiant les biomarqueurs utilisés. Nos résultats ont montré que la seiche à ce stade de vie présente une sensibilité au zinc importante, liée à une faible capacité de régulation de cet élément par la voie dissoute. Des expositions à des concentrations non létales (i.e. $< 200 \mu\text{g L}^{-1}$) de durées allant d'une semaine à deux mois post-éclosion, ont affecté l'activité d'enzymes impliquées dans la digestion et l'immunité, mais aussi la croissance et le comportement du juvénile. Il a également été montré que l'homéostasie de certains éléments traces est modifiée à partir de concentrations d'environ $50 \mu\text{g L}^{-1}$ induisant des dommages tissulaires dès six semaines d'exposition. Par ailleurs, un élevage de proies adaptées au juvénile de seiche a été mis en place dans le but de réaliser des essais de contaminations trophiques.

Afin de développer des outils permettant d'étudier les effets précoces d'une contamination sur cette espèce, la répartition tissulaire d'enzymes impliquées dans le système immunitaire (phénoloxydases, lysozymes et inhibiteurs de protéases) a été décrite et la caractérisation des hémocytes circulants réalisée. Ces travaux ont permis de développer des techniques de culture *in vitro* permettant d'étudier de manière spécifique le système immunitaire de la seiche.

Mots clés : Seiche, Zinc, Ecotoxicologie, Physiologie, Système immunitaire, Céphalopodes.

Abstract : Cuttlefish eggs and juveniles grow inshore where anthropic contamination is high. Following studies on the impact of trace metals on *Sepia officinalis* egg stage, this work intends to determine the sensitivity of cuttlefish juvenile stage against the trace metal zinc, using diverse biomarkers. Our results showed the low ability of juvenile cuttlefish to regulate the assimilation of dissolved zinc, resulting in an important zinc-sensitivity. Non-lethal exposures (i.e. $< 200 \mu\text{g L}^{-1}$) for periods from one week to two months post-hatchling impacted enzymes involved in digestion and immunity, as well as growth and behavior. For concentrations of $50 \mu\text{g L}^{-1}$ and above, trace metal homeostasis modifications were further demonstrated, resulting in fascia damages after a six-week exposure. Moreover, the rearing of prey adapted to juvenile cuttlefish was set up in order to assess trophic contamination.

The tissue repartition of enzymes involved in cuttlefish's immune system (phenoloxidases, lysozymes and protease inhibitors) was described, as well as the characterization of hemocyte, in order to provide tools to study early effects of contamination on cuttlefish. This work allowed the development of *in vitro* culture to study cuttlefish's immune system in a specific manner.

Keywords : Cuttlefish, Zinc, Pollution – Environmental aspects, Physiology, Immune system, Cephalopoda.

Discipline : Physiologie, Biologie des Organismes, Populations, Interactions.

UMR BOREA, MNHN, UPMC, UCBN, CNRS-7028, IRD-207, IBFA "Biologie des Organismes et Écosystèmes Aquatiques". Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la paix, 14032 Caen Cedex.