Incorporation des métaux dans les œufs de la seiche commune Sepia officinalis et effets potentiels sur les fonctions digestives et immunitaires

Thomas Lacoue-Labarthe

▶ **To cite this version:**

Thomas Lacoue-Labarthe. Incorporation des métaux dans les œufs de la seiche commune Sepia officinalis et effets potentiels sur les fonctions digestives et immunitaires. Physiologie [q-bio.TO]. Université de La Rochelle, 2007. Français. NNT : . tel-00339245

HAL Id: tel-00339245
https://theses.hal.science/tel-00339245

Submitted on 17 Nov 2008

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 La Rochelle
École Doctorale de La Rochelle
Centre de Recherche sur les Ecosystèmes Littoraux Anthropisés

Incorporation des métaux dans les œufs de la seiche commune *Sepia officinalis* et effets potentiels sur les fonctions digestives et immunitaires

THESE

soutenue le 18 décembre 2007
pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de La Rochelle
Spécialité : Océanologie Biologique & Environnement Marin

par

Thomas LACOUE-LABARTHE

Composition du Jury :

M. Pierre MIRAMAND, Professeur, Université La Rochelle	Président
Mme. Claude AMIARD-TRIQUET, Directrice de Recherche, CNRS	Rapporteur
M. Roger VILLANUEVA, Directeur de Recherche, CSIC	Rapporteur
M. Michel WARNAU, Directeur de Recherche, IAEA	Examinateur
M. Noussithé KOUETA, Maître de Conférence, HDR, Université de Caen	Examinateur
M. Paco BUSTAMANTE, Professeur, Université La Rochelle	Examinateur

Université La Rochelle
École Doctorale de La Rochelle
Centre de Recherche sur les Ecosystèmes Littoraux Anthropisés

Incorporation des métaux dans les œufs de la seiche commune *Sepia officinalis* et effets potentiels sur les fonctions digestives et immunitaires

THESE

soutenue le 18 décembre 2007
pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de La Rochelle
Spécialité : Océanologie Biologique & Environnement Marin

par

Thomas LACOUE-LABARTHE

Composition du Jury :

M. Pierre MIRAMAND, Professeur, Université La Rochelle	Président
Mme. Claude AMIARD-TRIQUET, Directrice de Recherche, CNRS	Rapporteur
M. Roger VILLANUEVA, Directeur de Recherche, CSIC	Rapporteur
M. Michel WARNAU, Directeur de Recherche, IAEA	Examinateur
M. Noussithé KOUETA, Maître de Conférence, HDR, Université de Caen	Examinateur
M. Paco BUSTAMANTE, Professeur, Université La Rochelle	Examinateur

Remerciements

Je tiens avant tout à adresser mes plus sincères remerciements à Paco Bustamante, directeur de cette thèse. Il me semble difficile d'ordonner et de citer toutes les choses pour lesquelles je pourrais le remercier. Dans ce paragraphe, je vais donc me permettre de lui dire merci pour : la thèse, les manips, son poulpe, les rencontres, son soutien, ses corrections, ses remarques judicieuses (« c koi ce bordel »), son porc au caramel, sa disponibilité, sa confiance, son encadrement que j'ai particulièrement apprécié, et j'en passe. Au final, je pense avoir appris beaucoup grâce à ses conseils. Si l'avenir me le permettait, ce serait avec grand plaisir que je continuerais à travailler avec lui. En attendant, qu'il soit sûr de ma reconnaissance et de mon amitié.

Je souhaite exprimer mon entière reconnaissance à Noussithé Koueta, Maître de Conférences à l'Université de Caen, qui a co-encadré cette thèse. Grâce à lui, j'ai pu faire mes premiers pas dans le monde des Céphalopodes et passer une année passionnante en Normandie. Merci pour ses conseils, son soutien et sa confiance dans la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier chaleureusement Michel Warnau, du MEL-IAEA de Monaco. Merci pour son accueil, son soutien à des heures impossibles, les discussions passionnantes concernant ce travail, son grand sens de la répartie, sa disponibilité remarquable, et surtout, pour toutes les autres choses indépendantes à la thèse. Merci aussi pour le « Lakwée » qui a largement dépassé les frontières de Monaco, et qui maintenant se décline à l'infini (e.g. Mme Lakwette, les Lakwos….) ;-)

Je suis très reconnaissant envers Monsieur Roger Villanueva, directeur de recherche au CSIC, et très honoré qu'il ait accepté d'être l'un des rapporteurs de cette thèse. J'attends ses remarques avec impatience.

Je remercie vivement Madame Claude Amiard-Triquet, directrice de recherche CNRS à l'Université de Nantes, pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail et pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de le juger en étant rapporteur de cette thèse.

Je remercie également Monsieur Pierre Miramand d'avoir accepté de présider le jury de thèse. Je suis surtout très curieux et impatient de connaître son point de vue de passionné sur ce travail, lui sans qui l'écotoxicologie des Céphalopodes n'aurait pu être initiée à La Rochelle.

Cette thèse m'a donné chance de me promener en France pendant ces trois années. Cette aventure a rapidement donc pris une dimension humaine très importante. Sans tout ce petit monde, ce travail n'aurait pas été aussi « drôle » ou tout simplement impossible.

Au Laboratoire de Biologie et Biochimie Marine de l'Université de Caen

Je suis reconnaissant à Monsieur Michel Mathieu, Directeur du laboratoire, pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, UMR 100 Ifremer, Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins de l'université de Caen

Un immense merci à Estelle Le Bihan, pour son accueil au labo, pour m'avoir tout montré et tout appris, des structures d'élevage aux dosages biochimiques. Merci aussi pour nos discussions interminables à la pause-café. Je lui en voudrais par contre pour ne pas m'avoir laissé gagner un seul jeton…

Je remercie tous les techniciens de la station marine de Luc-sur-Mer (CREC) pour leur aide dans la réalisation des manips et leur bonne humeur : Jean-Paul, Philippe, Fredo, Alain, David. Je remercie également Sandra pour son aide précieuse dans la salle de biochimie du LBBM.

Je remercie également tous les gens du LBBM, et particulièrement Céline Zatylny et Joël Henry pour leur discussion passionnante sur les œufs de seiche.

Je tiens à remercier les pêcheurs de la côte Ouest du Cotentin, qui m'ont permis la récolte des innombrables œufs nécessaires à mes manips. Leur rencontre et leurs connaissances ont été particulièrement enrichissantes. Je les remercie aussi de m'avoir montré de près quel était leur métier : merci à Messieurs Patrice Lapie et son fils, pour m'avoir embarqué à bord de leur bateau. Merci aussi à Franck Le Monnier de m'avoir emmené à Guernesey récolter des œufs. Merci enfin à Stéphane Longuet, et Monsieur Guénon.

Je remercie également tous les étudiants qui ont contribué à la réussite de ce travail :

Que les étudiants, Aline Coulon, Agnes Meslon, Aurélie Montcuit, Hélène Viala, Georges Safi reçoivent tous mes remerciements pour l'immense aide qu'ils m'ont apporté à Caen, au laboratoire comme sur le terrain.

D'abord à tous les doctorants qui m'ont accueilli dans leur bureau : Anne-Karo, Benoît (pour sa boulette en papier fulgurante), Christophe (pour son génie), Deborah, Estelle, Emilie, Juliette, Julio et les autres.

Merci à tous ceux qui ont habité le CREC pendant les 9 mois que j'ai passés à Caen. Les batailles d'eau, les déménagements, les chambres plages, les soirées interminables dans le couloir, les « raymonnades », la légionellose et les parties de rugby resteront des souvenirs inoubliables. Mille mercis à l'incomparable Pascal, Nico, Choubaka, Gwen, David, les Fufus n' Co, Nicolas.

Un grand merci à Brice, Christelle et Laulau pour tant de choses, pour leur amitié, bref pour tout ce qui peut se résumer leur « Cuttlefish Spirit », l'original.

Au Laboratoire d'Environnement Marin de l'IAEA à Monaco

Je suis très reconnaissant à Monsieur Ross Jeffree, « section head » du laboratoire de radioécologie de m'avoir accueilli au sein de son équipe.

Pendant ces 4 mois, j'ai eu la chance de travailler intensément, dans une ambiance des plus efficaces mais aussi des plus sympathiques. Aussi, je suis particulièrement reconnaissant envers Jean-Louis Teyssié, pour son professionnalisme, ses connaissances, ses idées, son dynamisme, ses backgrounds, ses piscines, ses longues tirades poétiques, ses photos, et surtout son amitié. J'espère vraiment pouvoir réapprendre à ses côtés. Francky (Oberhänsli), alias J-L junior, avec qui j'ai partagé le labo chaud pendant toutes ces manips. Son aide précieuse, sa rigueur, ses compétences et sa disponibilité ont joué un rôle déterminant dans les travaux menés l'IAEA. Néanmoins, c'est aussi pour sa gentillesse et son amitié que j'espère vivement pouvoir retravailler avec lui. Merci à Florent et Anna, pour aussi leur accueil, au labo et chez eux pendant les 15 derniers jours de mon séjour, pour les plongées, et pour m'avoir fait découvrir Nice. Plein de bonnes choses à vous deux.

Je salue sincèrement tous les autres membres du laboratoire pour leur gentillesse (Beat, Florence, Juan-Carlos, Leslie, …) ainsi que Miguel pour son mojito et Claude pour sa tourtière du Lac Saint-Jean. J'adresse particulièrement mes remerciements à Alessia pour m'avoir logé à la fin de mon séjour et pour tous les autres « trouks » qu'elle m'a apportés au cours de mon séjour.

Je remercie bien évidemment Laët', J-C et Vanessa pour les bonnes soirées et les plongées à Port-Cros. Bonne chance à vous et bons voyages !

Comment, enfin, ne pas remercier le plus Rochelais des Monégasques… ? euh, non, des Belges. Et oui, c'est bien de Marc dont je parle. Les deux thésards du Pak se sont croisés sur le tard, tu disais. Ouep, mais ils se verront pendant encore longtemps. Merci pour tout et don't worry, je n'hésiterai jamais à t'appeler… ;-)) Fais en de même !

Voilà, la présence de ce petit monde et l'encadrement mené tambour battant par le duo Pak & Mich, ont fait de ces 4 mois de travail un véritable bonheur que j'ai eu la chance de vivre.

À La Rochelle

Je remercie sincèrement Gérard Blanchard, directeur du Centre de Recherches sur les Ecosystèmes Littoraux Anthropisés, UMR 6217 Université La Rochelle-CNRS-IFREMER pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je le remercie également pour sa disponibilité et ses discussions déterminantes quant à l'aboutissement de cette thèse.

J'adresse mes remerciements à Brigitte Hudelaine et Jennifer de la Corte Gomez de l'Ecole Doctorale pour leur soutien logistique et, pour ce qui est de mon cas… je les remercie de leur patience.

Pendant ces trois années, j'ai bénéficié d'un poste de Monitorat au département de Biologie de l'Université. Cette expérience n'aurait pas été aussi riche sans quelques personnes. Je

remercie donc Armelle, Christine, Denis, Hélène, Karine, Pascale, Véronique et Paco of course. Un grand merci aux Moniteurs 2004 : Hafida, Val, Mél, et Mazen.

Pour les innombrables services rendus alors que je n'étais souvent jamais sur place, et que les procédures administratives me resteront toujours étrangères, je remercie sincèrement Nicolas Alligner pour son efficacité à toute épreuve. J'en profite pour saluer chaleureusement sa voisine Michèle à qui je souhaite plein de bonnes choses pour la suite. Je remercie aussi Evelyne Travers qui a bien supporté mes démarches administratives dans la précipitation.

Je remercie sincèrement Hélène Thomas-Guyon, pour son dynamisme, sa motivation et surtout son soutien depuis mon arrivée à La Rochelle que je n'oublierais pas. Un grand merci aussi à Anne Bado-Nilles pour son aide précieuse dans mes manips PO et aussi pour sa gentillesse.

Je remercie vivement Pierre Morinière et Jean-Luc Maggiorani de l'Aquarium de La Rochelle pour leur soutien technique et leur aide dans la stabulation des géniteurs.

Je tiens à adresser mes remerciements à la fine équipe de l'Institut: merci à Thierry pour m'avoir accompagné pendant presque 2 ans effectifs dans le bureau, pour le tricotage au bad et l'épine. Un grand merci aussi à Florence (pour sa critique musicale ;-)), Nathalie (pour ses petites vannes et sa grande motivation pour aller jouer au Bad), Vanessa (mais quel talent), Cécile, Vincent, Gilles, Denis, sans oublier le CRMM : Olivier, Jérôme, Willy.

Je salue tous les doctorants du laboratoire et leur souhaite une bonne continuation dans la réalisation de leur thèse : Aurore, Julien, Mathieu, Gwen, Pascaline, Grégoire, Fred. On attend toujours leurs pots d'arrivée. Plein de mercis et de courage aussi à Benoît pour la suite… ;-)

Je remercie tous les stagiaires qui ont contribué à cette thèse.

Je remercie tout d'abord, David Borg, mon premier stagiaire, pour avoir tenu le coup du rythme intensif des élevages de seiche. Sans lui, je me serais probablement écroulé. Merci surtout pour son travail efficace et sa sympathie : comme quoi c'était pas trop « bad ».

Je tiens à remercier chaleureusement Edouard Hörlin, pour tout le travail accompli sur la phénoloxydase et sa grande gentillesse. Ce fût un grand plaisir de terminer les dernières manips de thèse avec toi. Je te souhaite tout ce que tu souhaites pour l'avenir à toi et Lulu. See you at the next match and come on the Scott's !

Je remercie aussi tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail : merci à la super DD, à Fer le tombeur de dorades, à Eric, Christine & Tony, autour des plongées et des rouleaux de printemps, Pierrick pour son blanc et sa 405, LN pour « les fêtes du port », Thibault pour sa formation niveau 1 un peu spéciale, Jess pour son rhum terrible, Brice et Fifine pour les sorties normandes. Merci aussi aux Brocolis, à mes amis de longues dates, Damien, Nico, Emilie, Ludo, Ju & Ju, et les autres … et Marie qui après 25 ans d'amitié soutient sa thèse quelques heures après moi (allez, allez, allez !!). Je remercie aussi tous les copains du DEA EDEL (Marie, Montep & Fils, Sof, Hélène, Yann, Gaël, Marie, Emilie,…)… bon courage aux suivants.

Une grande partie de ce travail n'aurait pas pu se réaliser sans son aide. Beubeu, merci pour tout : la formation sur R, la bonne humeur, le jeu en double (au bad) malgré quelques rares

défaites cuisantes (mais je l'ai eu), son mac, les parties de palets en pleine rédaction, ses cartes, et surtout son amitié. J'ai beaucoup appris grâce à lui, aussi je l'en remercie encore. Cependant, une chose manque à mon bonheur… il est pour quand ce pot d'arrivée ??? ;-)

Comment pourrais-je ne pas remercier Elise pour son riz et ses frappes surprises sur la tête. Par contre, je lui en voudrais longtemps pour avoir fourni, juste avant de partir, un certain PY dont je tairais le nom, en seringue et pétards…

Et c'est justement à ce dernier que je voudrais adresser ces remerciements. Après une longue hésitation (et parce qu'il m'a bien payé en Pim's ces derniers jours), je dois reconnaître que grâce à lui, j'ai appris à ne pas avoir de scrupules à l'em…, à me dire que j'étais pas le seul à flipper parfois, à maîtriser l'apnée du lamentin, et à partager plein d'autres moments désagréables en sa compagnie. Bien évidemment, je ne te remercie pas pour l'affichage illégal dans le bureau. Sincèrement, j'ai été très heureux de partager cette thèse en même temps que lui, ou presque… pour les quelques jours qu'il reste, je lui souhaite plein de courage… Je le remercie surtout pour m'avoir montré la voie de la supputation…

Une immense pensée et un grand merci à… Gérard & Géraldine, Lili, Arthur et Goliath, ces seiches qui ont tant donné pour la science.

Enfin, mille mercis à Antoine, Jo, Ju et Ben pour tout, pendant ces trois années et mêmes celles d'avant, et surtout les prochaines. Bien sûr, un merci amoureux à Elodie qui ne résumera pas tout ce qu'elle m'apporte au jour le jour… :-p

Merci à tous

A Jean

Avant-Propos

Les expérimentations d'exposition des œufs aux métaux stables à la station marine CREC de Luc-sur-Mer ont été menées, pour partie, en collaboration avec David Borg, dans le cadre d'un stage de Maîtrise non obligatoire de l'Université de La Rochelle.

Le chapitre II, Partie 2, traitant de l'impact de l'Ag, du Cd et du Cu sur l'activité phénoloxidase des embryons a fait l'objet du stage d'Edouard Hörlin, étudiant en Master Recherche à l'Université La Rochelle, de janvier à juillet 2006. Edouard a réalisé l'ensemble des dosages enzymatiques et a largement contribué à la réflexion menée sur ce sujet.

Les autoradiogrammes des œufs exposés au ^{203}Hg et ^{210}Pb ont été réalisés par Claude Rouleau, de l'Institut Maurice-Lamontagne au Mont-Joli, Québec, Canada.

Pendant cette thèse, j'ai reçu une allocation ministérielle (allocation MENRT) de septembre 2004 à septembre 2007. En parallèle, j'ai eu un contrat de Moniteur (64h eq. TD par an) au département de Biologie de l'Université La Rochelle.
L'ensemble de ces travaux de thèse a été soutenu financièrement par le CRELA de l'Université de La Rochelle, le LBBM de l'Université de Caen Basse-Normandie, et le MEL de l'AIEA de Monaco.

Les résultats de cette thèse sont en cours de valorisation par la rédaction d'articles scientifiques soumis à des publications internationales ou en préparation :

Lacoue-Labarthe, T., Oberhänsli, F.R., Teyssié, J.-L., Warnau, M., Koueta, N. and Bustamante, P. 2008. Differential bioaccumulation behaviour of Ag and Cd during the early development of the cuttlefish *Sepia officinalis*. Aquat. Toxicol. 86, 437-446

Lacoue-Labarthe, T., Warnau, M., Oberhänsli, F., Teyssié, J.-L., Jeffree, R.A. and Bustamante, P., *in press*. First experiments on the maternal transfer of metals in the cuttlefish *Sepia officinalis*. Mar. Pollut. Bull.

Lacoue-Labarthe, T., Warnau, M., Oberhänsli, F., Teyssié, J.-L. and Bustamante, P., *en préparation pour Environ. Pollut.* Contrasting biokinetics of accumulation and

distribution of Am, Co, Cs, Mn and Zn by the eggs of the common cuttlefish (*Sepia officinalis*) during the whole development time.

Lacoue-Labarthe, T., Warnau, M., Oberhänsli, F., Rouleau, C., Teyssié, J.-L., Metian, M. and Bustamante, P., *en preparation pour Aquat. Toxicol.* Biokinetics of accumulation of Hg and Pb in the encapsulated egg of the common cuttlefish *Sepia officinalis* using radiotracer experiments.

Lacoue-Labarthe, T., Bustamante, P., Le Bihan, E., Borg, D. and Koueta, N., *en préparation Comp. Biochem. Physiol. B* . Chronic effects of non essentials metals (Ag and Cd) and an essential (Cu) on the embryonic development of cuttlefish, *Sepia officinalis* : responses of acid phosphatases and cathepsins activities.

Publications sans comité de lecture :

Lacoue-Labarthe, T., Bado-Nilles, A., Hörlin, E., Bustamante, P., Thomas-Guyon, H., 2007. Phenoloxidase activation detected during the embryonic development of the European cuttlefish *Sepia officinalis* (Linnaeus). FEBS Journal, 274, F1-131.

Différents résultats issus de ce travail ont été présentés lors de plusieurs congrès et colloques internationaux sous forme de communications orales et/ou affichées. Pour les présentations orales, le nom de l'orateur a été souligné.

Communications orales :

Lacoue-Labarthe, T., Oberhänsli, F., Teyssié, J.L., Metian, M., Warnau, M., Bustamante, P., 2007. Differential bioaccumulation of nine radiotracers (^{110m}Ag, ^{241}Am, ^{57}Co, ^{109}Cd, ^{134}Cs, ^{203}Hg, ^{54}Mn, ^{210}Pb and ^{65}Zn) during the early development of the cuttlefish *Sepia officinalis*. Society of Experimental Biology Metals Symposium, 3-5 Septembre 2007, London (UK).

Lacoue-Labarthe, T., Oberhänsli, F., Teyssié, J.L., Metian, M., Warnau, M., Bustamante, P., 2007 Assessment of the uptake and loss kinetics, and compartment distribution of two toxic metals (Ag, Cd) in the eggs of the cuttlefish *Sepia officinalis* during the embryonic

development. 5th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology, 3-6 Juin 2007, Hong-Kong (China).

Lacoue-Labarthe, T., Bustamante, P., Le Bihan, E., Koueta, N. 2006. Effect of silver on maturation and development of the eggs of cuttlefish *Sepia officinalis*. Cephalopod International Advisory Council, 6-10 Février 2006, Hobart (Tasmanie, Autralie).

Communications affichées :

Lacoue-labarthe, T., Oberhänsli, F., Teyssié, J.L., Jeffree, R., Warnau M., Bustamante, P., 2007 First experiments on the maternal transfer of heavy metals in the cuttlefish *Sepia officinalis*. 15th International Conference on Environmental Bioindicators, 8-9 Juin 2007, Hong-Kong (China).

Hörlin, E., Lacoue-Labarthe, T., Bado-Nilles, A., Bustamante, P., Thomas-Guyon, H., 2007 Phenoloxidase activation detected during the embryonic development of the European Cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus). The 32nd Federation of European Biochemical Societies Congress, 7-12 Juillet 2007, Vienna (Austria).

Lacoue-Labarthe, T., Hörlin, E., Bustamante, P., Bado-Nilles, A., Thomas-Guyon, H., 2007 Phenoloxidase activation detected during the embryonic development of the European Cuttlefish, *Sepia officinalis* and response to Ag and Cu exposure. Society of Experimental Biology Metals Symposium, 3-5 Septembre 2007, London (UK).

Sommaire

INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

Contexte scientifique 3

Les métaux dans le milieu marin 4

Présentation du modèle biologique: la seiche commune *Sepia officinalis* 7

1. Habitat et Biologie de la seiche commune 8
2. Cycle de vie de la seiche 8
3. Reproduction et développement embryonnaire 11

La bioaccumulation des métaux chez la seiche 18

CHAPITRE I

CINETIQUES D'ACCUMULATION DES METAUX SUR LES ŒUFS DE SEICHE SEPIA OFFICINALIS AU COURS DU DEVELOPPEMENT 27

Partie 1. Cinétiques d'accumulation du Hg et du Pb dans les oeufs de la seiche commune *Sepia officinalis* grâce à l'utilisation de radiotraceurs 29

Partie 2. Biocinétiques d'accumulation et distribution de l'Am, du Co, du Cs, du Mn et du Zn dans les oeufs de la seiche commune, *Sepia officinalis*, pendant toute la durée du développement. 51

Partie 3. Comportements contrastés de bioaccumulation de Ag et Cd pendant le développement embryonnaire de la seiche commune *Sepia officinalis* 73

CHAPITRE II

EFFETS CHRONIQUES DE METAUX SUR LES FONCTIONS DIGESTIVES ET IMMUNITAIRES AU COURS DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE 97

Partie 1. Effets chroniques de métaux non-essentiels (Ag et Cd) et essentiel (Cu) sur le développement des œufs de seiche, *Sepia officinalis* : réponse des activités des phosphatases acides et des cathepsines lysosomales 99

Partie 2. Activation de la phénoloxydase dans l'embryon de la seiche commune *Sepia officinalis* et réponses à l'exposition à l'Ag et au Cu 125

CHAPITRE III

PREMIERS RESULTATS EXPERIMENTAUX SUR LE TRANSFERT MATERNEL DES METAUX CHEZ LA SEICHE *SEPIA OFFICINALIS* 143

Premières expérimentations sur le transfert maternel des métaux chez la seiche commune, *Sepia officinalis* 145

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 159

Discussion générale et perspectives 161

1. Incorporation des métaux dans l'œuf de seiche commune, *Sepia officinalis* 162
2. Effets toxiques de l'Ag, du Cd et du Cu sur le développement de l'œuf de seiche et les activités enzymatiques digestives et immunitaires de l'embryon 167
3. Le transfert maternel comme voie d'exposition des embryons aux métaux 171

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 175

« I'll play with it first,
and tell you what it is later »

Miles Davis

Introduction Générale

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Contexte scientifique

Très prisés par les pays méditerranéens et asiatiques, les céphalopodes ont vu leur exploitation augmenter très fortement au cours des dernières décennies en Atlantique et en Mer de la Manche, ou encore en Mer d'Ecosse et en Mer du Nord, essentiellement pour répondre à cette demande croissante. En plus de cette forte demande, le besoin de diversifier les prises et la forte valeur ajoutée qui y est associée ont entraîné un essor de l'exploitation des différentes espèces de céphalopodes. Dès lors, l'intérêt des scientifiques pour ces espèces s'est accru, intéressant des disciplines variées puisque certains stocks représentent des biomasses considérables tandis que la diversité des espèces est toujours en cours d'inventaire. En 1983 est fondé le CIAC (Cephalopod International Advisory Council) en charge de stimuler, associer, et promouvoir les études ayant trait aux céphalopodes ainsi que de se positionner en référent dans la gestion des stocks exploités. Actuellement, de nombreuses études portent sur l'état des stocks de céphalopode en vue de mettre en place une gestion rationnelle et d'évaluer les risques de surexploitation (Pierce et Guerra, 1994, Royer et al., 2002, 2006). Néanmoins, cet objectif nécessite une bonne connaissance et une bonne compréhension de la dynamique de ces populations et donc des paramètres fondamentaux tels que la mortalité naturelle, la reproduction, la croissance, la durée de vie et le recrutement (Challier, 2005).

Parmi les espèces de céphalopodes exploités en France, la seiche commune *Sepia officinalis* est la seule espèce faisant véritablement l'objet d'une pêcherie dirigée, celle-ci ayant lieu à toutes les étapes du cycle migratoire, sauf en été, période d'éclosion où les individus de taille commerciale ont disparu (Boucaud-Camou et al., 1991, Le Goff et Daguzan, 1991). Ainsi, en termes de production, la seiche est le céphalopode le plus exploité en Europe et en France, et plus particulièrement en Manche où se situe la majeure partie de la ressource (Denis et Robin,

2001). Le tonnage moyen débarqué dans les ports de pêche atteint 10 500 tonnes par an, selon les données récoltées entre 1993 et 2002 (Anonymous, 2003), ce qui place la France au premier rang européen des pays exploitant les seiches.

Le stock de seiche présente de remarquables fluctuations d'abondance interannuelles et saisonnières (Royer et al., 2006), souvent considérées comme la conséquence d'une dynamique de population très variable. Du fait de sa durée de vie courte et de sa croissance rapide, cette espèce est dépendante de l'abondance de la nourriture et sensible aux variables environnementales (Pierce et al., 1998). Les variations de stock sont ainsi souvent attribuées aux effets de la température et de la disponibilité de l'alimentation sur la croissance et la survie des juvéniles.
Parallèlement à cela, la seiche effectue des migrations saisonnières liées à la reproduction entre le large et la côte (Boucaud-Camou et Boismery, 1991), soit, d'un point de vue écotoxicologique, entre un milieu présumé peu contaminé et une zone plus fortement soumise aux activités anthropiques. La reproduction, la ponte et la phase juvénile se déroulant dans la zone littorale, la question de l'impact de la contamination métallique sur le développement embryonnaire et la croissance des juvéniles se pose. En effet, les métaux reconnus pour leurs propriétés embryotoxiques chez les invertébrés (Calabrese et al., 1973) représentent un risque potentiel pour les embryons de la seiche avec des conséquences directes sur les paramètres de dynamique de la population *via* une possible réduction du recrutement.

Les métaux dans le milieu marin

Un métal est un élément chimique, issu, le plus souvent, d'un minerai doté d'un éclat particulier, bon conducteur de chaleur et d'électricité, ayant des caractéristiques de dureté et de malléabilité, se combinant aisément avec d'autres éléments pour former des alliages utilisés par l'Homme depuis l'Antiquité.

Dans le milieu aquatique, un métal sera défini comme un élément chimique qui peut former des liaisons métalliques et perdre des électrons pour former des cations.

L'origine des métaux présents dans le milieu marin est double. Naturellement présents dans la biosphère, ils proviennent, d'une part, de l'érosion mécanique et chimique des roches et du lessivage des sols (Bryan, 1984, Nisbet et Fowler, 1995). À ces apports s'ajoute, d'autre part, la contribution d'origine anthropique issue des activités domestiques, agricoles, industrielles et minières. Ces apports sont généralement importants au regard de ceux provenant des sources naturelles (Goldberg, 1995).

Les métaux sont généralement séparés en deux catégories selon leur caractère essentiel ou non pour les êtres vivants. En effet, ils peuvent s'avérer indispensables au déroulement des processus biologiques (e.g. Co, Cu, Fe, Mn, Zn). Dans ce cas, leurs concentrations dans les organismes doivent répondre aux besoins métaboliques de ces derniers. Dans le cas contraire, une carence ou un excès de ces éléments essentiels peut induire des effets délétères (Rainbow, 2002). En revanche, les métaux non essentiels ne présentent aucune fonction biologique reconnue (e.g. Ag, Cd, Hg, Pb). Une fois présents dans les tissus, ils doivent être détoxiqués et/ou excrétés sous peine d'engendrer des effets toxiques pour l'organisme lorsque leurs concentrations s'élèvent. Il est à noter que cette classification des éléments métalliques est dépendante de l'état des connaissances concernant le métabolisme des métaux chez les êtres vivants. Par exemple, ce n'est que très récemment qu'une fonction essentielle du Cd a été reconnue chez les diatomées (Todd et Morel, 2000).

Un métal a la capacité de se lier aux atomes et groupements avec lesquels il posséde une affinité. De ce fait, les métaux ayant une affinité pour le soufre se fixent sur les protéines ayant des acides aminés soufrés (Rainbow, 2002). Ainsi, sur la base de leurs propriétés chimiques, les métaux ont été distingués selon 3 groupes : les éléments de la Classe A, ceux de la Classe B et les éléments de Transition (Nieboer et Richardson, 1980). Les premiers, e.g. Al, Ba, Mg, sont caractérisés par une forte préférence de liaison avec des groupements contenant de l'oxygène (e.g. groupements phosphates, carboxyles, carbonyles), puis ensuite pour l'azote et dans une moindre mesure pour le soufre (O > N > S). À l'inverse, les éléments de Classe B, e.g. Ag, Hg, ont une plus grande affinité pour les groupes riches en soufre (S > N > O). Les éléments de Transition (e.g. Co, Mn, Zn), comme leur nom l'indique, présentent une affinité équivalente à la fois pour l'O et le S. Ces propriétés chimiques des éléments jouent un rôle crucial sur leur devenir dans les organismes mais aussi pour leur biodisponibilité dans la colonne d'eau et pour leur incorporation potentielle dans les tissus des êtres vivants. Elles déterminent, de plus, le caractère essentiel ou non essentiel de l'élément. Il

est en général considéré que les éléments de la Classe B sont plus toxiques que les éléments de Transition, et que les éléments de la Classe A sont les moins toxiques.

Les métaux sont des éléments rémanents non dégradables, ni biologiquement, ni chimiquement. Par conséquent, les métaux, soit parce qu'ils sont naturellement présents, soit parce que certaines activités anthropiques favorisent leur dispersion, s'accumulent de façon irréversible dans le milieu marin (Clark, 2001). Plusieurs facteurs vont alors déterminer la bioaccumulation des métaux par les organismes, i.e. leurs capacités à concentrer et fixer dans leurs tissus un élément par la voie dissoute et/ou alimentaire.

Principalement, les conditions physico-chimiques du milieu (i.e. salinité, pH, taux d'oxygénation, acides organiques,…) vont déterminer la spéciation de l'élément métallique, c'est-à-dire sa distribution entre différentes espèces chimiques ou groupes d'espèces (d'après Turner 1995). Cette spéciation caractérise ainsi la biodisponibilité d'un élément pour les organismes c'est-à-dire la forme du métal favorisant sa liaison ou son passage au travers des surfaces en contact avec l'eau (e.g. téguments, muqueuses…) et entraînant, ainsi, son entrée de la phase dissoute vers le tissu (Newman & Jagoe 1994). Cette ad- ou ab-sorption de l'élément par l'organisme peut découler de processus passifs (chimiques) ou actifs (biologiques).

Lorsque la voie d'entrée du métal est la voie trophique (relation proie – prédateur), les capacités d'incorporation d'un élément dans l'organisme dépendent de la forme physico-chimique de stockage du métal dans les tissus de la proie ainsi que les capacités d'assimilation propres au prédateur. Il est généralement admis que, dans les proies, les éléments associés à la fraction soluble sont plus biodisponibles que ceux liés aux organites ou aux granules insolubles riches en métaux (Roesijadi et Robinson, 1994). Néanmoins, des études récentes montrent que la spéciation intracellulaire, définie comme telle, ne permet pas d'expliquer complètement les transferts trophiques observés chez les invertébrés (Rainbow, 2007).

Le potentiel effet des métaux sur les organismes est intrinsèquement lié aux processus de bioaccumulation, puisque les éléments doivent entrer dans les cellules avant d'exercer leur influence (Langston, 1990). Dans le milieu marin, les organismes sont donc exposés aux métaux selon différentes voies d'entrée (eau, sédiment, nourriture, transfert maternel…). Ainsi, la bioaccumulation d'un métal dans un organisme est la résultante des paramètres

d'entrée et d'élimination et/ou de rétention (Rainbow, 1990). Une fois entrés dans les tissus, les éléments traces sont "métaboliquement disponibles" au moins jusqu'à ce que des processus physiologiques agissent pour les éliminer ou les lier à une molécule particulière ayant une forte affinité pour l'élément, l'empêchant, de ce fait, de se fixer par ailleurs (Rainbow, 2002). À ce stade, le métal est détoxiqué et peut être soit retenu dans les tissus, soit éliminé. Dans le cas contraire, les métaux peuvent induire des perturbations biochimiques des fonctions physiologiques essentielles telles que la digestion, l'immunité ou la reproduction, influençant, en conséquence, la santé, croissance et la survie des individus et des populations (Langston, 1990).

Présentation du modèle biologique: la seiche commune *Sepia officinalis*

Classification

Embranchement : Mollusques

Classe : Céphalopodes

Sous classe : Coléoïdés

Famille : Sépiidés

Genre : *Sepia*

Espèce : *officinalis*

Comme tous les céphalopodes, la seiche est caractérisée par le rattachement du pied à la tête (céphalopodium). Sa coquille interne lui vaut d'être classée parmi les Coléoidés. Comme tous les Sépiidés, les seiches ont les nageoires séparées à l'extrémité. Chez *Sepia officinalis*, la zone striée du sépion ne dépasse pas la moitié de sa longueur et les massues tentaculaires portent des rangées de 5 à 6 ventouses.

Les seiches sont dotées d'un système nerveux développé contenu dans un cartilage céphalique. Elles sont capables d'apprentissage (Dickel et al., 1998, Alves et al., 2007) et sont

réputées pour leurs capacités de camouflages et d'homochromie (Hanlon et Messenger, 1996).

1. Habitat et Biologie de la seiche commune

Sepia officinalis a une aire de répartition qui s'étend sur la façade Est de l'Océan Atlantique, de la Mer Baltique aux Açores, ainsi qu'en Méditerranée (Guerra, 2006). Une étude récente fait état d'une seule population génétique pour tous les individus de la façade atlantique (Pérez-Losada et al., 2007).

La seiche est une espèce necto-benthique pouvant vivre, aussi bien dans les eaux peu profondes de la côte qu'au large, juqu'à 200 m de profondeur (Roper et al., 1984). Elle occupe généralement des fonds meubles et sablo-vaseux. Sa répartition saisonnière sur le littoral européen est fortement corrélée à la température dont les limites d'optimum s'étendent de 9 à 25 °C (Boucaud-Camou et Boismery, 1991).

2. Cycle de vie de la seiche

Comme la plupart des céphalopodes, la seiche est une espèce migratrice (Figure 1). Au printemps, les adultes migrent des eaux profondes du large vers la côte, où les températures sont plus élevées (Boucaud-Camou et al., 1991, Le Goff et Daguzan, 1991), pour se reproduire. L'accouplement, la ponte, le développement embryonnaire, l'éclosion ainsi que la mort des géniteurs (l'espèce est semelpare) ont donc lieu dans les eaux peu profondes du littoral. A l'automne, la migration des juvéniles vers des eaux plus profondes est déclenchée par le refroidissement des eaux côtières.

L'espérance de vie de *Sepia officinalis* est courte (1 à 2 ans), et varie au sein de son aire de répartition. Plus les eaux sont chaudes, plus la durée de vie est courte (Richard, 1975, Forsythe et al., 1994). L'existence de 2 cycles biologiques marqués a été observée chez la seiche dans le Golfe du Morbihan. Ainsi, les individus qui ne sont pas sexuellement matures à la période de reproduction, un an après l'éclosion, survivent jusqu'à l'année suivante pour se reproduire, à l'âge de 2 ans (Richard, 1971).

En Manche, la croissance est rapide allant de 5 à 6 mm/mois en hiver et au printemps à 14-17 mm/mois en été et en automne (Medhioub, 1986). Un juvénile de 250 mg environ à l'éclosion

atteindra la maturité sexuelle avec un poids de 600 à 1000 g au plus tard 2 ans après. Ce taux de croissance exceptionnel est dû à un métabolisme élevé lié à un régime alimentaire carnivore (Mangold, 1989).

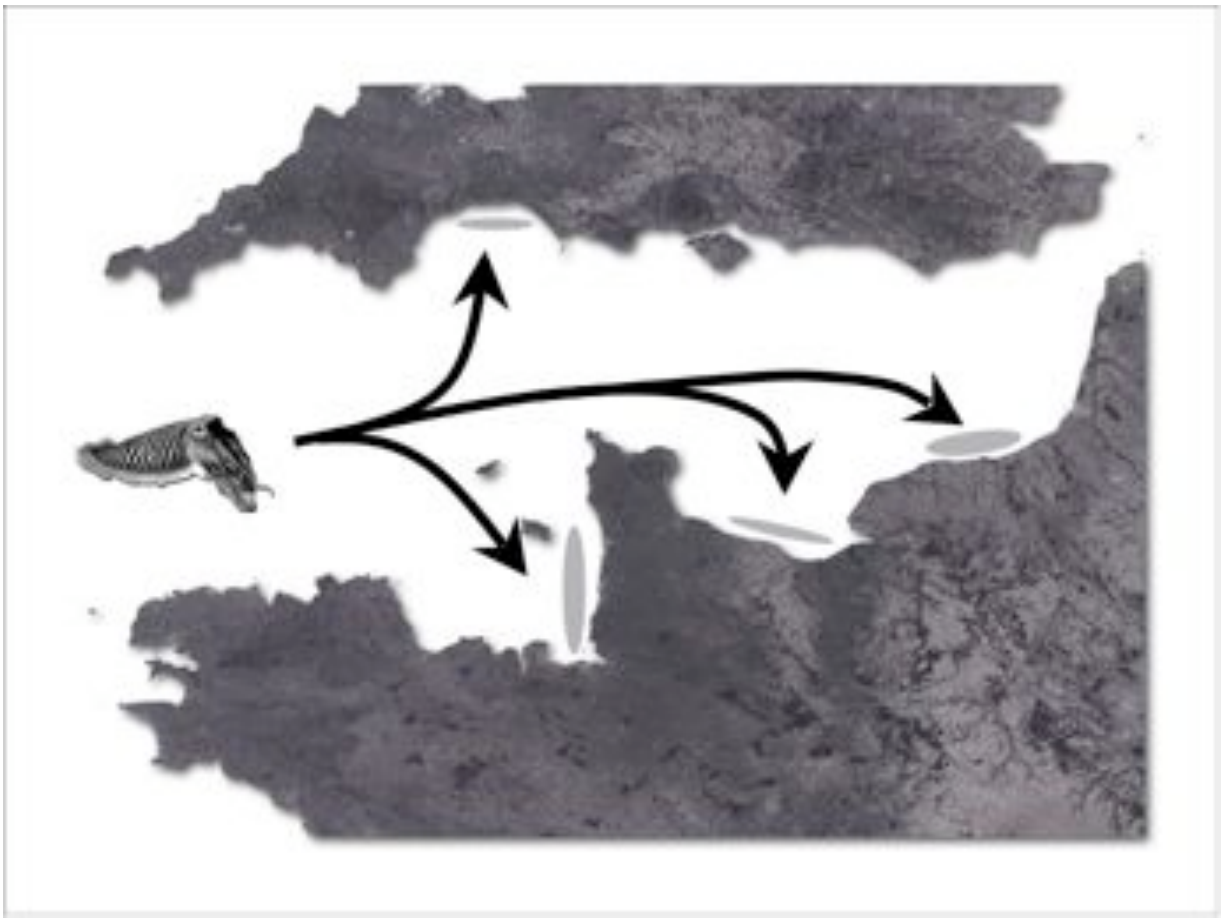

Figure 1: Cycle de migration de la seiche commune *Sepia officinalis* (d'après Boucaud-Camou et Boismery, 1991).

La période de reproduction semble dépendante de la température (Richard, 1971). En effet, la durée diminue du Sud vers le Nord. Les animaux matures, poussés vers la côte au printemps par le réchauffement des eaux, sont, par ailleurs, soumis en eaux peu profondes à un éclairement intense. Couplée au rallongement des journées, l'intensité lumineuse influence la ponte chez les femelles ayant atteint la maturité sexuelle et freine en même temps la maturation sexuelle des plus jeunes qui se reproduiront l'année suivante (Richard, 1971).

Le déclenchement de la maturation sexuelle est soumis aux mêmes facteurs influençant la période de reproduction. En effet, dès que les animaux ont atteint un certain stade de développement ou « seuil somatique », une baisse de la phase et de l'intensité de l'éclairement provoque la maturation des gonades. Dans le milieu naturel, les seiches initieraient leur maturation lors des périodes hivernales lorsqu'elles se situent au large et dans les eaux profondes.

La maturation des organes génitaux est plus précoce chez les mâles que chez les femelles. La croissance ovocytaire chez *Sepia officinalis* (Tableau 1), divisée en 6 stades (Dhainaut et Richard, 1976), conduit à la formation d'œufs télolécithes riches en vitellus. Au stade II, les cellules folliculaires commencent à s'immiscer entre les îlots d'ovocytes. Au stade III (prévitellogenèse), les cellules folliculaires s'accolent aux ovocytes, formant une enveloppe double autour de chacun d'eux, s'enfonçant dans le cytoplasme ovocytaire. Ces cellules ont pour rôle l'élaboration des produits précurseurs du vitellus et leur incorporation dans les ovocytes. Cette étape (stade IV), appelée la vitellogenèse, est la phase la plus longue de la maturation gonadique. Au stade V, les cellules folliculaires synthétisent le chorion qui constitue une membrane transparente entourant l'ovocyte, après la membrane vitelline (enveloppe primaire). À ce stade, le réseau folliculaire régresse et les ovocytes lisses sont libérés et entrent dans l'oviducte où ils sont stockés jusqu'à la ponte. Cette période est régulée par la libération de peptides par les ovocytes, inhibant les contractions de l'oviducte (Zatylny et al., 2000).

Tableau 1. Stades de l'ovogenèse chez la seiche commune *Sepia officinalis* (d'après Dhainaut et Richard, 1976).

Gamète femelle	Cellules folliculaires	Stade
Mitoses goniales		I
Prophase de méiose		II
Prévitellogenèse	Disposition à la périphérie de l'ovocyte	IIIa
	Disposition en cordon intra-ovocytaire	IIIb
Vitellogenèse	Activité sécrétrice	IV
Fin de vitellogenèse	Elaboration du chorion puis dégénérescence	V
Émissions de globules polaires		VI

3. Reproduction et développement embryonnaire

L'accouplement chez la seiche a lieu dans la position « tête-à-tête » (Figure 2A). Le mâle dépose ses spermatophores, à l'aide de son bras hectocotyle, dans les réceptacles séminaux de la femelle situés tout autour de l'ouverture buccale.
Une femelle peut pondre jusqu'à 2000 œufs (Figure 2B), fixés en grappe (« raisins de mer ») sur un substrat dur (algues, vers-tubes, casiers, filets, …) où ils seront abandonnés par les géniteurs.

L'œuf de *Sepia officinalis* est caractérisé par la présence de plusieurs enveloppes le protégeant. Comme cela a été évoqué précédemment, chaque ovocyte, au cours de la maturation, est entouré par une première membrane (le chorion) dérivant de la dégénérescence des cellules folliculaires dans l'ovaire (Figures 3 et 4). Deux autres enveloppes (Figure 3) plus épaisses sont ensuite déposées autour de l'ovocyte (Lankester, 1875, Jecklin, 1934). À la sortie du tractus oviductaire, les ovocytes « lisses » matures sont

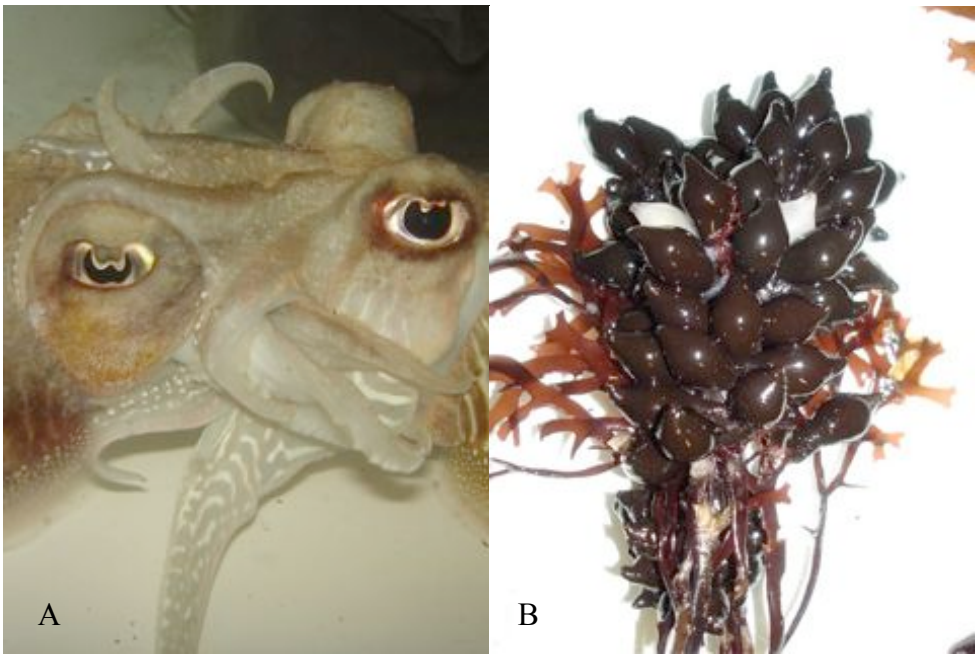

Figure 2. *Sepia officinalis*. Accouplement « tête-à-tête » de seiches matures. Le mâle est situé sur la droite, la femelle à gauche (A), ponte d'œufs fixés sur les algues *Pelvetia caniculata* (B).

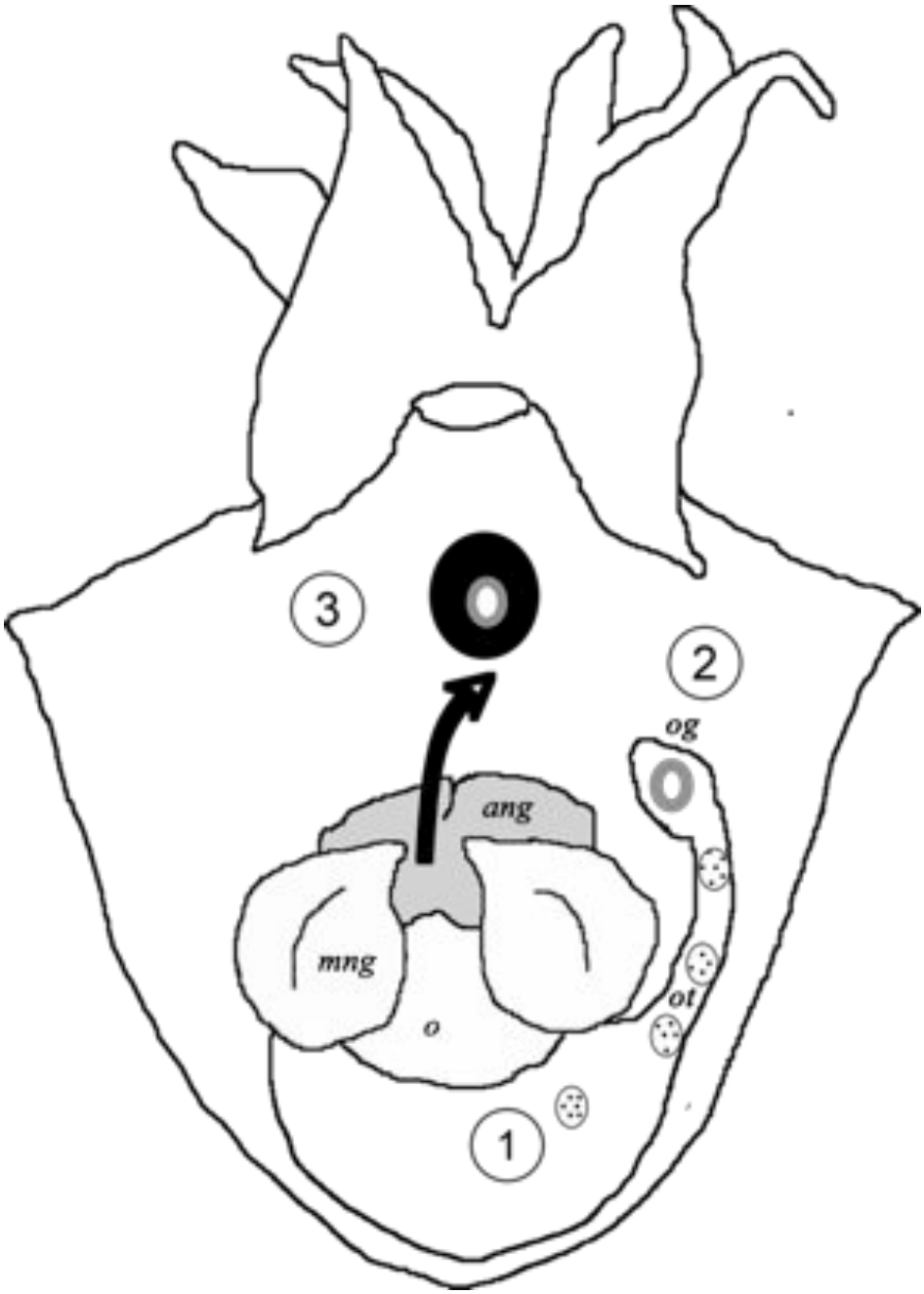

Figure 3. *Sepia officinalis.* Étapes successives de l'ovulation et de la formation de la capsule de l'œuf dans la cavité palléale de la femelle. 1: ovocyte "lisse" entouré par le chorion ; 2: ovocyte avec l'enveloppe sécrétée par la glande de l'oviducte; 3: ovocyte enveloppé par les secrétions des glandes nidamentaires imprégnées d'encre.

ang, accessory nidamental glands; o, ovary ; og, oviductal gland ; ot, oviductal tract ; mng, main nidamental gland (d'après Zatliny et al. 2000).

entourés d'une première couche de mucopolysaccharides sécrétés par la glande de l'oviducte. Une fois libérés dans la cavité palléale de la femelle, ils sont enveloppés par une capsule sécrétée par les glandes nidamentaires. Cette capsule gélatineuse est composée de plusieurs couches de mucopolysaccharides imprégnées d'encre (Boletzky, 1986, 1989). Enfin, dans le même temps, des bactéries symbiotiques sont transférées des glandes nidamentaires accessoires à la capsule de l'œuf où elles semblent avoir des fonctions anti-microbiennes (Bloodgood, 1977, Barbieri et al., 1997, Cronin et Seymour, 2000). Le zygote, et par conséquent l'embryon, sont donc protégés du milieu environnant jusqu'à l'éclosion (Boletzky, 2003). La ponte se termine avec la fécondation de l'œuf : celui-ci est expulsé hors de la cavité palléale *via* l'entonnoir à la sortie duquel la femelle le saisi avec la base de ses bras. Dans le même temps, celle-ci libère les spermatozoïdes qui traversent la capsule et fécondent l'œuf. Elle dépose enfin celui-ci sur son support.

Le développement de l'œuf est dépendant de la température (Tableau 2) (Mangold-Wirz, 1963, Richard, 1971). Des températures élevées induisent un développement rapide aboutissant à l'éclosion de juvéniles de faible taille. À l'inverse, les températures basses d'incubation prolongent la durée du développement mais augmentent la taille des juvéniles à l'éclosion (Bouchaud et Daguzan, 1989).

Figure 4. *Sepia officinalis.* Embryon de seiche en développement au niveau du pôle animal de l'ovocyte entouré de sa première enveloppe transparente, i.e. le chorion.

Le développement de l'embryon de *Sepia officinalis* a bien été décrit selon différents stades par Naef (1928) puis par Lemaire (1970). Dans ce travail, les numéros de stades feront références aux tables de description de ce dernier auteur. Le paragraphe suivant reprend les principales étapes du développement (Figure 5).

L'œuf de seiche est méroblastique ou à segmentation partielle ; son développement est plus proche de celui des vertébrés que des invertébrés.

- Dès la fécondation de l'œuf, les premières segmentations conduisent à la formation de la blastula : l'hémisphère végétatif est totalement inhibé. La segmentation ne concerne que le disque du cytoplasme dépourvu de réserves, contenant le noyau de fécondation : le blastoderme (stade 1à 9).
- La gastrulation s'étend du stade 10 à 17. Pendant cette période, les ébauches embryonnaires se mettent en place tandis que le syncytium vitellin recouvre le vitellus. La croissance épibolique constitue une période critique pouvant générer des malformations (Boletzky, 2003).
- L'organogenèse commence au stade 18 et se caractérise par une pédiculisation de l'embryon, c'est-à-dire, une constriction entre le vitellus et l'embryon en formation. Elle se termine au stade 25 lorsque l'entonnoir est définitivement constitué et le manteau recouvre totalement les branchies.
- Les derniers stades (25 à 30) composent une période de croissance et de maturation dans le développement. La taille de l'embryon augmente de 1,5 mm à 7 mm. Les cornées et les paupières secondaires sont mises en place. Dans le même temps, les réserves vitellines sont transférées du sac vitellin externe vers le sac vitellin interne, pour une digestion plus rapide des ressources. Les différents organes de l'embryon commencent à devenir fonctionnels. La poche du noir apparaît sur la face ventrale, les premiers lysosomes apparaissent dans la glande digestive, l'hémocyanine passe d'une forme embryonnaire à une forme juvénile (Decleir et Richard, 1970, Decleir et al., 1971).
- Au stade 30, les enzymes contenues dans l'organe de Hoyle (Figure 5 F) digèrent la capsule de l'œuf et permettent l'éclosion d'un juvénile de seiche identique morphologiquement à un adulte.

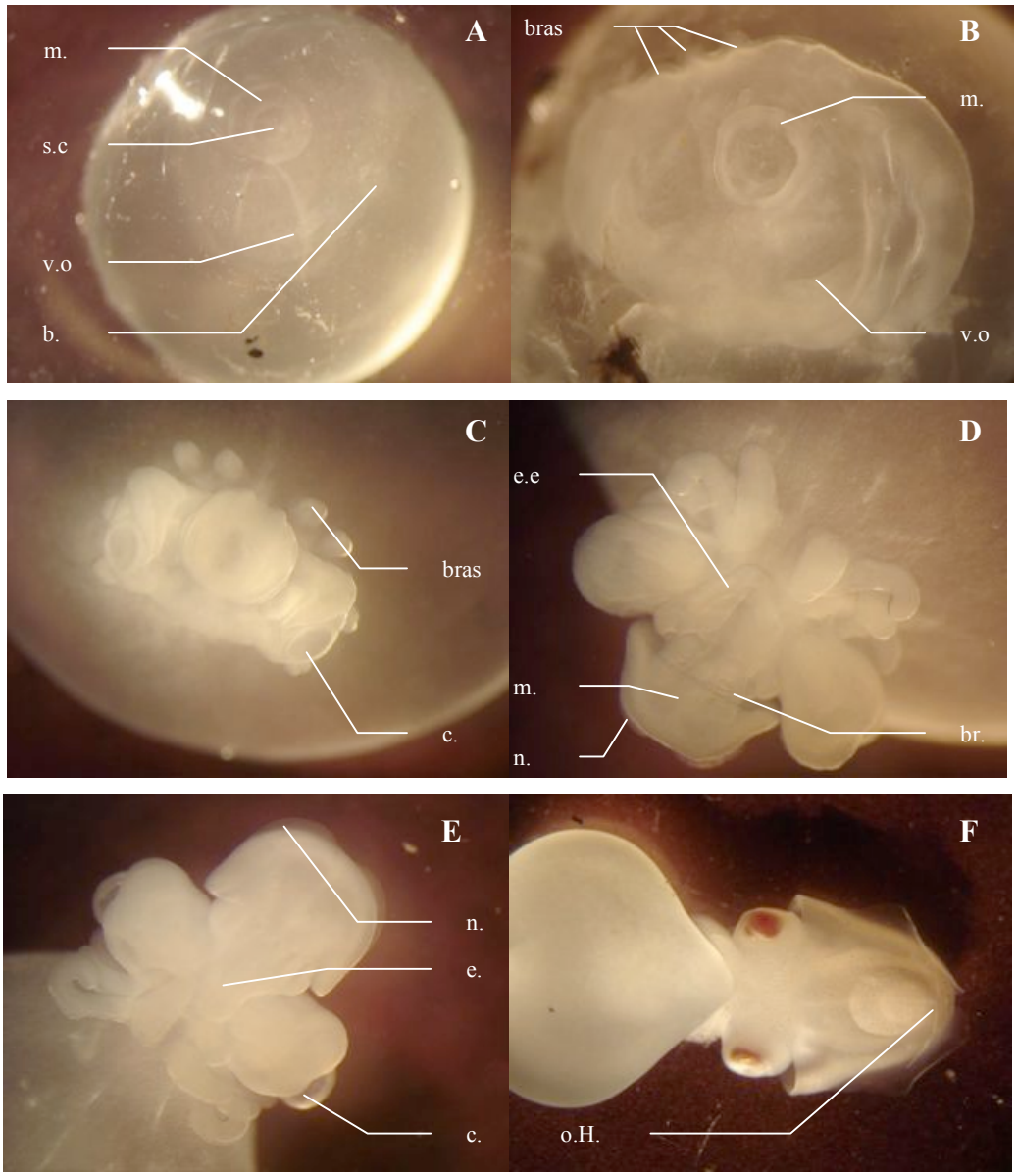

Figure 5. *Sepia officinalis*. Stade 15 (A) et 17 (B) au niveau du pôle animal de l'ovocyte, stade 21 en vue latéro-dorsale (C), stade 22 en vue ventrale (D), stade 25 en vue ventrale (E), stade 27 en vue dorsale (F). b : bouche ; br. : branchie ; bras : ébauches des bras ; c : crystallin ; e. entonnoir ; e.e. : ébauches d'entonnoir ; m : manteau ; n : nageoire ; o.H. : organe de Hoyle ; s.c. : sac coquillier ; v.o. : vésicule optique ;

Parallèlement au développement de l'embryon, la capsule de l'œuf subit plusieurs modifications structurales : dès les premiers jours du développement, les enveloppes gélatineuses se polymérisent au contact de l'eau de mer (effet du pH) (Gomi et al., 1986). Cette réaction entraîne une perte de l'eau contenue dans les mucosubstances, ce qui se traduit par une diminution de la taille et du poids de l'œuf, et par un durcissement de la capsule (Boletzky, 2003). Cet état se maintient ainsi jusqu'à la fin de l'organogenèse de l'embryon. À partir de ce stade, l'œuf commence à gonfler par augmentation du volume du liquide péri-vitellin, nécessaire à la croissance de l'embryon dans le dernier tiers du développement. Gomi et al. (1986) ont montré que ce gonflement résultait d'une entrée d'eau à travers la capsule, suivant une pression osmotique créée par la libération de protéines par l'embryon dans l'espace péri-vitellin. Il est, à ce sujet, intéressant de noter que, chez l'œuf du calmar *Todarodes pacificus*, dont les caractéristiques structurelles sont similaires, les sécrétions d'origine oviductaire sont nécessaires au gonflement de l'œuf (Ikeda et al., 1993). Ce phénomène ne se vérifie pas pour les constituants de la capsule d'origine nidamentaire (Ikeda et Shimazaki, 1995) dont la composition chimique diffère de celle des sécrétions de la glande de l'oviducte (Kimura et al., 2004). Il a donc été suggéré que des molécules organiques pouvaient être transférées de la capsule au liquide péri-vitellin, à travers le chorion, créant ainsi le gradient osmotique nécessaire à l'entrée d'eau (Ikeda et al., 1993). D'autre part, le liquide péri-vitellin approche graduellement l'osmolarité de l'eau de mer acclimatant ainsi l'embryon à son futur environnement. Ainsi, l'œuf grossit considérablement dans le dernier tiers du temps de développement, autant que le permet l'élasticité du chorion et de l'enveloppe. Au cours de ce phénomène, les couches externes de la capsule se déchirent progressivement et sont perdues par délamination. L'épaisseur de la capsule se réduit jusqu'à devenir pratiquement transparente.

A l'éclosion, les seiches juvéniles sont morphologiquement semblables à l'adulte (Mangold, 1989). Cependant, du point de vue physiologique, certaines fonctions ne sont pas encore pleinement matures. Le système nerveux n'est pas complètement développé comme le montre Dickel et al. (1998) dans son étude sur la mémoire. L'appareil reproducteur est juste une ébauche dont la différenciation cellulaire débute à l'éclosion (Lemaire et Richard, 1970) et dont la maturation dépend de la lumière et de la photopériode (Richard, 1971). La glande digestive, très petite, ne contient que des cellules digestives d'un seul type (Yim et Boucaud-Camou, 1980). À ce stade, les seiches possèdent encore un vitellus interne qu'elles finiront de digérer en 3 à 5 jours (Boletzky, 2003). La digestion de ce vitellus est intracellulaire. Parallèlement, les juvéniles commencent à s'alimenter par prédation. La maturation du

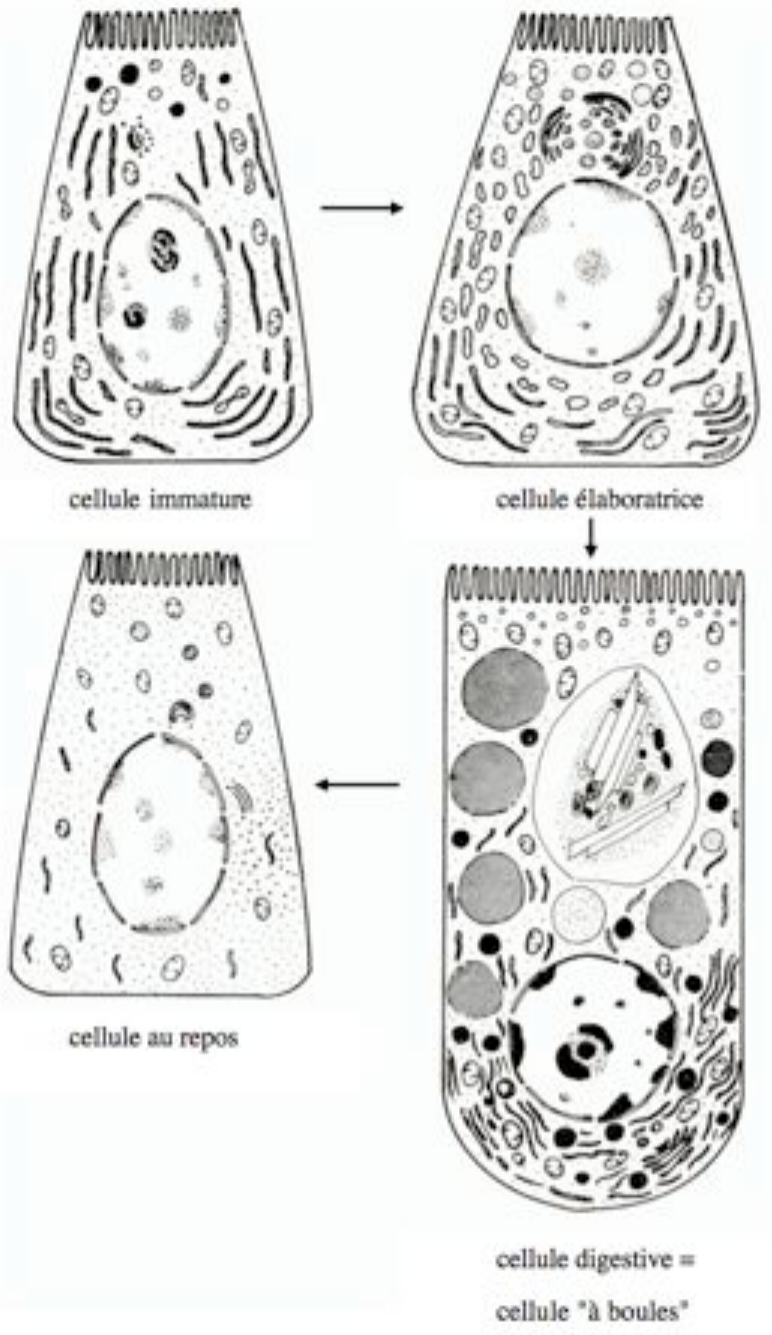

Fig 6. *Sepia officinalis*. Types morphologiques de la cellule digestive de seiche (d'après Yim et Boucaud-Camou, 1980). Les flèches indiquent le passage probable d'un type de cellule à un autre.

système digestif s'initie avec la première prise de nourriture. Les cellules digestives se multiplient et commencent à assurer une digestion extracellulaire en sécrétant des enzymes. Peu à peu, la digestion, initialement à prédominance intracellulaire, devient à prédominance extracellulaire au fur et à mesure de la maturation de la glande digestive et de l'apparition de plusieurs types cellulaires (Boucaud-Camou et al., 1985). La digestion intracellulaire est

assurée par des enzymes agissant en milieu acide, e.g. les phosphatases acides et les cathepsines, et la digestion extracellulaire par des enzymes alcalines. Selon Boucher-Rodoni et al. (1987), il n'y a qu'un seul type de cellule digestive, mais celle-ci évolue selon les stades de développement de la seiche jusqu'à obtenir, vers l'âge d'1 mois, 4 variantes (Figure 6): (1) le type adulte, caractérisé par de nombreuses boules et contenant des vacuoles à corps bruns dans la partie apicale de la cellule; le type juvénile localisé à la base de l'épithélium, qui se décline en 3 sortes: (2) la cellule basophile (immature), cellule de remplacement en voie de division, contenant de nombreux ergastoplasmes; (3) la cellule au repos, contenant des dictyosomes et peu d'ergastoplasme; (4) la cellule élaboratrice, contenant des dictyosomes en voie de sécrétion et des ergastoplasmes et qui produit de petites boules.

La bioaccumulation des métaux chez la seiche

Les céphalopodes sont connus pour concentrer fortement les éléments métalliques dans leurs tissus (e.g. Martin et Flegal, 1975, Miramand et Guary, 1980, Miramand et Bentley, 1992, Bustamante et al., 1998b, 2000). Ce constat a été avéré pour des espèces diverses, prélevées aussi bien en zones contaminées que dans des zones éloignées de l'influence anthropique, comme l'Océan Austral (Bustamante et al., 1998ab). Or, les céphalopodes sont aussi bien des prédateurs actifs de poissons, de bivalves, de crustacés, de céphalopodes, que des proies prépondérantes pour de nombreuses espèces de prédateurs supérieurs, poissons, oiseaux ou mammifères (Clarke, 1996, Croxall et Prince, 1996, Klages, 1996, Smale, 1996). Dès lors, ils vont jouer un rôle central dans le transfert des métaux dans les réseaux trophiques marins. Cette particularité écologique, couplée à leur importance économique évoquée précédemment, a fait émerger l'intérêt d'étudier leur métabolisme vis-à-vis métaux.

La plupart des travaux se sont portés sur la mesure des teneurs en éléments métalliques dans les organismes prélevés *in situ* (e.g. Martin et Flegal, 1975, Miramand et Guary, 1980, Finger et Smith, 1987, Miramand et Bentley, 1992, Bustamante et al., 1998b, 2002a). Chez les céphalopodes, les niveaux des métaux dans les différents tissus ont montré des variations en fonction de l'âge, du sexe, du stade de maturité, ainsi qu'en fonction de la taxonomie, du mode de vie, de l'origine géographique. Au sein de l'organisme, la glande digestive a été

reconnue comme l'organe majoritairement impliqué dans l'accumulation de ces métaux, c'est pourquoi, bon nombre d'études se sont focalisées sur ce tissu.

La seiche *Sepia officinalis* accumule les éléments traces à des niveaux élevés en dépit de son espérance de vie courte (Miramand et Bentley, 1992, Bustamante et al., 2002a, 2006a, Miramand et al., 2006). La glande digestive concentre l'Ag, le Cd, le Co, le Cu, le Hg, le Pb, le ^{210}Po et le Zn. Néanmoins, d'autres organes s'avèrent particulièrement impliqués dans l'accumulation d'autres éléments métalliques. C'est le cas des cœurs branchiaux qui jouent un rôle majeur pour l'^{241}Am, le Fe, le V et ^{237}Pu. Ces résultats laissent penser que ces organes jouent un rôle clé dans le métabolisme des métaux et notamment leur stockage et leur détoxication (Miramand et Guary, 1981, Beuerlein et al., 1998, Bustamante et al., 2002a, 2006a).

Sa croissance rapide et son régime carnivore ont souvent désigné la voie trophique comme la principale voie d'accumulation. Néanmoins, les données *in situ* concernant les teneurs en Hg chez les calmars des eaux du Royaume-Uni suggèrent que la nourriture constitue une source limitée dans les apports de Hg (Bustamante et al., 2006b). Afin de mieux comprendre le métabolisme des métaux chez la seiche, plusieurs travaux en conditions expérimentales ont été entrepris. L'utilisation de radiotraceurs en milieux contrôlés a permis d'étudier les paramètres de leur accumulation et de leur élimination pour l'Ag, l'^{241}Am, le Cd, le Co, le ^{134}Cs, et le Zn selon la voie d'exposition (voie dissoute *vs.* voie trophique) chez *Octopus vulgaris* et *Sepia officinalis* (Miramand et Guary, 1981, Bustamante et al., 2002b, 2004, 2006d). L'utilisation de ces données dans des modèles de bioaccumulation a ainsi permis de définir que la voie alimentaire est prépondérante dans l'accumulation du Cd, du Co, du Zn alors que la voie dissoute est la principale voie d'entrée de l'Ag chez la seiche. Les deux voies présentent une importance équivalente quant à l'accumulation de l'^{241}Am et du ^{134}Cs. Les organes en contact direct avec les métaux dissous accumulent faiblement ces éléments car ils sont rapidement transférés vers la glande digestive et/ou les cœurs branchiaux, exprimant leur rôle fondamental dans les processus de détoxication. En effet, les éléments accumulés dans l'organisme deviennent « métaboliquement disponibles » au moins jusqu'à ce que les processus physiologiques interagissent pour les excréter ou les lier à une molécule particulière ayant une forte affinité pour l'élément, l'empêchant de ce fait de se fixer par ailleurs (Rainbow, 2002). Les fortes concentrations relevées dans la glande digestive suggèrent donc un fort potentiel de liaison des métaux limitant ainsi leur toxicité. L'étude de la distribution sub-cellulaire des métaux dans la glande digestive de seiche (Bustamante et al., 2006a) a permis d'estimer les principaux composants de la cellule responsables de la fixation des

métaux. Ainsi, le Cd, le Co et le Cu sont associés à la fraction soluble impliquant leurs liaisons avec des protéines du cytosol. Alors que les métallothionéines sont généralement suspectées dans ces processus de « piégeage », il semblerait que d'autres protéines jouent aussi un rôle dans la détoxication chez *Sepia officinalis*. Dans le cas du Cd, néanmoins, il a été observé un déplacement du métal de la fraction soluble vers les organites cellulaires lorsque les concentrations du métal s'élèvent (Bustamante et al., 2002a). Les corps bruns, les « boules » (i.e. hétérophagosomes et hétérolysosomes) et les lysosomes sont ces organites auxquels sont aussi associés l'Ag, le Fe, le Mn, le Pb et le Zn. Le système lysosomal de la glande digestive est particulièrement développé chez les Sepiidés, en raison de l'importance des processus de type intracellulaire de la physiologie de la digestion (Boucaud-Camou et Yim, 1980). Ce caractère contribue certainement aux capacités d'accumulation des seiches.

Au vu de ces données, la glande digestive paraît être un bon indicateur de l'exposition des seiches aux contaminants métalliques. La mesure des teneurs en métaux dans cet organe a permis de déterminer des variations de concentration métallique chez la seiche au cours du cycle de vie (Miramand et al., 2006). Dès l'éclosion, les juvéniles accumulent les métaux essentiels tels que le Cu, le Fe et le Zn suggérant un grand besoin métabolique de ces éléments à ce stade. Dans le même temps, alors que l'Ag est accumulé *via* la voie dissoute, la bioaccumulation du Cd est 3 à 5 fois plus importante que celles des autres métaux dès que les juvéniles commencent à se nourrir. Cette accumulation accrue du Cd est lié à la grande capacité d'assimilation et de rétention de ce métal chez les juvéniles permettant une accumulation significative dès la première semaine suivant l'éclosion (Bustamante et al., 2002b). Néanmoins, les juvéniles présentent des capacités de rétention plus faibles que les adultes, en lien avec l'état immature de la glande digestive (Boucaud-Camou et al., 1985). Après un mois, la glande digestive du juvénile est semblable à celle de l'adulte. Les concentrations en Cd, en Co, en Cu, en Fe, en Pb, en V et en Zn suivent une augmentation de type logarithmique jusqu'à la maturation sexuelle (Miramand et al., 2006). Exceptionnellement, les variations des teneurs en Ag semblent liées au comportement migratoire de la seiche. Après l'éclosion, les juvéniles sont exposés alors qu'ils grandissent dans la zone côtière. En revanche, à l'automne, la migration vers les eaux du large, supposées moins contaminées, s'accompagne d'une perte du métal dans la glande digestive. En effet, celle-ci présente des capacités de rétention limitée de l'Ag dont la demi-vie biologique a été estimée à 1 à 2 semaines.

Ainsi, l'accumulation des métaux chez *Sepia officinalis* est dépendante du stade de vie, et intrinsèquement liée à l'état de maturation de la glande digestive, principal organe de stockage, et du mode de vie. Toutefois, un stade de vie n'a pas encore été évoqué : le stade embryonnaire.

L'étude des métaux dans les œufs de seiches s'est, dans un premier temps, essentiellement concentrée sur le métabolisme des métaux essentiels tels que le Cu et le Zn. Decleir et al. (1970) déterminent les teneurs en Cu dans le vitellus et l'embryon au cours du développement. Les quantités de l'élément dans les deux compartiments évoluent exactement à l'opposé l'un de l'autre. En revanche, la quantité de Cu dans les deux compartiments associés reste constante, signifiant une incorporation progressive du Cu, du vitellus vers l'embryon. Ces premières observations montrent que le Cu présent dans l'œuf ne provient pas du milieu extérieur au contraire des résultats de Ranzi (1926), mais que le métal présent dans le vitellus au moment de la ponte est la principale source pour l'embryon. Chez le calmar *Loligo forbesi*, Craig et Overnell (2003) montrent de faibles coefficients de variation pour le Cu et Zn, ce qui suggère que leur accumulation dans les œufs est contrôlée, probablement en lien avec les fortes concentrations de métalloprotéines et d'enzymes contenant du Zn dans les gonades de la femelle (Gerpe et al., 2000). Les mesures des concentrations métalliques dans les œufs de *Sepia officinalis* prélevés *in situ*, confirment des teneurs plus élevées pour les métaux essentiels (Cu, Zn, Fe) que pour les non essentiels, i.e. Ag, Cd, Pb (Miramand et al., 2006). Ces données suggèrent (1) une régulation du transfert des métaux de la femelle à l'œuf lors de la maturation gonadique, i.e. la vitellogénèse, et (2) une protection par la capsule de l'œuf contre la pénétration des métaux *via* la voie dissoute pendant le développement en zone côtière. Pour ce cas, il est très intéressant de noter que les œufs de poulpe (*Octopus vulgaris*), dont la capsule est réduite à la première enveloppe, i.e le chorion (Boletzky, 1989), présentent des concentrations plus élevées en Ag et en Pb que ceux de *Sepia officinalis* (Villanueva et Bustamante, 2006). Les composants glycoprotéiques des couches oviductaires et nidamentaires de la capsule seraient donc impliqués dans la fonction protectrice de la capsule. En condition expérimentale, l'exposition à ^{110m}Ag, ^{241}Am, ^{109}Cd, ^{57}Co, ^{134}Cs et ^{65}Zn a montré une forte capacité d'accumulation des œufs de seiche (Bustamante et al., 2002b, 2004, 2006c) et plus particulièrement leur fixation au niveau de la capsule. Toutefois, la capsule semble perméable sélectivement à l'Ag et au ^{134}Cs qui s'accumulent dans l'embryon, alors que l'^{241}Am, le Cd, le Co et le Zn sont retenus au niveau de la capsule tout au long de l'expérimentation.

Ainsi, ces informations apportées par l'expérimentation radioécologique semblent contradictoires avec les mesures *in situ*, tout au moins en ce qui concerne la pénétration de l'Ag dans l'embryon. Néanmoins, lors de ces travaux, les paramètres de l'élimination n'ont pas été quantifiés.

L'ensemble de ces études en milieux contrôlés présente une autre limite. La période d'exposition était limitée aux 12 derniers jours du développement embryonnaire sur une durée totale de 50 jours à 17°C. Par conséquent, le comportement des métaux en fonction des différents stades de développement reste inconnu. Il est effectivement envisageable que les différentes modifications structurelles de la capsule puissent modifier ses propriétés protectrices au cours du développement et/ou permettre le passage des métaux à certains périodes.

Enfin, à ces données expérimentales et de terrain, s'ajoutent quelques études menées sur les effets toxiques de ces métaux sur le développement des œufs et des embryons (e.g. Establier et Pascual, 1983, Paulij et al., 1990, Le Bihan et al., 2003, Sen et Sunlu, 2007). Les œufs du calmar *Loligo vulgaris* se développent normalement jusqu'à une concentration de 100 $\mu g.l^{-1}$ de Cd, au-dessus de laquelle une mortalité des embryons apparaît (Sen et Sunlu, 2007). Exposés à des concentrations similaires (> 200 $\mu g.l^{-1}$), les œufs de *Sepia officinalis* paraissent plus sensibles lorsque la contamination débute dès les premiers jours plutôt qu'à la moitié du développement (Establier et Pascual, 1983). Ces travaux laissent penser que le Cd peut donc avoir une action toxique pendant les premiers stades embryonnaires et cela malgré les capacités protectrices de la capsule. De plus, le même effet a été observé pour une exposition au Cu à des concentrations supérieures à 400 $\mu g.l^{-1}$ (Establier et Pascual, 1983). Pour des concentrations plus faibles (50 - 200 $\mu g.l^{-1}$), Paulij et al. (1990) observent des éclosions précoces. Bien que le Cu s'accumule dans la capsule tout au long du développement, alors que les teneurs en métal dans le vitellus et l'embryon ne varient pas significativement, les auteurs soupçonnent une pénétration du Cu pendant les derniers stades avant l'éclosion, alors que la capsule de l'œuf devient transparente.

Ces données toxicologiques mettent en lumière la toxicité potentielle du Cd et du Cu vis-à-vis des œufs de seiche. D'autres éléments tels que le Zn ou encore l'Ag sont capables d'inhiber la croissance de l'œuf (Le Bihan et al., 2003). Le caractère essentiel ou non essentiel ne semble pas, ici, un critère déterminant dans le caractère nocif pour les embryons. Par ailleurs, le comportement du métal et notamment les capacités de protection de la capsule semblent montrer des limites lorsque les concentrations des métaux utilisées sont élevées. Les métaux

alors accumulés peuvent interagir avec les processus biochimiques et physiologiques à différentes échelles de l'organisme (Langston, 1990). Les organites et les systèmes enzymatiques sont des cibles courantes concernant l'action des métaux au niveau cellulaire (Marigomez 2002). En effet, les lysosomes et les enzymes associées peuvent être modulés par une association avec les éléments métalliques : la pollution métallique peut engendrer des perturbations de la structure de ces lysosomes (Marigomez et al., 1996) ainsi qu'inhiber certaines enzymes lysosomales telles que les phosphatases acides (Mazorra et al., 2002). Le Bihan et al. (2004) ont montré d'autre part une inhibition, *in vitro*, des activités spécifiques des cathepsines par le Cu et le Zn et une stimulation par l'Ag. Il se trouve d'autre part, que les phosphatases acides et les cathepsines ont été décrites comme étant les enzymes responsables de la dégradation du vitellus lors de l'embryogenèse (Fagotto et Maxfield, 1994, Gerhartz et al., 1997, Carnevali et al., 2001). Un autre système enzymatique, impliqué dans les défenses immunitaires chez les invertébrés, montre une modulation conséquente à l'exposition aux métaux : le système de type phénoloxydase (Coles et Pipe, 1994). En effet, le Cu, le Hg, et le Mn sont capables d'inhiber l'activité phénoloxydase, *in vivo* ou *in vitro* (Pipe et al., 1999, Gagnaire et al., 2004, Hernroth et al., 2004). Ainsi, les métaux sont susceptibles d'interagir à différents niveaux et perturber ainsi le développement de l'embryon de seiche.

En somme, au vu des migrations qui caractérisent le cycle de vie de la seiche, la question de l'impact des métaux sur le développement des œufs de seiche pondus en zone côtière se pose. Un effet nocif des éléments métalliques sur les embryons serait susceptible de réduire les chances de survie des juvéniles à l'éclosion. Le degré de contamination des eaux côtières pourrait constituer un paramètre important déterminant le recrutement des juvéniles à l'automne et, par conséquent, le renouvellement de la population de céphalopodes.

Dans ce contexte, les questions abordées dans cette étude sont les suivantes :

- Quels sont les comportements de différents éléments métalliques vis-à-vis des œufs de seiches lorsque l'exposition a lieu pendant tout le développement embryonnaire ? La capacité de protection de la capsule présente-t-elle des limites ? Quelle est la dynamique d'accumulation et d'élimination des métaux d'un œuf exposé à des éléments, essentiels ou non ?
- Pour des niveaux d'exposition environnementalement réalistes, la concentration des éléments dans l'eau modifie-t-elle les paramètres

d'accumulation des métaux dans l'œuf ? Quels sont les effets toxiques des métaux sur le développement embryonnaire, pour une exposition chronique pendant tout le temps de développement embryonnaire ? les enzymes impliquées dans la digestion des réserves vitellines et les défenses immunitaires peuvent-elles être modulées dans leurs activités ?

- Les embryons peuvent-ils être exposés aux métaux *via* la voie maternelle ? Quels éléments peuvent être transférés de la mère à l'œuf ?

Ainsi pour déterminer si la contamination anthropique peut engendrer un impact sur les juvéniles à l'éclosion chez la seiche, l'ensemble de ce travail tente de définir l'incorporation des métaux dans les œufs de seiche au cours du développement, puis d'estimer les effets potentiels de quelques métaux accumulés sur les fonctions digestives et immunologiques de l'embryon.

Le premier chapitre regroupe trois études portant sur les cinétiques d'accumulation et d'élimination des métaux ainsi que sur leur distribution dans les différents compartiments de l'œuf au cours du développement.

- La première partie porte sur l'accumulation de deux métaux toxiques chimiquement proches : le Hg et le Pb. Deux approches différentes, i.e. la technique de radiotraçage et l'autohistoradiographie, ont été utilisées pour définir l'importance de la capsule et des stades de développement dans les cinétiques d'accumulation ;
- Le second travail compare le comportement de bioaccumulation de 5 radioisotopes : l'^{241}Am, le ^{57}Co, le ^{134}Cs, le ^{54}Mn et le ^{65}Zn.
- La troisième étude rapporte les cinétiques contrastées d'accumulation de l'Ag et du Cd dans l'œuf de seiche. Couplée à l'expérimentation radioécologique, l'utilisation de métaux stables a permis de tester l'effet de la concentration sur les comportements de ces deux métaux.

Le second chapitre développe l'étude des effets toxiques des métaux sur les fonctions digestives et immunologiques de l'embryon :

- La première partie rapporte les effets de l'Ag, du Cd et du Cu sur le développement des œufs exposés à différentes concentrations. Après avoir défini l'évolution des activités des phosphatases acides et des cathepsines

dans l'œuf au cours du développement, l'évaluation de la toxicité des métaux a porté principalement sur les effets de l'exposition des œufs sur ces activités enzymatiques de type lysosomales, impliquées dans la digestion des réserves vitellines ;

- La seconde partie met en évidence le déclenchement de l'activité de type phénoloxydase dans l'embryon de seiche. La modulation suite à une exposition chronique à l'Ag et au Cu sur cette enzyme impliquée dans le système immunitaire a été étudiée pendant les derniers stades de développement.

Le troisième et dernier chapitre rapporte les premiers résultats concernant le transfert maternel des métaux étudié à l'aide des radiotraceurs.

CHAPITRE I

Cinétiques d'accumulation des métaux sur les œufs de seiche *Sepia officinalis* au cours du développement

Partie 1. Cinétiques d'accumulation du Hg et du Pb dans les oeufs de la seiche commune *Sepia officinalis* grâce à l'utilisation de radiotraceurs

Résumé : des œufs de seiche ont été exposés à des concentrations naturelles de Hg et Pb dissous, grâce à l'utilisation des radiotraceurs ^{203}Hg et ^{210}Pb. De plus, quelques œufs ont été placés en condition de dépuration à différents temps du développement (50 jours à 17°C) afin de déterminer les cinétiques d'accumulation et d'élimination des éléments. La distribution des traceurs a été analysée dans les différents compartiments de l'œuf, i.e. la capsule, le vitellus, le liquide péri-vitellin et l'embryon. ^{203}Hg et ^{210}Pb sont constamment accumulés au cours du développement et atteignent des ratios quantité / concentration de 467 ± 43 g et 1301 ± 126 g, respectivement, peu de temps avant l'éclosion. Pendant le premier mois de l'embryogenèse, ^{203}Hg et ^{210}Pb restent principalement associés à la capsule de l'oeuf indiquant que celle-ci joue le rôle d'une barrière efficace contre la pénétration des éléments. Quoi qu'il en soit, à partir de ce moment du développement, ^{203}Hg passe à travers la capsule et s'accumule dans l'embryon. Ce dernier contient 10% de la quantité totale de l'élément présent dans l'œuf. En revanche, ^{210}Pb ne traverse absolument pas la capsule pendant toute la durée d'exposition. En condition de dépuration, il est remarquable que Hg continue de s'accumuler dans l'embryon montrant un processus de translocation de l'élément, de la capsule vers l'embryon. Globalement, cette étude met en évidence une perméabilité de la capsule, dépendante à la fois du métal et du stade de développement. Ces cinétiques différentes entre Hg et Pb sont discutées en fonction des processus chimiques et biologiques impliqués dans le développement de l'œuf de seiche.

Mots-clés : métaux toxiques, embryon, développement, capsule, perméabilité, céphalopode

Accumulation biokinetics of Hg and Pb in the encapsulated egg of the common cuttlefish *Sepia officinalis* using radiotracer experiments

Lacoue-Labarthe T.[1], Warnau M.[2], Oberhänsli F.[2], Rouleau C.[3], Teyssié J.-L.[2], Metian M.[2], Bustamante P.[1]

1- Centre de Recherche sur les Ecosystèmes Littoraux Anthropisés, UMR 6217, CNRS-IFREMER-Université de La Rochelle, 22 avenue Michel Crépeau, F-17042 La Rochelle Cedex 01, France

2- International Atomic Energy Agency – Marine Environment Laboratories, 4 Quai Antoine Ier, MC-98000 Principality of Monaco

3- Pêches et Océans Canada, Institut Maurice-Lamontagne, 850 Route de la Mer, C.P. 1000, Mont-Joli, Québec, Canada.

Correspondence to: P. Bustamante

Centre de Recherche sur les Ecosystèmes Littoraux Anthropisés

UMR 6217 CNRS – IFREMER - Université de La Rochelle,

22 avenue Michel Crépeau

F-17042 La Rochelle Cedex 01, France

Phone: +33 5 46 50 02 94

Fax: +33 5 46 45 82 64

E-mail: pbustama@univ-lr.fr

Abstract: Cuttlefish eggs were exposed to background concentrations of dissolved Hg and Pb, using the radiotracers ^{203}Hg and ^{210}Pb, then placed in non contaminating conditions at different time of the embryonic development (50 d at 17°C) in order to assess their uptake and depuration kinetics and their distribution among the egg compartments (i.e. eggshell, vitellus, peri-vitellin fluid and embryo). ^{203}Hg and ^{210}Pb were accumulated continuously by the eggs all along the development time reaching load/concentration ratio (LCR) of 467 ± 43 g and 1301 ± 126 g, respectively. During the first month of the embryonic life, ^{203}Hg and ^{210}Pb remained associated with the eggshell indicating that it acted as a very efficient shield against their penetration. Nevertheless, from this time onwards, ^{203}Hg pass through the eggshell and was then accumulated in the embryo, which contained 10% of the whole egg metal burden at the end of the exposure period. In contrast, ^{210}Pb did not cross the eggshell all along the exposure time. In depuration conditions, it was noteworthy that Hg continued to accumulate in the embryo indicating the occurrence of ^{203}Hg translocation from the eggshell. Overall, this study showed that the eggshell permeability is element- and time-dependent. These contrasting biokinetics were discussed in terms of chemical and biological processes occurring during the cuttlefish egg development.

Keywords: toxic metals, embryo, development, eggshell, permeability, cephalopod.

Introduction

The primarily source of Hg and Pb contamination in the marine environment is their release from anthropogenic activities in the atmosphere which constitutes the principal vector toward the Ocean (Cossa et al., 1993, Cossa and Ficht, 1999). Nevertheless, Hg and Pb are also discharged in coastal water due to the contaminated flow of the urbanized watershed. The Seine River is one of the most polluted river of Europe and releases elevated amounts of Hg (Cossa and Ficht, 1999) and Pb (Chiffoleau et al., 1994) in the English Channel. The Bay of Seine (Normandy, France) into which the Seine River flows is therefore an interesting case study for coastal Hg and Pb contamination.

In the English Channel, the common cuttlefish *Sepia officinalis* lives offshore during the winter season and makes long reproductive migrations in spring to mate, spawn and die in the coastal waters (Boucaud-Camou and Boismery, 1991). The eggs laid in the shallow waters are thus subject to acute and/or chronic exposure to the various contaminants such as metals which are released in the environment from human activities. As the eggs are fixed on various substrata, their exposure to Hg and Pb would occur during the whole embryonic development as well as during the juvenile stage until the new cohort leaves the coast towards deeper waters. These metals are both known to affect embryonic and larval development of marine invertebrate with higher toxic effects for Hg than for Pb (e.g. Calabrese et al., 1973, Warnau et al., 1996, Sanchez et al., 2005). Nevertheless, embryos which are protected by an egg envelope (i.e. the chorion) are less sensitive to metal toxicity than larvae (e.g. Van Leeuwen et al., 1985, Lavolpe et al., 2004). However, this protective role of the envelope seems to be specific to the considered metal. For example, Rombough (1985) determined that the metals selectivity of dechorionated fish eggs was strictly the opposite compared to chorionated eggs. Moreover, the retention/diffusion properties of the envelope varied through the development. In this respect, the eggs of the medaka *Oryzias latipes* accumulated more Cd before the water hardening of the chorion (Gonzalez-Doncel et al., 2003) whereas the eggs of the chladocera *Daphnia magna* were more sensitive at last embryonic stages (Bodar et al., 1989). Thus, the role of the egg envelope in metal retention/diffusion and its time- and element-selective properties during the embryonic development remained unclear and poorly assessed.

As many cephalopod, cuttlefish laid eggs encapsulated by several envelopes (Boletzky, 1986): the telolecithe oocyte is surrounded by a first membrane (i.e. the chorion) derived from the follicular cells in the ovary. At spawning time, it is embedded by oviductal gland origin

mucosubstances. Once released in the mantle cavity, the oocyte is enwrapped by the nidamental gland secretions stained with ink (Jecklin, 1934, Zatylny et al., 2000) (Figure 1).

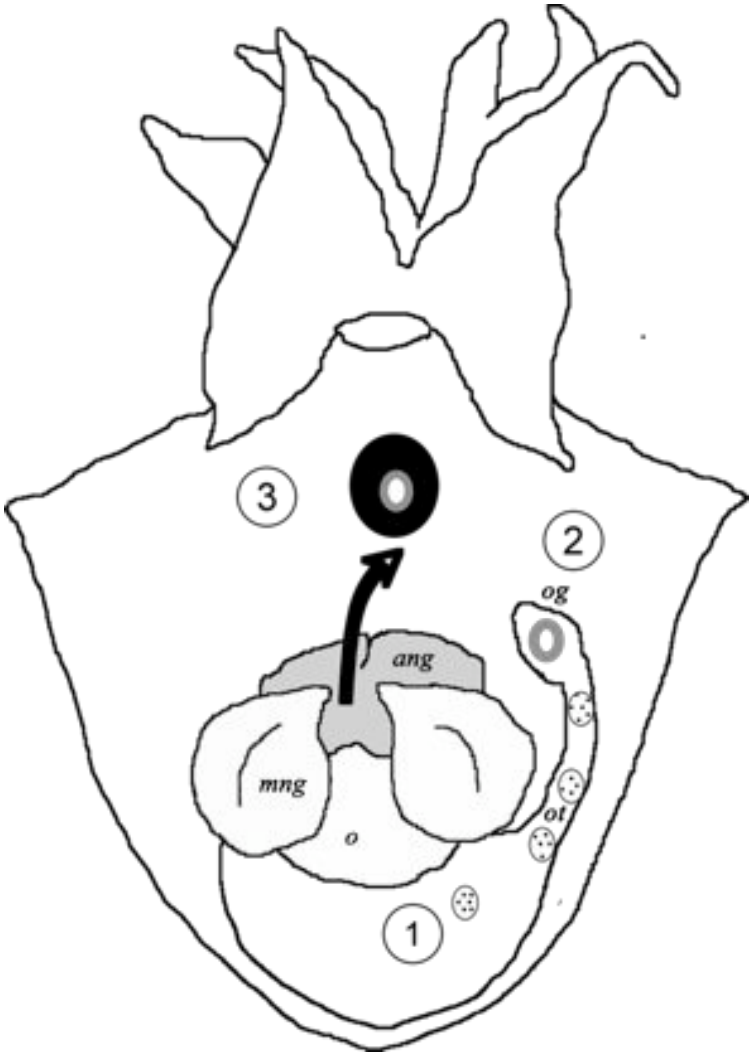

Figure 1. *Sepia officinalis.* The successive steps of ovulation and embedding of eggs in the mantle cavity. 1: full grown oocyte surrounded by the chorion; 2: oocyte with the oviductal gland origin envelope; 3: embedded oocyte with the nidamental mucosubstances and ink.
ang, accessory nidamental glands; o, ovary ; og, oviductal gland ; ot, oviductal tract ; mng, main nidamental gland (according to Zatliny et al. 2000).

These different layers aim at protecting the embryo against the surrounding environment (Boletzky, 1986). During the embryonic development, this eggshell first hardens and becomes thicker because of the polymerization of its components (Figure 2). This reaction leads to a loss of the water contained in the mucopolysaccharidic components and provokes a decrease

of the egg weight. Afterwards, the egg slowly grows until the end of the organogenesis (Figure 2). From this time onward, the egg weight increases rapidly due to a water entry in the peri-vitellin fluid which allow sufficient space for the embryo growth. Along these morphological changes of the egg, the eggshell becomes thinner, being almost transparent at the moment of hatching (Wolf et al., 1985, Gomi et al., 1986).

Cuttlefish eggshell is likely to act as a protective barrier limiting/hindering the incorporation of waterborne metals into the embryo, as suggested for some metals and radionuclides such as ^{241}Am, Cd, Co, Pb, V and Zn (Bustamante et la. 2002, 2004, 2006, Miramand et al., 2006, Villanueva and Bustamante, 2006). However, to the best of our knowledge, only one study reports toxic consequences on the cuttlefish egg following their exposure to elevated Hg concentrations, i.e. 10 ppm (D'Aniello et al., 1990). Thus, very little is known on the related effects of Hg and Pb on cuttlefish development, either in the case of acute or chronic exposure and their bioaccumulation parameters are not well-defined.

In this context, the aim of this study was to investigate the behaviour of Hg and Pb towards cuttlefish eggs chronically exposed to these metals dissolved in seawater from the spawning to the hatching. Gamma-emitting radiotracers, ^{203}Hg and ^{210}Pb, were used to describe the uptake and loss kinetics of both metals at background concentrations. Metals distribution in the eggshell, the vitellus, the embryo and the peri-vitellin fluid was assessed in order to determine the permeability changes according to the development stages. The autohistoradiography technique was also used in order to determine location of the radiotracers among the egg compartments.

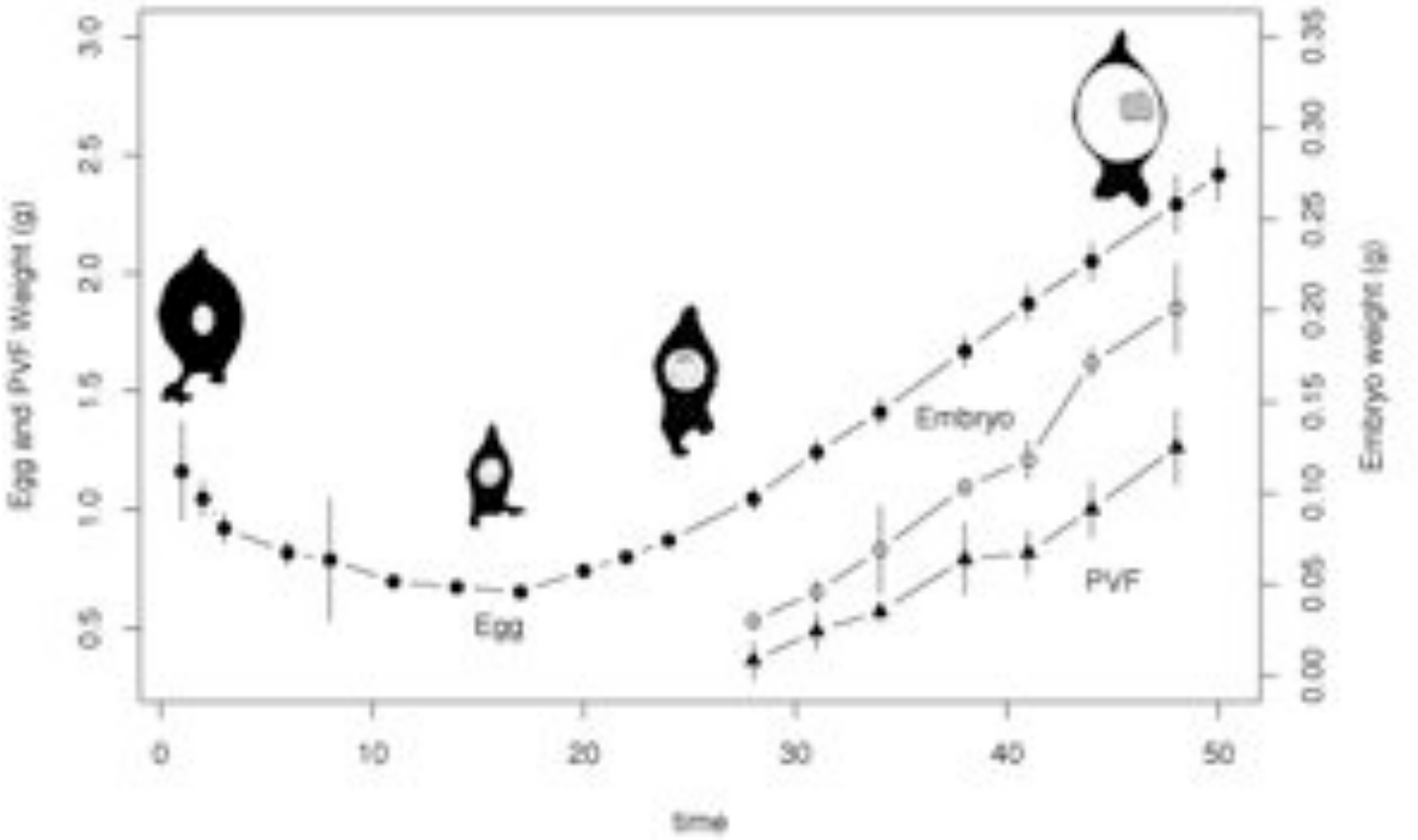

Figure 2. *Sepia officinalis*. Weight variations of the whole egg (●), the embryo (○) and the peri-vitellin fluid (PVF ; ▲) during the embryonic development and sketches of egg according to Gomi et al. (1986)

Materials and methods

1. Organisms, radiotracers and experimental procedure

Adult cuttlefish were collected by net-fishing off Monaco in March and April 2006. They were acclimated and maintained in open-circuit tanks in the IAEA-MEL premises. After mating, the fertilized eggs laid by females were immediately separated to optimise their oxygenation and used for the experiments. Two pools of eggs (n = 310), providing for two distinct females were placed for up to 50 d in two 20-l glass aquaria containing natural seawater (constantly aerated closed circuit; temperature 17°C; 37 p.s.u.; light/dark cycle 12h/12h) spiked with ^{203}Hg (0.5 kBq l^{-1}) and ^{210}Pb (0.5 kBq l^{-1}), respectively.

Radiotracers, ^{203}Hg [as $^{203}HgNO_3$; $t_{1/2}$ = 47 d], and ^{210}Pb [as $^{210}Pb(NO_3)_2$; $t_{1/2}$ = 22 y] were purchased from Isotope Product Laboratory, USA and from CERCA LEA, France, respectively. Stock solutions were prepared in 1 and 3 N nitric acid for ^{203}Hg and ^{210}Pb, respectively to obtain radioactivities allowing the use of spikes of only a few microliters (typically 5 µl).

Radiotracers and seawater were renewed daily during the first week and then every second day to maintain water quality and radiotracer concentrations constant. Radiotracer activities in seawater were checked before and after each water renewal in order to determine the time-integrated radiotracer activities (Warnau et al., 1999). At different time intervals, radionuclide activities were counted in the same tag-identified eggs (n = 8) all along the experiment. In addition, at each counting time, 4 eggs were counted and dissected to determine the radiotracer distribution among the eggshell and the vitellus. After one month of development, embryo and peri-vitellin fluid reached a sufficient size to distinguish them therefore allowing their separation and counting.

After 7, 18, 27, and 40 days of exposure, part of the eggs (n = 70, 60, 50, 40, respectively) were removed from the exposure aquarium and held in a 70-l glass aquarium supplied with clean flowing seawater (open circuit with constant aeration; seawater flux 50 l h^{-1}; temperature 17°C; 37 p.s.u.; light/dark cycle 12h/12h). At different time intervals during the depuration period, the same tag-identified eggs (n = 8) were counted to establish the depuration kinetics of the radiotracers. At the end of the depuration period, the radiotracer distribution among the different egg compartments was determined by dissection of 4 eggs. Additionally, 8 unexposed eggs were distinctly tagged and placed in the same aquarium to be

used as control for possible ^{203}Hg and ^{210}Pb recycling via seawater. Due to technical problems, the ^{210}Pb loss kinetics after an 18-d exposure was not determined.

2. Radioanalyses and data treatment

The tracers were γ-counted using NaI detectors connected to a multichannel analyser (Intergamma, Intertechnique). The detectors were calibrated with an appropriate standard for each counting geometry used and measurements were corrected for background and physical decay of the radiotracers. Counting times were adapted to obtain relative propagated errors less than 5%. They ranged from 10 to 30 min for whole eggs and from 10 min to 24h for the dissected tissues.

Uptake of ^{203}Hg and ^{210}Pb was expressed as change in load/concentration ratio (LCR; ratio between radiotracer content in the egg or egg compartment –Bq– and time-integrated activity in seawater –Bq g^{-1}) along time. Whole radioactivity content in the eggs or in their compartments was considered in order to take into account the weight variations of whole eggs and egg compartments due to vitellus reduction, embryo growth and incorporation of water during the development. Uptake kinetics were best described by using either a power equation (Eq. 1), a combined equation (logistic plus exponential) (Eq. 2):

$$LCR_t = A\, t^{ke} \quad \text{(Eq. 1)}$$

$$LCR_t = LCR_{ss}(1-e^{-k_e t}) / (1+e^{-k_e(t-I)}) \quad \text{(Eq. 2)}$$

where LCR_t and LCR_{ss} (g) are load/concentration ratios at time t (d) and at steady-state, respectively, k_e are the biological depuration rate constants (d^{-1}), respectively (Whicker and Schultz, 1982) and LCR_0, *I* and A are constants.

Constants (and their statistics) of the best fitting equations (decision based on ANOVA tables for two fitted model objects) were estimated by iterative adjustment of the models using the *nls* curve-fitting routine in R freeware.

Radiotracer depuration kinetics were expressed in terms of change of percentage of remaining activity (i.e., radioactivity at time t divided by initial radioactivity measured in the egg or in the compartment at the beginning of the depuration period * 100) along with time.

The depuration kinetics were best fitted by either a single (Eq. 4) or a double exponential equation (Eq. 5):

$$A_t = A_0\, e^{-k_e t} \quad \text{(Eq. 3)}$$

$$A_t = A_{0s}\, e^{-k_{es} t} + A_{0l}\, e^{-k_{el} t} \quad \text{(Eq. 4)}$$

where A_t and A_0 are the remaining activities (%) at time t (d) and 0, respectively, k_e is the biological depuration rate constant (d^{-1}), and « s » and « l » subscripts refer to the short- and long-lived component of the depuration kinetics (Warnau et al., 1999). The determination of k_e allows the calculation of the radiotracer biological half-life ($Tb_{1/2} = \ln 2 / k_e$).

Sampled eggs, exposed to dissolved ^{210}Pb during the first 15 days of development, were frozen in slurry of dry ice in hexane. From each egg, 20-µm-thick sections were realized with a specially designed cryomicrotome (Leica CM3600). Sections were then freeze-dried and placed on phosphor screens for 4-7 d. After exposure, the screens were scanned with a Cyclone Phosphor Imager (Packard Bio-science). ^{210}Pb activity in the tissues and organs was quantified with the software Optiquant (Canberra-Packard). In all analysis, the level of significance for statistics and modelling was always set at $\alpha < 0.05$.

Results

1. Uptake kinetics in the whole eggs and in the different egg compartments

The ^{203}Hg and ^{210}Pb uptake kinetics in the whole cuttlefish eggs were best described by a power model ($R^2 \geq 0.84$), all along the development time (Figure 3), with power coefficients of 0.45 and 0.86, respectively. Eggs revealed greater accumulation efficiencies for ^{210}Pb than for ^{203}Hg, reaching LCR values of 1301 ± 126 and 467 ± 43 g a few hours before hatching, respectively.

Figure 4 showed the uptake kinetics of ^{203}Hg and ^{210}Pb in the eggshell and in the embryo during the embryonic development. It is worth noting that the accumulation of both metals by the eggshell displayed a similar pattern to those observed in the whole egg. Indeed, the coefficient values of the power equation were identical between the models fitting the egg and the eggshell kinetics. Moreover, the eggshell also revealed strong accumulation capacities with LCR reaching 556 ± 45 and 1390 ± 188 for ^{203}Hg and ^{210}Pb, respectively at the end of development. These LCR were not significantly different (U-test; $p = 0.239$) from those determined for the whole egg.

In the embryo, ^{203}Hg was accumulated following a double equation (saturation + logistic) with an estimated LCR_{ss} of 99 ± 18 which was not reached at day 50 with LCR of 61 ± 1. In contrast, the embryo did not show any ^{210}Pb accumulation with time.

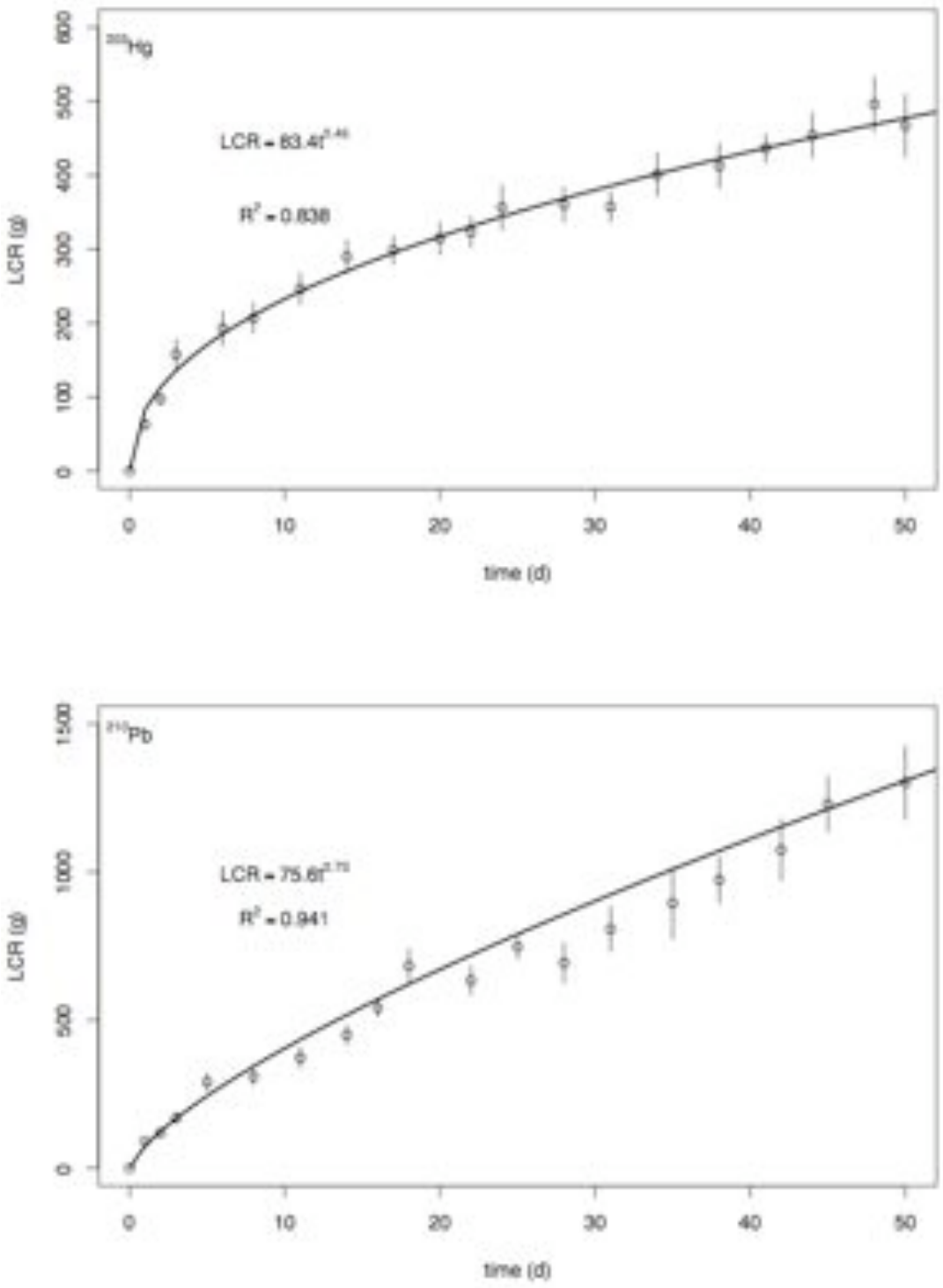

Fig. 3. *Sepia officinalis.* Whole-body uptake kinetics of ^{203}Hg and ^{210}Pb in cuttlefish eggs exposed for the whole development time to the radiotracers dissolved in seawater (load-concentration ratio, LCR (g) ; mean ± SE, n=8).

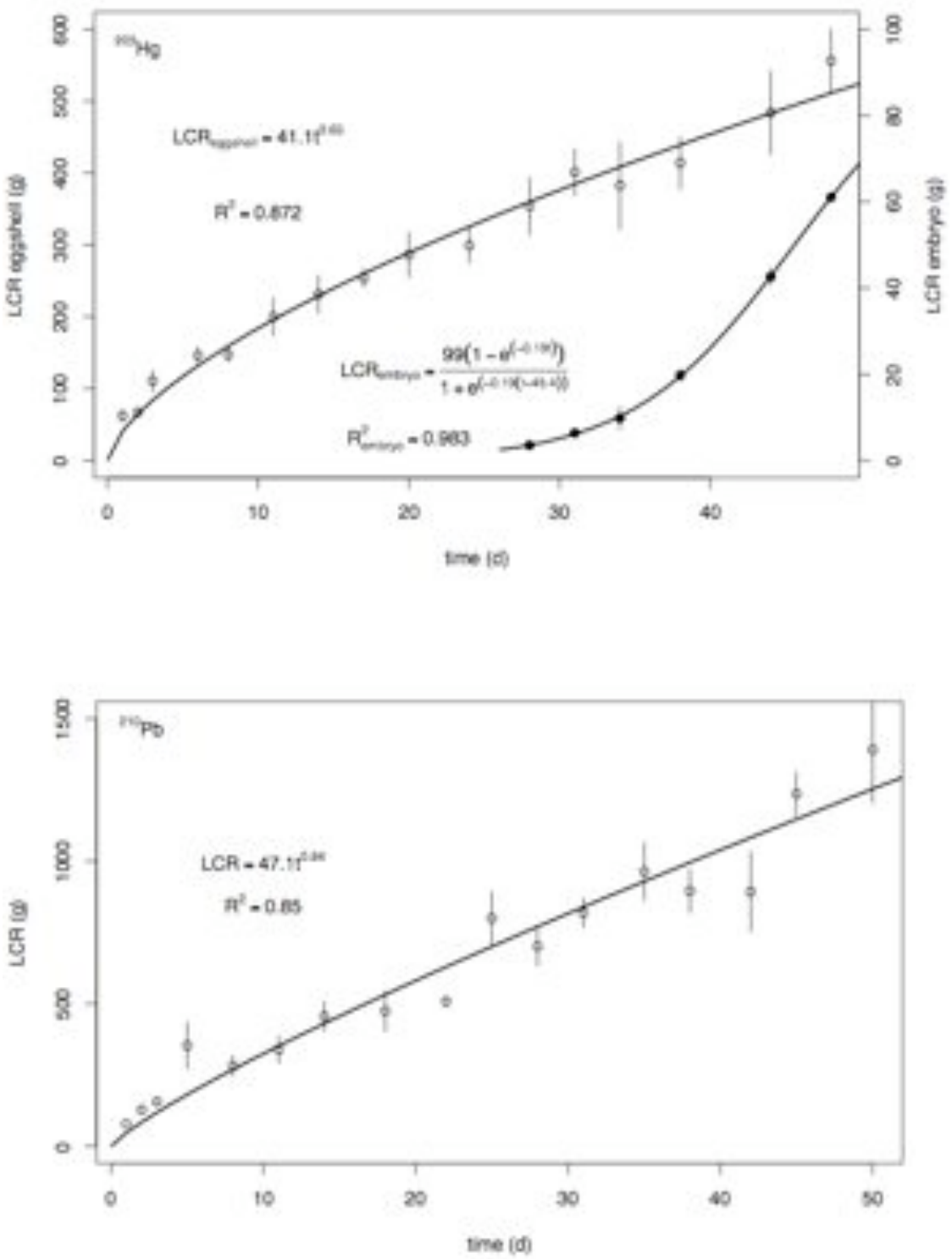

Fig 4. *Sepia officinalis*. Eggshell (○) and embryo (●) uptake kinetics of ^{203}Hg and ^{210}Pb in cuttlefish eggs exposed for the whole development time to the radiotracers dissolved in seawater (load-concentration ratio, LCR; mean ± SE, n=4).

The distribution of ^{203}Hg and ^{210}Pb in the different compartments (Table 1) confirmed that the greater proportion of both metals remained associated with the eggshell. Nevertheless, 2.5% of the total Hg content in the egg was found in the embryo and 1.0% in the vitellus at day 33, showing that this metal crossed the eggshell. The proportion of ^{203}Hg contained in the embryo increased during the development and the embryo contained 10% of the metal at day 48, showing its effective bioaccumulation in embryonic tissues. In contrast, ^{210}Pb was never detected in the internal compartments, i.e. nor in the embryo, the vitellus or the peri-vitellin fluid until the end of development. At this time, ^{210}Pb is only found with extremely low activities (< 1.5 Bq) in the embryo.

Table 1. *Sepia officinalis*. Tissue distribution of the radiotracers (%; mean ± SD; n = 4) among the different cuttlefish egg compartments at different time of development, after 11, 33 and 48 days of exposure via seawater.

	11 d		33 d		48 d	
	^{203}Hg	^{210}Pb	^{203}Hg	^{210}Pb	^{203}Hg	^{210}Pb
Eggshell	99.6 ± 0.4	100 ± 0.0	96.2 ± 1.2	100 ± 0.0	89.7 ± 1.4	99.5 ± 0.5
Vitellus	< 1	0	1.0 ± 0.7	0	-	-
Embryo	-	-	2.5 ± 1.6	0	10.0 ± 1.3	< 1
Peri-vitellin fluid	-	-	< 1	0	< 1	< 1

2. Depuration kinetics in the whole eggs

The depuration kinetics following a 7-, 27- and 40-d exposure for both metals were fitted using a single exponential model but a double exponential model best described the depuration kinetics after an 18-d exposure for ^{203}Hg (Table 2). The loss kinetic of ^{210}Pb after an 18-d exposure was not determined because of experimental problems.

Interestingly, the retention capacity of ^{203}Hg by the eggs decreased during the development time, with $T_{b½}$ decreasing from 104 d to 39 d between the beginning (7 d) and the end of the development (48d).

Table 2. *Sepia officinalis*. Parameters of the equations describing the loss kinetics of ^{203}Hg and ^{210}Pb in the whole cuttlefish eggs previously exposed to the radiotracers during (a) 7 days, (b) 18 days, (c) 27 days, (d) 40 days. O and T: one- and two-exponential depuration equations, respectively; *** and **: p-values < 0.001 and < 0.01, respectively.

Pathway	Model	A_{0s} (SE)	k_s	$T_{b½s}$ ± SE (d)	A_{0l} (SE)	k_l	$T_{b½l}$ ± SE (d)	R^2
(a) Loss in whole eggs after a 7-d exposure								
^{203}Hg	O	100 (1.0) ***	0.007 ***	104 ± 9	-	-	-	0.643
^{210}Pb	O	101 (1.9) ***	0.019 ***	37 ± 3	-	-	-	0.745
(b) Loss in whole eggs after a 18-d exposure								
^{203}Hg	T	9.8 (2.5) ***	1.301	0.5 ± 0.1	90.3 (1.8) ***	0.009 ***	79 ± 10	0.789
^{210}Pb	O	-	-	-	-	-	-	-
(c) Loss in whole eggs after a 27-d exposure								
^{203}Hg	O	101 (2.0) ***	0.016 ***	43 ± 6	-	-	-	0.492
^{210}Pb	O	98.4 (1.4) ***	0.031 ***	22 ± 1	-	-	-	0.886
(d) Loss in whole eggs after a 40-d exposure								
^{203}Hg	O	102 (1.4) ***	0.018 ***	39 ± 9	-	-	-	0.409
^{210}Pb	O	98.4 (0.8) ***	0.032 **	21 ± 2	-	-	-	0.875

Table 3. *Sepia officinalis*. Tissue distribution of ^{203}Hg and ^{210}Pb (%; mean ± SD; n = 4), total activities (Bq; mean ± SD; n = 4) in the different egg compartments at the beginning (t_0) and at the end (t_f) of the depuration period and the percentage of the activity gain or loss (+ or -) by the compartment between t_0 and t_f.

	^{203}Hg				^{210}Pb				Loss or gain of the tracer (%)	
	t_0		t_f		t_0		t_f		^{203}Hg	^{210}Pb
	%	Bq	%	Bq	%	Bq	%	Bq		
(a) Loss after 7 days of exposure										
Eggshell	99.8 ± 0.4	71 ± 5	96.5 ± 1.1	50 ± 12	100 ± 0.0	84 ± 12	100 ± 0.0	37 ± 7	- 30	- 56
Vitellus	< 1	< 1	-	-	0	< dl	0	< dl	< 1	< 1
Embryo	-	-	3.3 ± 1.1	1.6 ± 0.2	0	< dl	0	< dl	+ 2.2	< 1
Peri-vitellin fluid	-	-	< 1	< 1	0	< dl	0	< dl	< 1	< 1
(b) Loss after 18 days of exposure										
Eggshell	99.6 ± 0.2	104 ± 12	96.0 ± 1.0	72 ± 11		-		-	- 31	-
Vitellus	< 1	< 1	-	-		-		-	< 1	-
Embryo	-	-	3.7 ± 0.9	2.7 ± 0.1		-		-	+ 2.5	-
Peri-vitellin fluid	-	-	< 1	< 1		-		-	< 1	-
(c) Loss after 27 days of exposure										
Eggshell	98.2 ± 0.4	128 ± 15	94.0 ± 0.7	77 ± 4	100 ± 0.0	240 ± 20	99.5 ± 0.4	176 ± 16	- 40	- 27
Vitellus	< 1	< 1	-	-	0	< dl	-	-	< 1	< 1
Embryo	< 1	1.3 ± 0.1	5.7 ± 0.6	4.6 ± 0.1	0	< dl	< 1	< 1	+ 2.5	< 1
Peri-vitellin fluid	< 1	< 1	< 1	< 1	0	< dl	< 1	< 1	< 1	< 1
(d) Loss after 40 days of exposure										
Eggshell	92.7 ± 0.9	169 ± 5	91.9 ± 2.0	166 ± 18	99.9 ± 0.1	306 ± 56	99.3 ± 0.3	285 ± 54	- 2	- 7
Vitellus	< 1	1.1 ± 0.1	-	-	0	< dl	-	-	< 1	< 1
Embryo	6.4 ± 0.8	12 ± 0.7	7.6 ± 1.6	13 ± 0.3	0	< dl	< 1	1.1 ± 0.2	< 1	< 1
Peri-vitellin fluid	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

dl: detection limit.

In the same way, the $Tb_{½}$ of the ^{210}Pb was 1.7-fold higher following a 7-d exposure compared to those after 27 and 40 d of exposure (37 *vs.* 22 and 21 d).

The total activities (Bq) and the corresponding distribution (%) of the radiotracers in the different compartments at the beginning and at the end of the depuration period are presented in Table 3. The activity of ^{203}Hg increased significantly in the embryo while it decreased in the eggshell. After the 7-d, 18-d and 27-d of exposure, up to 2.5 % of the ^{203}Hg initially contained in the eggshell was detected in the embryo a few hours before hatching. After 40-d of exposure, no significant changes occurred in the ^{203}Hg distribution until the end of development.

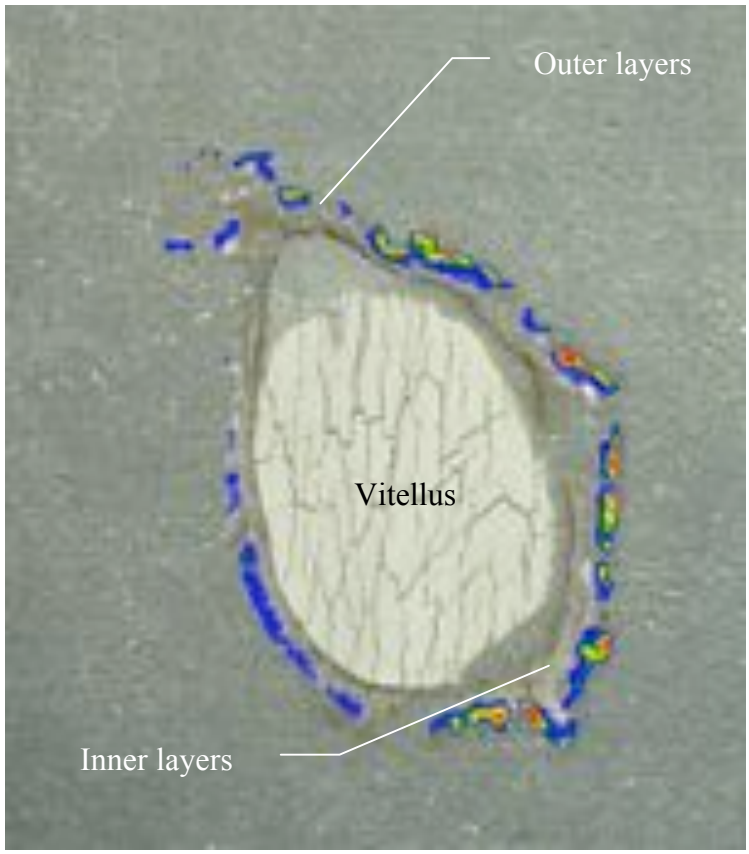

Fig 5. *Sepia officinalis*. Whole-body autoradiogram of cuttlefish egg exposed to dissolved ^{210}Pb at 15^{th} day of development.

3. **Autoradiogram**

Figure 5 presented an autoradiogram of the whole-body egg exposed 15d to dissolved ^{210}Pb (i.e. after 15 d of development). ^{210}Pb covered the egg being associated with the outer layers of the eggshell. No lead was detected in the inner part of the mucopolysaccharidic eggshell and in the internal compartment, i.e. the peri-vitellin space and the vitellus.

Discussion

Cuttlefish egg undergoes major structural and physiological modifications due to the embryonic development. For example, both the increases in peri-vitellin fluid volume and embryo growth lead to an important variation of the egg weight. In parallel, the yolk is transferred from the outer to the inner yolk sack (Boletzky, 2003). The egg growth therefore provokes a dilution effect on metal concentrations of the different internal compartments. Thus, in order to take into account the weight variations due to vitellus reduction, embryo growth and incorporation of water during the development, the bioaccumulation of radioactive metals in this study was expressed in terms of metallic content in the whole egg and its different compartments (eggshell, embryo, vitellus, and peri-vitellin fluid).

The exposure of cuttlefish eggs to waterborne metals revealed that ^{203}Hg and ^{210}Pb were efficiently accumulated from the dissolved phase as the LCR increased all along the development time (Fig 1). The uptake kinetics of both metals followed a power function. However, the power coefficient of the ^{210}Pb uptake kinetic model was 1.6 fold higher than this of ^{203}Hg kinetic. Consequently, the ^{210}Pb LCR, reached a few hours before hatching, was 3-fold higher than the ^{203}Hg LCR suggesting that the Hg binding capacity of cuttlefish egg is rather limited. Interestingly, uptake kinetics of ^{203}Hg and ^{210}Pb in the eggshell were also best described following a power equation showing that the accumulation of both in the cuttlefish egg was driven by the retention properties of the eggshell. Indeed, the greatest proportion of both metals remained associated with the eggshell all along the development time, as illustrated by the autoradiography of the ^{210}Pb located around the outer layers of the eggshell (Fig. 5). Overall, some works reported the eggshell capacities to bound metals on the egg envelopes or jelly coat in fish (Alderdice et al., 1979b, Michibata, 1981, Rombough, 1985), on the eggcase of the dogfish *Scyliorhinus canicula* (Jeffree et al., 2006, 2007), or in the

cuttlefish eggshell (Paulij et al., 1990, Bustamante et al., 2002, 2004, 2006). Stouthart et al. (1994) showed that more than 84% of the Pb was bound with the egg chorion in the common carp, *Cyprinus carpio*. In cuttlefish eggs collected from the field, Pb was only detected in the eggshell (Miramand et al., 2006). In this context, the retention of both metals is likely due to adsorption and/or absorption on/in the eggshell in relation to its chemical composition. In cuttlefish, the eggshell is composed of sulphydryl-rich proteins and carboxylic-reach mucopolysaccharides (Kimura et al., 2004) for which Hg and Pb have strong affinities, respectively (Viarengo and Nott, 1993, Gélabert et al., 2007).

Hg and Pb accumulation increased all along the embryonic life in the eggshell showing that the eggshell metal-binding sites were not saturated at the end of the development time. This can be due to the increase of the eggshell surface after two weeks of development, which is due to the egg swelling potentially leading to an enhanced binding capacity. Moreover, it has been shown that physiological uptake parameters of metals could increase with the ratio of 'body' surface to 'body' volume (Fisher et al., 1983, 1987). Therefore, the increase of the surface/volume ratio of the eggshell could explain the constant accumulation of Hg and Pb in the eggshell. In contrast to those metals, Ag load concentration ratio decreased with the increase of the egg weight, i.e. when the egg surface increased (Lacoue-Labarthe et al., submitted). These authors suggested that Ag, which also bound to the eggshell, was lost from the outer layers because of their delamination along the embryonic development. The results of our study showed that Hg had a different behaviour than Ag whereas they have similar binding properties for sulphur binding sites (Nieboer and Richardson, 1980). Such a difference strongly suggests that complex mechanisms linked to the eggshell composition drive the retention of the metals on the eggshell. Therefore, more information is needed on the composition and the properties of the eggshell of cuttlefish eggs. Nevertheless, in the case of Hg and Pb, as it has been reported for other metals and radionuclides such as. Ag, ^{241}Am, Cd, Co, V and Zn (Miramand et al., 2006, Villanueva and Bustamante, 2006), the eggshell would act as a protective barrier limiting/hindering the incorporation of waterborne metals into the egg.

Despite the shielding properties of the eggshell, the embryo efficiently accumulated ^{203}Hg during the last 20 d of the embryonic development period (i.e., from days 30 to 50; Fig. 4), reaching 10% of the total metal content in its tissues at the end of the development (Table 1). Data also clearly showed that Hg did not penetrate across the eggshell during the first month of development. Then, Hg accumulated in the vitellus and in the embryo indicating that the eggshell permeability changes with the developmental stages and particularly with the egg

swelling process. At the same time, it is noteworthy that Pb was not accumulated in the internal tissues whatever the development stage was. The eggshell displayed therefore a specific permeability to Hg and Pb as previously shown for other metals (e.g. Bustamante et al., 2002, 2004). This may arise for two reasons: (i) the eggshell retention properties determine the metal diffusion capacity or (ii) the metal selective penetration is governed by their speciation.

First, when the cuttlefish eggs were placed in depuration conditions, the retention capacity of ^{203}Hg and ^{210}Pb by the eggs decreased with increasing time of exposure, suggesting that the strength of bonds between the metals and the eggshell (i.e. the main compartment accumulating metals) decreased with the development time. Nevertheless, ^{203}Hg was more tightly retained by the egg than ^{210}Pb ($Tb_{1/2}$: 104 *vs.* 37 d after 7 d of exposure), suggesting that (1) Hg bonds were more strong than for Pb, i.e. with sulfhydryl groups *vs.* carboxylic groups, or (2) that Hg was more absorbed in the inner layers of the eggshell. In fish eggs, metals (e.g. Ag, Cu, and Hg) tightly bound to the capsule showed a limited penetration whereas those (e.g. Cd, Pb, and Zn) weakly bound could entered rapidly in the peri-vitellin fluid (Rombough, 1985). Accordingly, Pb would be expected to penetrate with more facility into the internal compartments in comparison with Hg but this was consistent with our observations. Indeed, the autoradiogram of the ^{210}Pb exposed egg showed that the tracer covered exclusively the outer layers of the eggshell. Its penetration capacity through the envelopes appeared very limited. Further results showing the eggshell labelling of egg exposed to ^{203}Hg should confirm if this metal could bound to the inner layers of the eggshell, showing therefore a greater diffusion capacity in the muco-secretions.

Depuration experiments showed that the incorporation of Hg in the internal compartments during the last month of development was also due to the release of the metal bound to the eggshell (Table 3). Indeed, the distribution of ^{203}Hg after different exposure times showed that the embryo accumulated this element during the depuration phase while it was lost from the eggshell during the same period. As the eggshell constituted the only source of radiotracers for the embryo during the depuration phase, translocation of ^{203}Hg should have occurred from the eggshell towards the embryo. This process occurs after one month of development when, as previously indicated, the eggshell becomes thinner and permeable to water (Wolf et al., 1985, Cronin and Seymour, 2000). At these embryonic stages, Hg is able to diffuse through the nidamental and oviductal envelopes and pass through the chorion before to accumulate in the embryo.

Mechanisms of egg swelling in cephalopods are not completely known. Ikeda et al. (1993) have shown that the oviductal mucosubstances of the eggshell induced the peri-vitellin space formation in the eggs of the squid *Todarodes pacificus*. In the egg of the cuttlefish *Sepiella japonica*, the egg swelling is caused by a water influx following an osmotic pressure maintained by discharges of proteins in the perivitellin fluid during the development (Gomi et al., 1986). It is supposed that these organic matters were transferred from the oviductal origin eggshell layers to the peri-vitellin space (Ikeda et al., 1993). This allows the assumption that metal bound to the eggshell proteins could pass through the chorion, reaching the peri-vitellin space and then the embryo.

Hg could also pass through the eggshell, including the chorion which is the first membrane surrounded the embryo in the peri-vitellin space, under its ionic form. Indeed, Alderdice et al. (1979a) mentioned that ions such as H^+, Na^+, K^+, and Cl^- pass freely between the peri-vitellin fluid and the external medium. Moreover, Barrett et al. (2001) showed that Na and Ca could rapidly penetrate in the peri-vitellin fluid through the chorion of the eggs of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* during the last stages of the development, suggesting that the accumulation of Hg was allowed by a permeability change of the chorion after one month of development.

In this context, the ionic form of the metal, i.e. the chemical speciation could determine the selectivity of the eggshell toward metals accumulation. Indeed, in the eggs of the common carp *Cyprinus carpio*, the pH-dependant speciation controlled the accumulation of Pb (Stouthart et al., 1994). Consequently, Pb uptake by the embryo decreased with an increase of the Pb-hydroxides and Pb-carbonates as prevailing ionic forms, at the expense of the free ionic form, which is more bioavailable for the embryo. In seawater, $PbCO_3$, $PbCl_2$ and $PbCl^+$ are the dominant forms (Cossa et al., 1993), which seemed to be poorly bioavailable for the cuttlefish eggs while it did not cross the eggshell membranes.

In summary, the cuttlefish egg showed an efficient Hg and Pb uptake capacity. The great proportion of both metals remained associated with the eggshell all along the development time. Nevertheless, Hg accumulated also in the embryo after one month whereas Pb did absolutely not. This asks the question of the selective permeability of the eggshell for the metals and the temporal changes of its permeability. The metal uptake capacity might result from a combination between the retention/diffusion properties of the nidamental and oviductal envelopes and the permeability to metallic ions of the chorionic membrane. Nevertheless, the chemical properties of all these constituents might be disturbed by the

biological processes of the embryonic development. Further studies should be carried out in order to determine the nature of the eggshell components involved in these processes and their temporal evolution throughout the embryonic life.

Acknowledgment: MW is an Honorary Senior Research Associate of the National Fund for Scientific Research (NFSR, Belgium). The IAEA is grateful for the support provided to its Marine Environment Laboratories by the Government of the Principality of Monaco. This work was financially supported by the IAEA and the CRELA (University of La Rochelle).

Partie 2. Biocinétiques d'accumulation et distribution de l'Am, du Co, du Cs, du Mn et du Zn dans les oeufs de la seiche commune, *Sepia officinalis*, pendant toute la durée du développement.

Résumé : des œufs ont été exposés à des concentrations basales d'^{241}Am, de ^{134}Cs, de ^{57}Co, de ^{54}Mn et de ^{65}Zn. Ensuite, les oeufs ont été places en condition de décontamination à différents temps du développement. L'ensemble de ces conditions a permis d'évaluer 1) les cinétiques d'accumulation et de perte des éléments et 2) leur distribution dans les différents compartiments de l'œuf, i.e. la capsule, le vitellus, le liquide péri-vitellin et l'embryon. ^{241}Am, ^{57}Co et ^{65}Zn sont accumulés continuellement par les oeufs pendant toute la durée du développement, alors que le ^{54}Mn montre une saturation après un mois d'exposition. La cinétique d'accumulation du ^{134}Cs suit précisément les variations de poids de l'oeuf principalement dues aux gains et pertes d'eau de l'oeuf. Pendant le premier mois de l'embryogenèse, ^{241}Am, ^{134}Cs, ^{57}Co, ^{54}Mn et ^{65}Zn restent associés à la capsule indiquant que celle-ci joue le rôle d'une barrière protectrice contre la pénétration des métaux. Néanmoins, au terme de ce premier mois de développement, ^{134}Cs, ^{57}Co, ^{54}Mn et ^{65}Zn s'accumulent plus ou moins efficacement dans l'embryon (^{134}Cs > ^{65}Zn > ^{54}Mn > ^{57}Co exprimée en pourcentage de l'activité totale de l'élément). ^{241}Am est l'unique élément qui ne traverse pas la capsule quel que soit le temps d'exposition. Les cinétiques de perte révèlent que les capacités de rétention de l'oeuf varient au cours de l'embryogenèse. Ces cinétiques contrastées sont discutées en termes de processus chimiques et biologiques se déroulant au cours du développement de l'oeuf.

Mots-clés : radionucléide, métaux essentiels, biocinétiques, embryon, capsule, perméabilité, céphalopode

Contrasting biokinetics of accumulation and distribution of Am, Co, Cs, Mn and Zn by the eggs of the common cuttlefish (*Sepia officinalis*) during the whole development time

Lacoue-Labarthe T.[1], Warnau M.[2], Oberhänsli F.[2], Teyssié J.-L.[2], Bustamante P.[1]

1- Centre de Recherche sur les Ecosystèmes Littoraux Anthropisés, UMR 6217, CNRS-IFREMER-Université de La Rochelle, 22 avenue Michel Crépeau, F-17042 La Rochelle Cedex 01, France

2- International Atomic Energy Agency – Marine Environment Laboratories, 4 Quai Antoine Ier, MC-98000 Principality of Monaco

Correspondence to: P. Bustamante
CRELA
UMR 6217
CNRS-IFREMER-Université de La Rochelle,
22 avenue Michel Crépeau
F-17042 La Rochelle Cedex 01, France
Phone: +33 5 46 50 02 94
Fax: +33 5 46 45 82 64
E-mail: pbustama@univ-lr.fr

Abstract: Cuttlefish eggs were exposed to background concentrations of dissolved ^{241}Am, ^{134}Cs, ^{57}Co, ^{54}Mn and ^{65}Zn, then placed in non-contaminating conditions at different time during the 50 d of the embryonic development in order to assess 1) the uptake and depuration kinetics of these elements and 2) their distribution among the different egg compartments (i.e. eggshell, vitellus, peri-vitellin fluid and embryo). ^{241}Am, ^{57}Co and ^{65}Zn were accumulated continuously by the eggs all along the development time, whereas ^{54}Mn reached a steady-state saturation after one month of exposure. Interestingly, the uptake kinetic of ^{134}Cs tightly followed the weight variations of the eggs, mainly because of water inputs/outputs. During the first month of the embryonic life, ^{241}Am, ^{134}Cs, ^{57}Co, ^{54}Mn and ^{65}Zn remained associated with the eggshell indicating that it acted as a very efficient shield against their penetration. Nevertheless, from this time onwards, ^{134}Cs, ^{57}Co, ^{54}Mn and ^{65}Zn accumulated more or less efficiently with ^{134}Cs > ^{65}Zn > ^{54}Mn > ^{57}Co in the embryo (as expressed as percentage of the total element activity). ^{241}Am was the only tested element that did not cross the eggshell all along the exposure time. The loss kinetics revealed that egg retention capacities varied during the embryonic life. These contrasting biokinetics were discussed in terms of chemical and biological processes occurring during the cuttlefish egg development.

Keywords: radionuclide, essential metals, biokinetics, embryo, eggshell, permeability, cephalopod

Introduction:

Development of nuclear facilities or fallout of nuclear weapon testing resulted in the release of many long-lived radionuclides into aquatic environments such as ^{241}Am, ^{57}Co, ^{134}Cs and ^{54}Mn, which are fission products (Warnau et al., 1999, Ke et al., 2000). Although the radioactive wastes act as micropollutants in the Ocean, these elements are known to accumulate in marine invertebrates (e.g. Miramand and Guary, 1981, Wang et al., 1996, Baden et al., 1999, Warnau et al., 1999, Ke et al., 2000). In addition to this, radionuclides are of specific interest given the biological properties of their stable isotopes. It is therefore possible to use radiotracers in order to study the accumulation behaviour of stable metal such as Zn present in the dissolved phase of the marine water.

In northern Europe, the common cuttlefish *Sepia officinalis* lives offshore during winter and makes long reproductive migrations in spring to mate and to spawn in coastal waters (Boucaud-Camou and Boismery, 1991). The eggs laid in the shallow waters are thus subject to acute and/or chronic exposure to various contaminants such as trace elements which are released from human activities in the marine environment. As eggs are fixed on hard substrata, ^{241}Am, Co, ^{134}Cs, Mn and Zn exposure can occur during the whole embryonic development as well as during the juvenile stage until the new cohort leaves the coast towards deeper waters. Furthermore, trace elements are known to be highly toxic, especially towards early development stages of marine invertebrates (Calabrese and Nelson, 1974, Warnau et al., 1996a). However, very little is known on the related effects of trace elements on cuttlefish development, either in the case of acute or chronic exposure and their bioaccumulation parameters are not well-defined.

Cuttlefish eggs show several specific characteristics: the telolecithe oocyte is surrounded by a first membrane (i.e. the chorion) derived from the follicular cells in the ovary. At spawning time, it is embedded by oviductal gland origin mucosubstances. Once released in the mantle cavity, the oocyte is enwrapped by the nidamental gland secretions stained with ink (Jecklin, 1934). These different layers aim at protecting the embryo against the surrounding environment (Boletzky, 1986). During the embryonic development, this eggshell first hardens and become thicker because of the polymerization of its components. Then, the egg grow because of the entry of water and the eggshell becomes thinner, being almost transparent at the moment of hatching (Wolf et al., 1985) as the egg swells.

Preliminary studies have shown that cuttlefish eggs did not show the same bioaccumulation efficiencies considering different trace elements (i.e. ^{241}Am, Ag, Cd, Co, ^{134}Cs, Zn) during the last two weeks of development (Bustamante et al., 2002, 2004, 2006b). Consistently with these studies, Lacoue-Labarthe et al. (Chap.I.1.) recently showed that Ag was greatly accumulated in the embryo during the last 20 d of egg development. In contrast, these authors reported that Cd only passed slightly across the eggshell during the last days of the development, highlighting the eggshell time- and element-selective properties. Additionally, analysis of several metals in cuttlefish eggs from the field showed that their distribution between the eggshell and the embryo was dependent on the considered element (Miramand et al., 2006).

In this context, the aim of this study was to investigate the behaviour of five radionuclides towards cuttlefish eggs chronically exposed to these elements dissolved in seawater from spawning (day 0) to hatching (day 50). Gamma-emitting radiotracers, ^{241}Am, ^{57}Co, ^{134}Cs, ^{54}Mn, and ^{65}Zn were used to describe the uptake and loss kinetics at background concentrations. Radiotracer distribution in the eggshell, the vitellus, the embryo and the peri-vitellin fluid was assessed in order to determine the permeability changes according to the development stages.

Materials and methods

1. Organisms, radiotracers and experimental procedure

Twelve adult cuttlefish were collected by net-fishing off Monaco in March and April 2006. Male and female cuttlefish were acclimated and maintained in open-circuit tanks in the IAEA-MEL premises. After mating, the fertilized eggs laid by the same female were immediately separated to optimise their oxygenation and used for the experiments. The eggs (n = 310) were placed for up to 50 d in a 20 l glass aquarium containing natural seawater (constantly aerated closed circuit; temperature 17°C; 37 p.s.u.; light/dark cycle 12h/12h) spiked with ^{241}Am (0.2 kBq l^{-1}), ^{57}Co (1.0 kBq l^{-1}), ^{134}Cs (2.0 kBq l^{-1}), ^{54}Mn (1.0 kBq l^{-1}) and ^{65}Zn (1.0 kBq l^{-1}).

Radiotracers, ^{241}Am [as $^{241}AmNO_3$; $t_{½}$ = 432 d], ^{57}Co [as $^{57}CoCl_2$; $t_{½}$ = 272 d], ^{134}Cs [as ^{134}CsCl; $t_{½}$ = 2 y], ^{54}Mn [as $^{54}MnCl_2$; $t_{½}$ = 312 d], and ^{65}Zn [as $^{65}ZnCl_2$; $t_{½}$ = 244 d] were purchased from Amersham, UK (^{241}Am, ^{57}Co, ^{134}Cs) and Isotope Product Laboratory, USA (^{54}Mn). Stock solutions were prepared in 0.1 N nitric acid for ^{241}Am, 0.1 N and 1 N chloridric

acid for ^{57}Co, ^{134}Cs, and ^{65}Zn, respectively to obtain radioactivities allowing the use of spikes of only a few microliters (typically 5 µl).

Radiotracers and seawater were renewed daily during the first week and then every second day to maintain water quality and radiotracer concentrations constant. Radiotracer activities in seawater were checked before and after each water renewal in order to determine the time-integrated radiotracer activities (Warnau et al., 1996b). At different time intervals, radionuclide activities were counted in the same tag-identified eggs (n = 8) all along the experiment. Eggs were weighted in order to follow the normal occurrence of the embryonic development (Figure 1). In addition, at each counting time, 4 eggs were counted and dissected to determine the radiotracer distribution among the eggshell, vitellus. After one month of development, embryo and perivitellin fluid size were sufficient to distinguish them and therefore separate them.

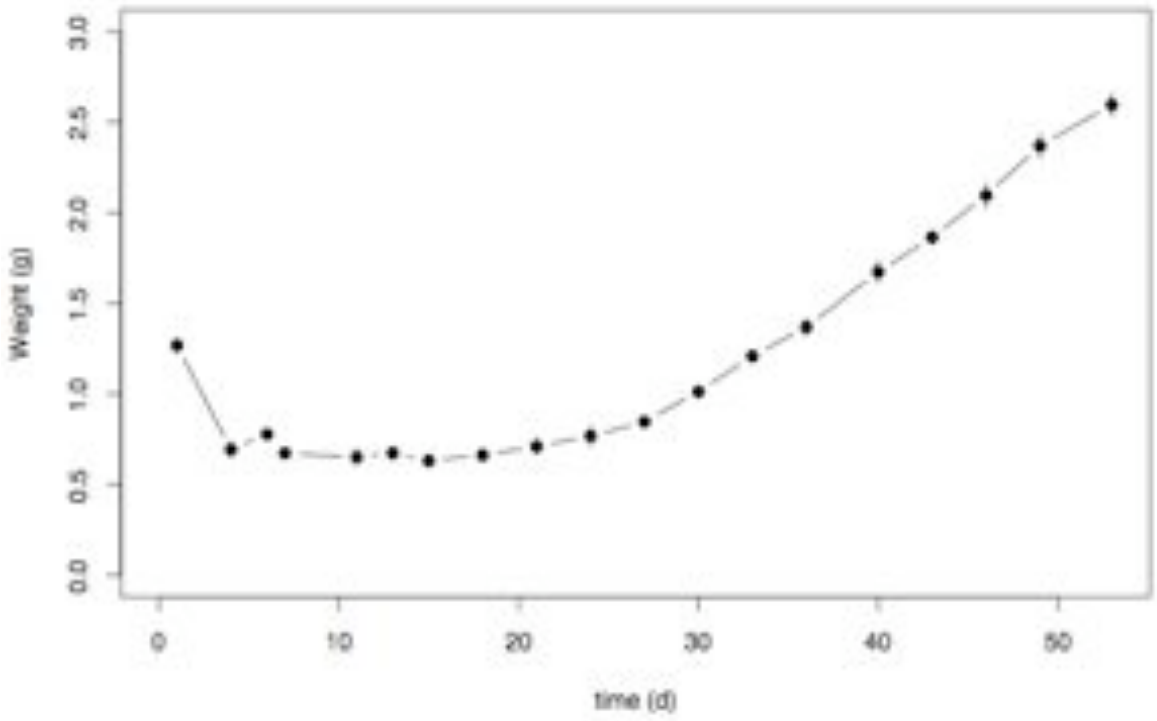

Fig 1. *Sepia officinalis*. Weight (g; mean ± SE, n=8) kinetic of the whole-body cuttlefish egg as a function of the development time.

After 7, 18, 27, and 40 days of exposure, part of the eggs (n = 70, 60, 50, and 40, respectively) were removed from the exposure aquarium and held in a 70 l glass aquarium

supplied with not contaminated flowing seawater (open circuit with constant aeration; seawater flux 50 l h^{-1}; temperature 17°C; 37 p.s.u.; light/dark cycle 12h/12h). In each batch, 8 eggs were distinctly tagged and were counted at different time intervals to establish the depuration kinetics of the radiotracers. At the end of the depuration period, the radiotracer distribution among the different egg compartments was determined by dissection of 4 eggs. Additionally, 8 unexposed eggs were distinctly tagged and placed in the same aquaria to be used as control for possible ^{110m}Ag and ^{109}Cd recycling via seawater.

2. Radioanalyses and data treatment

Radioactivities were measured using a high-resolution γ-spectrometry system consisting of four coaxial Germanium (N- or P-type) detectors (EGNC 33-195-R, Canberra® and Eurysis®) connected to a multi-channel analyzer and a computer equipped with a spectra analysis software (Interwinner® 6). The detectors were calibrated with an appropriate standard for each counting geometry used and measurements were corrected for background and physical decay of the radiotracers. Counting times were adapted to obtain relative propagated errors less than 5%. They ranged from 10 min to 30 min for whole eggs and from 10 min to 24h for the dissected tissues.

Uptake of ^{241}Am, ^{57}Co, ^{134}Cs, ^{54}Mn and ^{65}Zn was expressed as change in load/concentration ratio (LCR; ratio between radiotracer content in the egg or egg compartment –Bq– and time-integrated activity in seawater –Bq g^{-1}) along time. Whole radioactivity content in eggs or in their compartments was considered in order to take into account the weight variations of whole eggs and egg compartments due to vitellus reduction, embryo growth and incorporation of water during the development. Uptake kinetics were best described by using either a saturation exponential equation (Eq. 1), a combined equation (logistic plus exponential) (Eq. 2), a power equation (Eq. 3), or a polynomial equation (Eq. 4):

$$LCR_t = LCR_{ss} (1-e^{-ke\, t}) \quad \text{(Eq. 1)}$$

$$LCR_t = LCR_{ss}(1-e^{-ke\, t}) / (1+e^{-ke(t-I)}) \quad \text{(Eq. 2)}$$

$$LCR_t = A\, t^{ke} \quad \text{(Eq. 3)}$$

$$LCR_t = A\, t^2 + B\, t + LCR_0 \quad \text{(Eq. 4)}$$

where LCR_t and LCR_{ss} (g) are load/concentration ratios at time t (d) and at steady-state, respectively, k_e and k_u are the biological depuration and uptake rate constants (d^{-1}), respectively (Whicker and Schultz, 1982) and LCR_0, *I,* A and B are constants.

Constants (and their statistics) of the best fitting equations (decision based on ANOVA tables for two fitted model objects) were estimated by iterative adjustment of the models using the *nls* curve-fitting routine in R freeware.

Radiotracer depuration kinetics were expressed in terms of change of percentage of remaining activity (i.e., radioactivity at time t divided by initial radioactivity measured in the egg or in the compartment at the beginning of the depuration period * 100) along with time.

The depuration kinetics were best fitted by either a single (Eq. 5) or a double exponential equation (Eq. 6):

$$A_t = A_0 e^{-k_e t} \quad \text{(Eq. 5)}$$

$$A_t = A_{0s} e^{-k_{es} t} + A_{0l} e^{-k_{el} t} \quad \text{(Eq. 6)}$$

where A_t and A_0 are the remaining activities (%) at time t (d) and 0, respectively, k_e is the biological depuration rate constant (d^{-1}), and « s » and « l » subscripts refer to the short- and long-lived component of the depuration kinetics (Warnau et al., 1999). The determination of k_e allows the calculation of the radiotracer biological half-life ($Tb_{½}$= ln2 / k_e).

Constants (and their statistics) of the best fitting equations (decision based on ANOVA tables for two fitted model objects) were estimated by iterative adjustment of the models using the *nls* curve-fitting routine in R freeware. The level of significance for statistical analysis was always set at $\alpha < 0.05$.

Results

2. Uptake kinetics in the whole eggs

Figure 2 showed the uptake kinetics of ^{241}Am, ^{57}Co, ^{134}Cs, ^{54}Mn and ^{65}Zn in the whole eggs all along the embryonic development. These elements were taken up following three contrasting accumulation patterns. First, the kinetics of ^{241}Am, ^{57}Co and ^{65}Zn followed a power model all along the development time with power coefficient of 0.86, 0.85 and 0.90, respectively. Eggs revealed elevated bioaccumulation efficiencies for these elements with LCR reaching 1423 ± 100, 1087 ± 65 and 1035 ± 54 for ^{241}Am, ^{57}Co and ^{65}Zn, respectively, at the end of the development. Secondly, the kinetic of ^{54}Mn was best fitted by a saturation

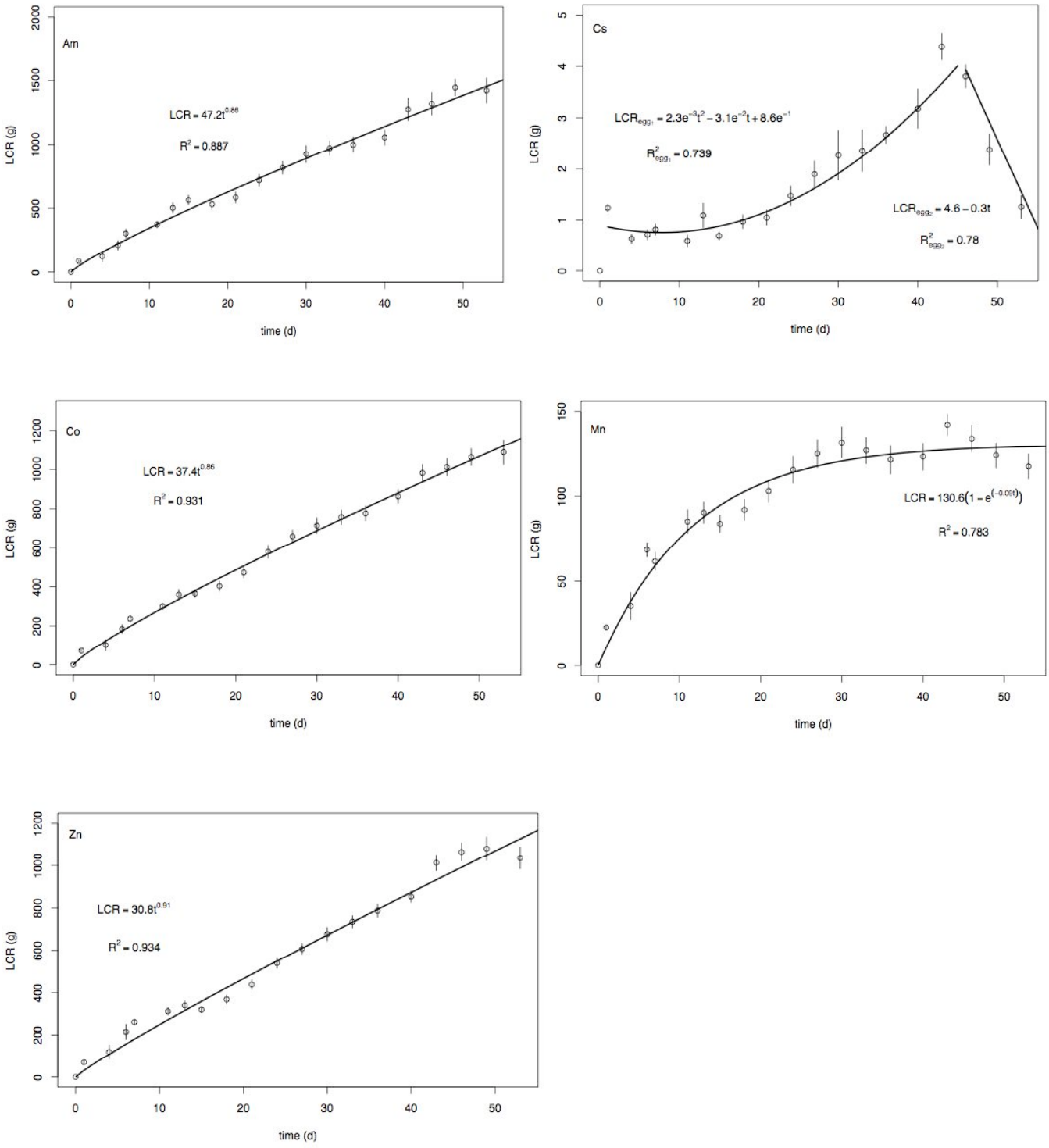

Fig. 2. *Sepia officinalis.* Whole-body uptake kinetics of ^{241}Am, ^{57}Co, ^{134}Cs, ^{54}Mn and ^{65}Zn in cuttlefish eggs exposed for the whole development time to the radiotracers dissolved in seawater (load-concentration ratio, LCR (g); mean ± SE, n=8).

exponential model, reaching a steady-state equilibrium (LCR_{ss} = 131 ± 3) one month after the spawning. Finally, ^{134}Cs displayed a much more complicated behaviour. Indeed, its LCR jumped up to 1.2 ± 0.1 during the day of spawning. Then, its uptake kinetic was best fitted by a polynomial model as ^{134}Cs decreased from day 1 up to day 11 to a minimum LCR value (0.6 ± 0.1). From this time, the ^{134}Cs uptake kinetic displayed an increase until day 43, reaching a maximum LCR value of 4.4 ± 0.3. The final decreased following a linear equation until the hatching is due to the lack of radiotracer in the experimental medium. Overall, the uptake pattern of ^{134}Cs was greatly similar to the variation of the egg weight and closely followed the same kinetic as shown in Figure 1. In this respect, the correlation between the ^{134}Cs LCR in the whole egg and the egg wet weight from day 1 to day 43 was highly significant (Pearson test; $p < 0.001$) (Figure 3).

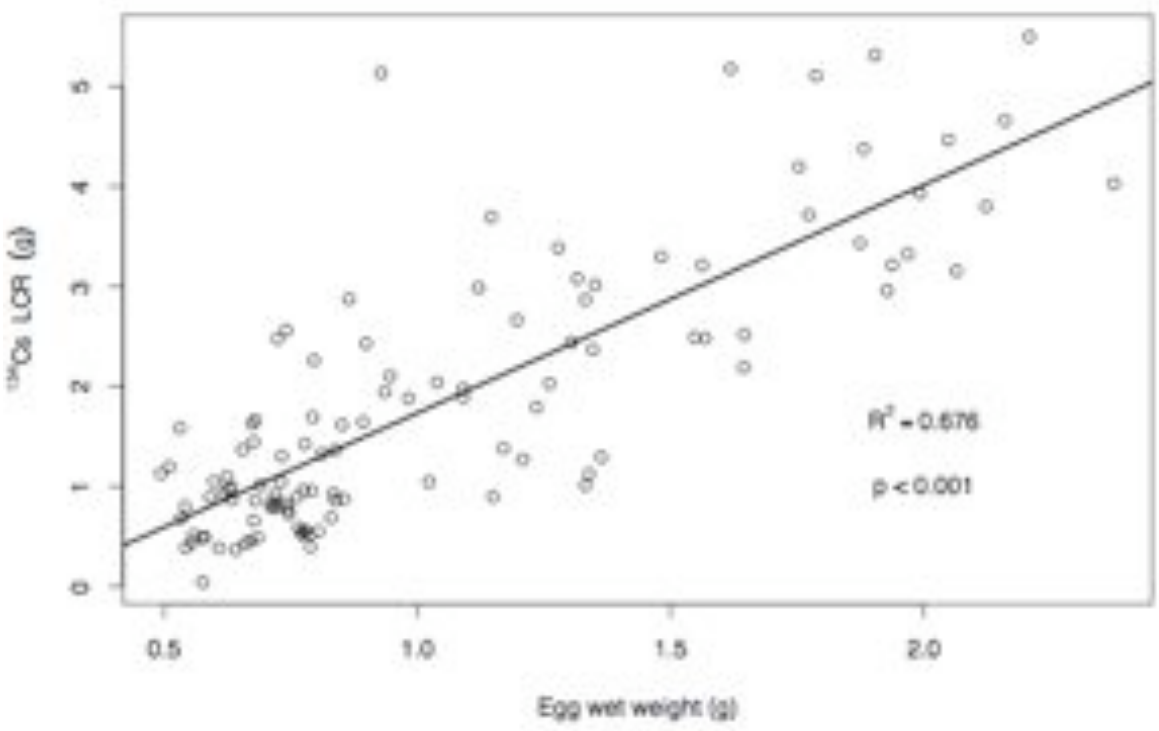

Fig 3. *Sepia officinalis*. Relationships between the LCR (g) of ^{134}Cs in the whole egg exposed to dissolved radiotracer and the egg wet weight (g) from day 1 to day 43 of the embryonic development (Pearson correlation test).

2. Uptake kinetics and distribution in the different egg compartments

Accumulation kinetics of ^{241}Am, ^{57}Co, ^{54}Mn and ^{65}Zn in the eggshell and in the embryo are shown in Figure 4. Regarding ^{241}Am, ^{57}Co and ^{65}Zn, it is worth noting that the uptake kinetics in the eggshell displayed the same pattern than those described for the whole egg (see above) with similar power constant values (0.86 *vs.* 0.87, 0.85 *vs.* 0.87 and 0.90 *vs.* 0.81). No significant uptake of ^{241}Am was found in the embryo with time whereas ^{57}Co and ^{65}Zn were accumulated in this compartment according to a combined (saturation + logistic) model, reaching estimated LCR_{ss} values of 39 ± 7 and 284 ± 72, respectively. However, the LCR values in the embryo, a few hours before hatching, were 40 and 4 fold lower than in the eggshell for ^{57}Co and ^{65}Zn, respectively.

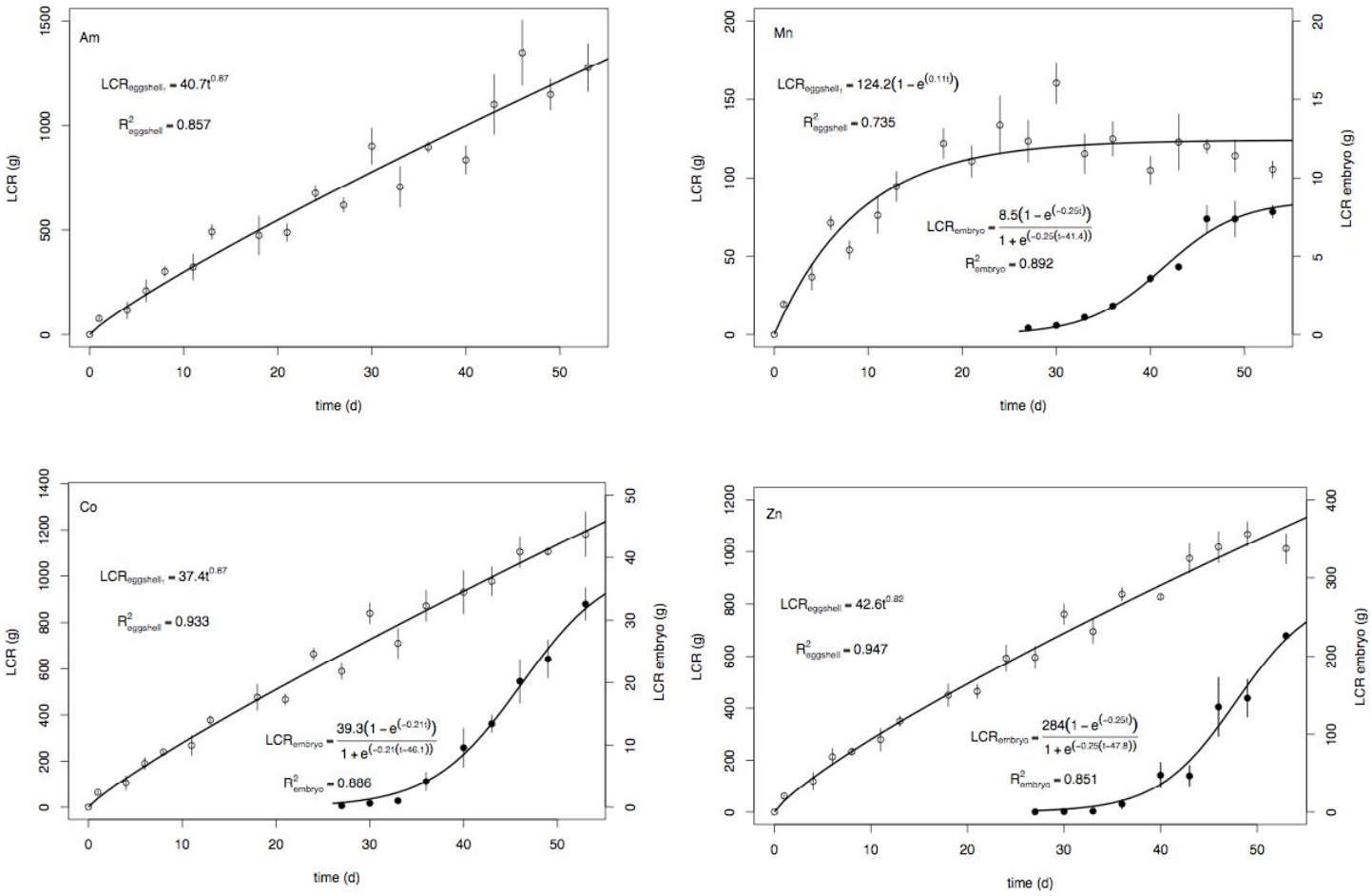

Fig 4. *Sepia officinalis*. Eggshell (○) and embryo (●) uptake kinetics of ^{241}Am, ^{57}Co, ^{54}Mn and ^{65}Zn in cuttlefish eggs exposed for the whole development time to the radiotracers dissolved in seawater (load-concentration ratio, LCR; mean ± SE, n=4).

The uptake kinetic of ^{54}Mn in the eggshell was best fitted by an exponential model as previously determined for the whole egg and steady-state equilibrium was reached at day 20. The estimated LCR_{ss} was not significantly different in the eggshell and in the whole egg (124 ± 4 *vs.* 131 ± 3). From one month of development, ^{54}Mn started to accumulate in the embryo following a combined model with a subsequent LCR_{ss} of 8.5 ± 0.7.

The distribution of the radiotracers in the different egg compartments revealed that the highest proportion of ^{241}Am, ^{57}Co, ^{54}Mn and ^{65}Zn remained associated with the eggshell all along the development time (Table 1). Nevertheless, at day 50, i.e. a few hours before hatching, 2.7, 6.9 and 18.4% of ^{57}Co, ^{54}Mn and ^{65}Zn, respectively, were found in the embryo showing 1) their effective penetration across the eggshell and 2) their subsequent incorporation in the embryo. The proportions of these elements remained ≤ 1% in the peri-vitellin fluid all along the development time. Concerning ^{134}Cs, this radionuclide was slightly detected in the vitellus at day 11 and 33 (3.8 ± 1.4 and 2.3 ± 0.8%, respectively). Moreover, at day 33, the proportion of ^{134}Cs was similar in the peri-vitellin fluid to that in the eggshell (27.2 ± 7.1 *vs.* 19.9 ± 2.1). At day 50, 39.7% of Cs was associated with the embryo and 12.3 ± 3.6 with the peri-vitellin fluid (Table 1).

3. Depuration kinetics in the whole eggs

The depuration kinetics after 7, 18 and 40 d of exposure to ^{241}Am and 7 and 27 d of exposure to ^{57}Co, were fitted using a single exponential model (Table 2). A double exponential model best described the depuration kinetics after 27 d of exposure to ^{241}Am and 18 and 40 d exposure to ^{57}Co (Table 2).

Considering that the greatest proportion of ^{241}Am (92%) was lost following a long-lived component ($Tb_{½}$ = 32 d) after 27 d of exposure, it was noteworthy that the retention capacity of ^{241}Am by the egg decreased with increasing duration of egg pre-exposure. Indeed, the biological half-life of ^{241}Am was 57, 39, 32 and 18 d after 7, 18, 27 and 40 d of exposure, respectively. In the same way, after an 18 d exposure, 92% of the accumulated ^{57}Co was lost according to a long-lived component, with $Tb_{½}$ of 36 days. ^{57}Co was therefore depurated with $Tb_{½}$ of 31, 36, and 24 days following 7, 18 and 27 d of exposure, implying a decrease of the strength of the binding sites of the eggshell, in which the main part of Co was found between the days 18 and 27 of development. Regarding the 40 d exposure, a part (30%) of the ^{57}Co was rapidly lost ($Tb_{½}$: 1.7 d) while 71% was lost slowly according to a long-lived component

Table 1. *Sepia officinalis*. Compartment distribution of the radiotracers (%; mean ± SD; n = 4) in cuttlefish eggs at different time of development, after 11, 33 and 50 days of exposure via seawater. The lack of vitellus at 50 d and embryo and peri-vitellin fluid at 11 d do not allow calculation at these times for these compartments.

	Eggshell			Vitellus		Embryo		Peri-vitellin fluid	
	11 d	33 d	50 d	11 d	33 d	33 d	50 d	33 d	50 d
^{241}Am	99.3 ± 0.5	99.5 ± 0.1	99.2 ± 0.2	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
^{57}Co	99.7 ± 0.0	99.7 ± 0.0	97.0 ± 0.3	< 1	< 1	< 1	2.7 ± 0.3	< 1	< 1
^{134}Cs	96.2 ± 1.4	50.7 ± 9.2	48.0 ± 4.0	3.8 ± 1.4	2.3 ± 0.8	19.9 ± 2.1	39.7 ± 2.3	27.2 ± 7.1	12.3 ± 3.6
^{54}Mn	97.7 ± 1.2	98.0 ± 0.3	92.2 ± 0.2	2.3 ± 1.2	< 1	1.0 ± 0.1	6.9 ± 0.2	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1
^{65}Zn	99.9 ± 0.0	99.8 ± 0.1	81.2 ± 1.1	< 1	< 1	< 1	18.4 ± 1.0	< 1	< 1

Table 2. Parameters of the equations describing the loss kinetics of ^{110m}Ag and ^{109}Cd in the whole cuttlefish eggs previously exposed to the radiotracers during (a) 7 d, (b) 18 d, (c) 27 d, and (d) 40 d. O and T: 1- and 2-exponential loss equations, respectively; p-values are < 0.001 for *** and < 0.01 for **.

Pathway	Model	A_{0s} ± SE (%)	k_s	$T_{b½s}$ ± SE (d)	A_{0l} ± SE (%)	k_l	$T_{b½l}$ ± SE (d)	R^2
(a) Loss in whole egg after 7 days of exposure								
^{241}Am	O	98.2 ± 2.2	0.012 ***	57 ± 6	-	-	-	0.881
^{57}Co	O	91.8 ± 2.1	0.023 ***	31 ± 2	-	-	-	0.950
^{134}Cs	T	43.9 ± 8.3	2.495	0.3 ± 0.1	56.3 ± 4.2	0.016 **	44 ± 11	0.882
^{54}Mn	O	88.5 ± 2.7	0.036 ***	19 ± 2	-	-	-	0.949
^{65}Zn	T	37.3 ± 10.8	0.138	5.0 ± 2.3	59.0 ± 11.5	0.006	123 ± 11	0.960
(b) Loss in whole egg after 17 days of exposure								
^{241}Am	O	95.9 ± 1.2	0.018 ***	39 ± 2	-	-	-	0.818
^{57}Co	T	8.3 ± 3.6	1.255	0.6 ± 0.6	92.0 ± 2.4	0.019 ***	36 ± 3	0.810
^{134}Cs	O	82.1 ± 5.9	0.024 ***	29 ± 8	-	-	-	0.192
^{54}Mn	T	13.1 ± 2.8	0.887 *	0.8 ± 0.4	87.2 ± 2.2	0.028 ***	24 ± 1	0.936
^{65}Zn	T	23.8 ± 3.3	0.658 ***	1.1 ± 0.3	76.3 ± 2.5	0.002 ***	56 ± 8	
(c) Loss in whole egg after 27 days of exposure								
^{241}Am	T	8.3 ± 2.9	0.610	1.1 ± 0.8	91.8 ± 2.6	0.022 ***	32 ± 3	0.926
^{57}Co	O	98.3 ± 1.4	0.030 ***	24 ± 1	-	-	-	0.855
^{134}Cs	T	55.9 ± 28.4	0.266	2.6 ± 2.1	31.6 ± 29.4	0.007	98 ± 603	0.428
^{54}Mn	T	17.6 ± 2.8	0.751 **	0.9 ± 0.3	82.7 ± 2.5	0.033 ***	21 ± 1	0.857
^{65}Zn	T	26.3 ± 2.3	0.180 ***	0.8 ± 0.2	73.6 ± 1.8	0.015 ***	46 ± 5	0.921
(d) Loss in whole egg after 40 days of exposure								
^{241}Am	O	98.3 ± 2.5	0.040 ***	18 ± 2	-	-	-	0.714
^{57}Co	T	29.7 ± 17.7	0.412	1.7 ± 1.4	70.8 ± 18.2	0.018	39 ± 48	0.836
^{134}Cs	T	67.2 ± 15.9	1.373 **	0.5 ± 0.2	32.8 ± 15.0	0.030	23 ± 37	0.831
^{54}Mn	T	30.1 ± 11.9	0.504	1.4 ± 0.8	70.2 ± 12.0	0.024	29 ± 19	0.891
^{65}Zn	T	33.3 ± 7.7	0.691 **	1.0 ± 0.4	66.8 ± 7.4	0.009	79 ± 100	0.851

characterized by a $Tb_{½}$ of 50 d, suggesting that the tracer was incorporated into an other compartment than the eggshell, i.e. the embryo.

For ^{134}Cs and ^{54}Mn, the depuration kinetics following 18 and 7 d of exposure were best described by a single exponential equation, respectively. A double exponential equation best fitted the loss kinetics after 7, 27 and 40 d of exposure to ^{134}Cs, following 17, 27 and 40 d of exposure to ^{54}Mn. and after 7, 18 27 and 40 d of exposure to ^{65}Zn.

After 7 d in contamination conditions, ^{134}Cs was equally bound to two fractions: 44 ± 8% of the tracer was bound to a short-lived component (0.3 d) and 56 ± 4% to a long-lived component (44 d). After 27 and 40 d of exposure, 32 and 33% were tightly bound to the long-lived component whereas 56 and 68% were depurated with short $Tb_{½}$.

Whether after 7, 17, 27 or 40 d of exposure, the greatest fraction of ^{54}Mn was lost from the eggs with close $Tb_{½}$, i.e. 19, 24, 21 and 29 d, respectively. Nevertheless, the proportion of this fraction decreased with increasing time of pre-exposure (88, 87, 83 and 70%, respectively), whereas the weakly bound fraction increased (13, 18 and 33% after 18, 27 and 40 d of exposure) suggesting a proportion change of the strong and weak binding sites available for the Mn, along the development time.

Whether after 7, 17, 27 or 40 d of exposure, a double exponential equation best fitted the loss kinetics of ^{65}Zn with the mainly part (59, 76, 74, and 68%, respectively) lost according to a long-lived component ($Tb_{½}$ values of 123, 56, 46 and 80 d, respectively). This result suggests that similar processes were involved in the ^{65}Zn depuration or retention processes all along the egg development time.

Discussion

Cuttlefish eggs show great structural modifications throughout a relative short development span (i.e. 50 days at 17°C). First, as shown in Figure 1, the egg weight varied greatly with value 4 fold higher at the end of development than this at day 11 when it reached its minimum. The organogenesis of the embryo occurred from the spawning time to days 25-28. From this moment onwards, the embryo started an exponential growth period, which went with an increase of the peri-vitellin fluid volume due to a water intake. At the same time, the vitellus is digested to supply the needs of the embryo for its growth. Thus, in order to take into account the weight variations due to vitellus reduction, embryo growth and incorporation of water during the development, the bioaccumulation of the elements in this study was

expressed in terms of metallic content in the whole egg and its different compartments (eggshell, embryo, vitellus, and peri-vitellin fluid).

During the embryonic development, ^{241}Am, ^{57}Co, ^{134}Cs, ^{54}Mn and ^{65}Zn were efficiently taken up from seawater by the eggs. Load concentration factors (LCR) determined at the end of the development varied between the trace elements with ^{241}Am > Co ≈ Zn > Mn >> Cs. This is very different from preliminary results obtained with the same radiotracers for the last two weeks of the egg development, in which concentration factor determined at steady-state saturation decreased in the order Zn > Co > ^{241}Am >> Cs (Bustamante et al., 2002, 2004, 2006b). In our study, the five radiotracers used showed three different uptake behaviours towards the whole eggs: (i) ^{241}Am, ^{57}Co and ^{65}Zn accumulated following a power model in the egg all along the development time; (ii) after one month, ^{54}Mn reached a steady-state equilibrium until a few hours before hatching, and (iii) the uptake kinetic of ^{134}Cs followed the same pattern that this of egg weight (see Figure 3). The constant rising accumulation of ^{241}Am, ^{57}Co and ^{65}Zn in the whole eggs suggest that their egg binding sites were not saturated at the end of the development. In similar conditions, exposure to dissolved ^{110m}Ag has also shown an efficient metal accumulation in the egg but with a sudden increase after one month of development when the eggs began to swell (Lacoue-Labarthe et al., Chap.I.1). In contrast to ^{110m}Ag, it seems that ^{241}Am, ^{57}Co and ^{65}Zn uptake were not modified by the changes in the developmental physiology occurring throughout the embryonic life.

When considering the different egg compartments, the greatest amount of uptaked ^{241}Am, ^{57}Co and ^{65}Zn remained associated with the eggshell all along the development time. Moreover, the not significantly different power coefficients were found to characterize the uptake kinetics in both the whole egg and the eggshell (Figures 2 & 4). This result strongly suggests that the mechanisms involved in the uptake of ^{241}Am, ^{57}Co and ^{65}Zn in the whole egg are those that govern metal bioaccumulation in the eggshell. Dogfish eggs were also found to efficiently accumulate ^{241}Am, ^{57}Co and ^{65}Zn which bound to the collagen and glycosaminoglycans of the eggshell (Jeffree et al., 2006). In cephalopods, the nidamental secretions contain high proportion of glycine, threonine proline and isoleucine (Kimura et al. (2004). It is thus likely that ^{241}Am, Co and Zn could bind to and be retained on these rich-carboxyl groups of the eggshell mucopolysaccharides (e.g. Miramand et al., 1989, Passow, 2002). Zn is also well-known for its affinity for the SH groups (Wedemeyer, 1968, Viarengo and Nott, 1993) and might bound to those of the rich-mucine egg surface layers (Kimura et al., 2004). Indeed, Zn loss kinetics after 7 and 17 d in contamination conditions revealed that a fraction of the metal, which was exclusively detected in the eggshell (Table 1), was strongly

retained ($Tb_{½}$ = 123 and 56 d, respectively), i.e. potentially bound to sulphydril-groups whereas an other fraction of the metal was rapidly lost ($Tb_{½}$: 5 and 1 d, respectively). Therefore, the eggshell would act as a protective barrier limiting/hindering the incorporation of waterborne metals into the embryo, as previously suggested for other metals and radionuclides (Miramand et al., 2006, Villanueva and Bustamante, 2006).

The distribution of ^{241}Am, ^{57}Co and ^{65}Zn among the different egg compartment revealed that their accumulation in the embryo varied widely between the radiotracers. Indeed, ^{241}Am did not passed through the eggshell all along the development time, whereas ^{57}Co and ^{65}Zn were increasingly detected in the embryo during the last 20 days. This indicates that the protective role of the eggshell may be limited to some extent for Co and Zn in contrast to ^{241}Am.

^{241}Am was only associated with the eggshell all along the development time and did not accumulated in the internal compartments. Its depuration kinetics followed a single compartment model whatever the length of the exposure occurred besides after a 27 d exposure for which the weakly ^{241}Am fraction was very low (8%). This indicates that Am was simply bound to one compartment, i.e. the eggshell. Moreover, its biological half-life decreased with increasing duration of pre-exposure (Table 2) allowing the assumption that ^{241}Am retention capacity decreased as the eggshell undergoes structural and chemical modifications throughout the development.

The power coefficient specific to the ^{65}Zn uptake kinetic in the whole egg was slightly higher than this in the eggshell, which is consistent with the accumulation of Zn in the embryo since one month of development. Consequently, 20% of the total egg burden of Zn was found in the embryo a few hours before hatching (Table 1). The essential character of Zn could explain its accumulation in the embryo. As well as for Zn, Paulij et al. (1980) suggested a penetration of the essential Cu into the cuttlefish egg in late developmental stages. Zn is known to be incorporated into numerous constituents of the cell-like enzymes (Vallee and Auld, 1990). Using ^{65}Zn, it has been shown that Zn could be maternally transferred from the female cuttlefish to the offspring (Lacoue-Labarthe et al., Chap.III). Zn was incorporated in the vitellus during oogenesis (Falchuk and Montorzi, 2001). Nevertheless, since they have been hatched, young cuttlefish greatly bioaccumulate Zn with strong retention *via* dissolved and dietary exposures to fulfil their metabolic demands (Bustamante et al., 2002, Miramand et al., 2006). This suggests that embryo have important Zn needs during the last embryonic stages and, thus, that the available Zn for embryos, which is limited by the amount incorporated in the vitellus and the permeability of the eggshell, supplied only a part of these needs. It is

therefore not surprising that the accumulated Zn in the embryo was strongly retained ($Tb_{½}$ of around 80 d after 40 d of exposure to ^{65}Zn) during the last days of development.

Co, which is an essential element known to be stored in branchial hearts and digestive gland of octopus and cuttlefish following seawater exposure to the metal (Nakahara et al., 1979, Bustamante et al., 2004) also passed through the eggshell. Nevertheless, Co penetration is more limited compared to Zn, with only 3% of the total ^{57}Co amount reached the embryo a few hours before hatching. In depuration conditions, the half-life of ^{57}Co decreased when the depuration period started later in the egg development suggesting that the eggshell affinity for Co changed with the development time. After 40 d of exposure, ^{57}Co was lost according to a 2-compartment model, which suggests the involvement of high and low affinity-binding sites ($T_{b½}$ = 50 *vs.* 1.7 d) while the metal was found in both the eggshell and the embryo. A similar behaviour was revealed with ^{109}Cd, the embryo accumulation accounted for 4% of the total tracer load at the end of the egg development (Lacoue-Labarthe et al., Chap.I.1). This highlights that the protective role of the eggshell against Cd decreased during the last embryonic stages.

Overall, ^{241}Am, ^{57}Co and ^{65}Zn bioaccumulation indicated that the protective role of the eggshell was element- and time-dependant with late developmental stages being more permeable to these elements. The selective penetration of these elements seems not to be determined by their essential or non-essential character according to previous results concerning the Cd accumulation. Nevertheless, the level of the physiological needs of the embryo could explain that Zn was much more accumulated than Co. At last, the size of the atom could be implied in the element-specific accumulation through the eggshell. Indeed, Am has a higher atomic radius (175 pm) compared to Co and Zn (135 pm).

^{54}Mn uptake kinetic in the eggshell reached the saturation with an estimated LCR lower than this determined in the whole egg. This could be due to the accumulation of this metal in the embryo after one month of development. Indeed, at day 50, 7% of the total ^{54}Mn was detected in the embryo. This observation is consistent with previous results showing that Mn content in fish embryo increased after fertilization indicating its accumulation from the surrounding water (Michibata and Hori, 1979). Indeed, Mn is an essential co-factor for enzymes such as Mn-SOD or respiratory enzymes (Barceloux, 1999, Hernroth et al., 2004). Mn accumulation in cuttlefish embryos could therefore be linked with the predominantly aerobic respiration used to meet their energy requirement (Wolf et al., 1985) from the developmental stage 27 according to Lemaire (1970) from one month of development.

The eggshell Mn-binding capacity was rather limited with time, whereas it has been demonstrated that Mn, which belongs to the same class of Co, has similar uptake properties to this latter (Adam et al., 2001). During the experiment, ^{54}Mn was detected in the eggshell inner layers (data not shown) originally secreted by the oviductal gland (Boletzky, 1986). In the squid *Todarodes pacificus*, the chemical composition of oviductal mucosubstance differed from those of the nidamental gland (Kimura et al., 2004), suggesting that specific Mn-binding sites could occur in the inner layers and were not altered by the eggshell polymerization and delaminating of the outer layers.

Regarding ^{134}Cs, uptake kinetic in the whole egg was closely similar to the egg weight kinetic all along the development time. Indeed, cuttlefish egg weight variation is mainly due to the water inputs/outputs. Once the egg was spawned, the gelatinous eggshell hardened when coming into contact with seawater, leading a polymerization of the mucopolysaccharide compounds and, therefore, a loss of water (Boletzky, 1986). When the eggs were placed in depuration conditions after 7 d exposure, the ^{134}Cs loss kinetic showed a two compartments model supporting the idea that, in the incompletely polymerized eggshell, a fraction of ^{134}Cs is trapped in the mucosubstance ($Tb_{½}$: 44 d) whereas an other is slightly adsorbed ($Tb_{½}$: 0.3 d). Then, from 10 d, the eggshell transformation is completed according to the minimal LCR value of ^{134}Cs at this time. From the 20th d of embryonic life, a water intake in the peri-vitellin space induced an egg swelling (Gomi et al., 1986) and, therefore, an increase of the ^{134}Cs accumulation. The one-compartment loss kinetic after 18 d of exposure agree with the assumption that ^{134}Cs was only bound the hardened eggshell between the day 10 and 20, whereas the two-compartment model determined after 27 and 40 d of exposure suggest that it was taken up by the internal egg compartment such as embryo and/or peri-vitellin fluid (see Table 1). Indeed, ^{134}Cs can act as an analogue of potassium (Ke et al., 2000, Bustamante et al., 2006a) which could lead to an active accumulation in the growing embryo explaining the long biological half-life of the tightly bound fraction (98 and 27 d after 27 and 40 d of exposure, respectively). From the day 43, the dramatic ^{134}Cs uptake decrease could be simply explained by the lack of radiotracer in the experimental medium. This unwanted depuration condition confirms that the mainly part of ^{134}Cs was rapidly lost according to the depuration kinetic after 40 d of exposure. Moreover, the tracer distribution showed that the short-lived component of the kinetic was the ^{134}Cs fraction found in the peri-vitellin fluid, which decreased between day 33 and day 50. This highlights the rapid water exchanges occurring between the internal compartments and the surrounding water in the last embryonic stages.

In summary, the eggshell acts as an efficient shield protecting the embryo against direct metal exposure at least during the first month of development. This could be an important advantage for organisms that live and reproduce in coastal waters, which are often heavily contaminated by trace elements. Nevertheless, the eggshell membrane shielding capacities appeared to be limited for essential elements such as ^{57}Co, ^{54}Mn and ^{65}Zn and for ^{134}Cs due to increasing permeability from the 30th day of development onwards.

Overall, the chemical properties of contaminants did not seem sufficient to explain the different uptake kinetics patterns observed in this study. It is noteworthy that ^{134}Cs accumulated greatly in the embryo whereas it is the biggest atom (atomic radius: 260 pm). Further studies should be therefore carried out to assess the influence of physiological and/or biological processes in these contrasting accumulation behaviours, during the embryonic life. For example, the eggshell oviductal mucosubstance has a role in the formation of the peri-vitellin space in fertilized eggs (Ikeda et al., 1993). According to Gomi et al. (1986) result's, this allows the assumption that egg swelling is due to organic matter transfer from the eggshell to the peri-vitellin fluid *via* the chorion leading a water intake by osmotic pressure. This shows that a close relationship between the embryo and the eggshell do exist. Moreover, it is noteworthy that bacteria are transferred from the accessory nidamental gland to the eggshell where they might have a protective antimicrobial function (Barbieri et al., 1997). These symbiotic organisms could therefore be implicated in the trace elements diffusion / retention mechanisms.

ACKNOWLEDGMENT: Authors are grateful to M. Metian (IAEA-MEL) for skilful assistance during the experiments. MW is an Honorary Senior Research Associate of the National Fund for Scientific Research (NFSR, Belgium). The IAEA is grateful for the support provided to its Marine Environment Laboratories by the Government of the Principality of Monaco. This work was financially supported by the IAEA and the CRELA (University of La Rochelle).

Partie 3. Comportements contrastés de bioaccumulation de Ag et Cd pendant le développement embryonnaire de la seiche commune *Sepia officinalis*

Résumé: des oeufs de seiches ont été exposés à des concentrations naturelles d'Ag et de Cd grâce à l'utilisation des radiotraceurs ^{110m}Ag et ^{109}Cd. Quelques oeufs ont ensuite été placés en condition de dépuration à différents temps du développement. L'ensemble de ces expérimentations ont permis de déterminer les cinétiques d'accumulation et de perte ainsi que la distribution des éléments dans les différents compartiments de l'oeuf, i.e. la capsule, le vitellus, le liquide péri-vitellin et l'embryon. En parallèle, des expérimentations utilisant de l'Ag et Cd stables en concentrations sub-létales (2 et 1 µg.l^{-1}, respectivement) ont été menées afin de comparer les comportements des métaux à des niveaux d'exposition plus élevés. Pendant le premier mois de développement, les deux métaux sont efficacement accumulés par les oeufs, atteignant un ratio quantité / concentration (LCR) de 1059 ± 75 et 239 ± 22 pour ^{110m}Ag et ^{109}Cd, respectivement. À partir de ce stade, l'activité ^{110m}Ag continue d'augmenter dans les oeufs alors que la cinétique du ^{109}Cd montre une décroissance significative. Quel que soit le stade de développement, le Cd reste principalement associé à la capsule. De plus, les concentrations en Cd stable et le LCR du ^{109}Cd reste faible dans l'embryon pendant toute la durée du développement indiquant que la capsule joue le rôle d'une barrière contre la pénétration des métaux. En revanche, ^{110m}Ag passe à travers la capsule à partir du 30^{e} jour de développement et s'accumule dans l'embryon. À la fin du développement, ce dernier contient plus de 40% de la quantité totale de ^{110m}Ag présent dans l'oeuf. En condition de dépuration, il est remarquable que l'Ag continue de s'accumuler dans l'embryon mettant en évidence une translocation de l'élément de la capsule vers l'embryon. Globalement, nos résultats montrent qu'à partir du 30^{e} jour de développement, la capsule devient perméable à l'Ag mais pas au Cd. L'exposition aux métaux stables confirme les capacités de saturation de la capsule pour le Cd et la capacité de pénétration de l'Ag.

Mots-clés**:** cadmium, argent, biocinétiques, embryon, capsule, perméabilité, céphalopode.

Differential bioaccumulation behaviour of Ag and Cd during the early development of the cuttlefish *Sepia officinalis*

Lacoue-Labarthe T.[1], Warnau M.[2], Oberhänsli F.[2], Teyssié J.-L.[2], Koueta N.[3], Bustamante P.[1]

1- Centre de Recherche sur les Ecosystèmes Littoraux Anthropisés, UMR 6217, CNRS-IFREMER-Université de La Rochelle, 22 avenue Michel Crépeau, F-17042 La Rochelle Cedex 01, France

2- International Atomic Energy Agency – Marine Environment Laboratories, 4 Quai Antoine Ier, MC-98000 Principality of Monaco

3- Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, UMR 100, IFREMER-Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex 05, France

Correspondence to: P. Bustamante
CRELA
UMR 6217
CNRS-IFREMER-Université de La Rochelle,
22 avenue Michel Crépeau
F-17042 La Rochelle Cedex 01, France
Phone: +33 5 46 50 02 94
Fax: +33 5 46 45 82 64
E-mail: pbustama@univ-lr.fr

Abstract: Cuttlefish eggs were exposed to background concentrations of dissolved Ag and Cd, using the radiotracers ^{110m}Ag and ^{109}Cd, then placed in non contaminating conditions at different time during the embryonic development (50 days) in order to assess the uptake and depuration kinetics and distribution of these metals among the egg compartments (i.e. eggshell, vitellus, peri-vitellin fluid and embryo). In parallel, experiments were conducted with sub-lethal concentrations of stable Ag and Cd (2 and 1 μg l^{-1}, respectively) to compare the metal behaviour at higher concentrations. From the spawning date up to 1 month of development, both metals were taken up efficiently by the eggs, reaching load/concentration ratio (LCR) of 1059 ± 75 and 239 ± 22 for ^{110m}Ag and ^{109}Cd, respectively. From this time onwards, ^{110m}Ag activity continued to increase in eggs, whereas ^{109}Cd kinetics displayed a significant decrease. Whatever the development stage, Cd was mainly associated with the eggshell all along the exposure experiment. In addition, both stable Cd concentrations and ^{109}Cd LCR remained low in the embryo all along the embryonic development, indicating that the eggshell acted as an efficient shield against the penetration of this metal. In contrast, ^{110m}Ag passed through the eggshell from day 30 onwards and was then accumulated in the embryo, which contained more than 40% of the whole egg metal burden at the end of the exposure period. In depuration conditions, it is noteworthy that Ag continued to accumulate in the embryo indicating translocation processes from the eggshell and a high affinity of the metal for the embryo tissues. Overall our results showed that at day 30 of the embryonic development the cuttlefish eggshell becomes permeable to Ag but not to Cd. Exposure to stable metals confirmed the saturation capacities of the eggshell for Cd and the Ag penetration properties.

Keywords: cadmium, silver, biokinetics, embryo, eggshell, permeability, cephalopod

Introduction

Metal enrichment of coastal waters mainly originates from river inputs (Chiffoleau et al., 1994). Particularly, discharges of silver (Ag) and cadmium (Cd) are due to the flow of residual contamination from catchment areas but also to indirect and direct industrial releases (Luoma et al., 1995, Purcell and Peters, 1998, Boutier et al., 2000). Both metals are highly toxic, especially towards early development stages of marine invertebrates (Calabrese and Nelson, 1974, Warnau et al., 1996).

The common cuttlefish *Sepia officinalis* lives offshore during the winter season and makes long reproductive migrations in spring to mate and to spawn in the coastal zone (Boucaud-Camou and Boismery, 1991). The eggs laid in shallow waters are thus subject to chronic exposure to various contaminants among which heavy metals released by the rivers. As eggs are fixed on hard substrata, Ag and Cd exposure can occur during the whole embryonic development as well as during the juvenile stage until the new cohort leaves the coastal waters towards the offshore zone. Despite the related potential risk, very little is known on Ag and Cd accumulation and toxicity either on cuttlefish embryos or on juveniles.

A preliminary study on early development stages exposed to elevated Cd concentrations (i.e. 200-800 $\mu g\ l^{-1}$) showed that the inhibition of hatching success increased when the age of the exposed development stages decreased (Establier and Pascual, 1983). On the other hand, radiotracer experiments using background metal concentrations showed that, during the last 11 days of egg development, Cd remained associated with the eggshell whereas Ag accumulated in the embryo (Bustamante et al., 2002, 2004). Finally, analysis of several metals in eggs collected from the field showed that metal distribution between eggshell and embryo was dependent on the element considered (Miramand et al., 2006).

Prior to egg spawning, the oocyte is surrounded by a gelatinous envelope secreted by the maternal oviductal gland, then a second multi-layered encapsulation is achieved through secretions of the nidamental glands (Jecklin, 1934, Zatylny et al., 2002). Once in contact with seawater, the soft eggshell undergoes a polymerization of its main components (glycoproteins, mucins, mucopolysaccaharids) due to change in pH (Boletzky, 1986, Boletzky, 1998, Miramand et al., 2006). Hence, the eggshell provides a physical barrier between the embryo microenvironment and the surrounding water (Boletzky, 2003). Later, as the embryo grows the eggshell becomes thinner and permeable to seawater, which allows the supply of the various ions and respiratory gas required by the embryo (Boletzky, 1983, Wolf et al., 1985).

In this context, the aim of this study was to investigate the behaviour of Ag and Cd towards cuttlefish eggs chronically exposed to these metals dissolved in seawater from spawning to hatching. Gamma-emitting radiotracers, ^{110m}Ag and ^{109}Cd, were used to describe the uptake and loss kinetics of both metals at background concentrations and to determine the permeability changes according to the development stages. Additionnally, cuttlefish eggs were exposed to the stable isotope of both elements in experimental rearing conditions to compare their behaviour at higher concentrations.

Materials and methods

1. Organisms, radiotracers and experimental procedure

Adult cuttlefish were collected by net fishing off Monaco in March and April 2006. They were acclimated and maintained in open-circuit tanks in the IAEA-MEL premises. After mating, the eggs layed by a single female were immediately separated to optimise their oxygenation and used for the experiments. The eggs (n = 310) were placed for up to 50 d in a 20-l glass aquarium containing natural seawater (constantly aerated closed circuit; temperature 17°C; 37 p.s.u.; light/dark cycle 12h/12h) spiked with ^{110m}Ag (1.0 kBq l^{-1}) and ^{109}Cd (2.0 kBq l^{-1}).

Radiotracers, ^{110m}Ag [as $^{110m}AgNO_3$; $t_{½}$ = 250.4 d] and ^{109}Cd [as $^{109}CdCl_2$; $t_{½}$ = 462.6 d], were purchased from Amersham, UK. Stock solutions were prepared in 0.1 N nitric acid and 0.1 N chloridric acid for ^{110m}Ag and ^{109}Cd, respectively, to obtain radioactivities allowing the use of spikes of only a few microliters (typically 5 µl).

Radiotracers and seawater were renewed daily during the first week and then every second day to maintain water quality and radiotracer concentrations constant. Radiotracer activities in seawater were checked before and after each water renewal in order to determine the time-integrated radiotracer activities (Warnau et al., 1999). At different time intervals, ^{110m}Ag and ^{109}Cd activities were counted in the same tag-identified eggs (n = 8) all along the experiment. In addition, at each counting time, 4 eggs were counted and dissected to determine the radiotracer distribution among the eggshell, vitellus, embryo and perivitellin fluid.

After 7, 18, 27, and 40 days of exposure, part of the eggs (n = 70, 60, 50, 40, respectively) were removed from the exposure aquarium and held in a 70-l glass aquarium supplied with clean flowing seawater (open circuit with constant aeration; seawater flux 50 l h^{-1}; temperature 17°C; 37 p.s.u.; light/dark cycle 12h/12h). Eight additional unexposed eggs were distinctly tagged and placed in the same aquarium and used as control for possible ^{110m}Ag and

^{109}Cd recycling via seawater. At different time intervals during the depuration period, the same tag-identified eggs (n = 8) were counted to establish the depuration kinetics of the radiotracers. At the end of the depuration period, the radiotracer distribution among the different egg compartments was determined by dissection of 4 eggs.

2. Radioanalyses and data treatment

Radioctivities were measured using a high-resolution γ-spectrometry system consisting of four coaxial Germanium (N- or P-type) detectors (EGNC 33-195-R, Canberra® and Eurysis®) connected to a multi-channel analyzer and a computer equipped with a spectra analysis software (Interwinner® 6). The detectors were calibrated with an appropriate standard for each counting geometry used and measurements were corrected for background and physical decay of the radiotracers. Counting times were adapted to obtain relative propagated errors less than 5%. They ranged from 10 min to 30 min for whole eggs and from 10 min to 24h for the dissected tissues.

Uptake of ^{110m}Ag and ^{109}Cd was expressed as change in load/concentration ratio (LCR; ratio between radiotracer content in the egg or egg compartment –Bq– and time-integrated activity in seawater –Bq g^{-1}) along time. Whole radioactivity content in eggs or in their compartments was considered in order to take into account the weight variations of whole eggs and egg compartments due to vitellus reduction, embryo growth and incorporation of water during the development. Uptake kinetics were best described by using either a linear regression (Eq. 1), a saturation exponential equation (Eq. 2), a combined equation (logistic plus exponential) (Eq. 3), or a power equation (Eq. 4):

$$LCR_t = k_u\, t + LCR_0 \qquad \text{(Eq. 1)}$$

$$LCR_t = LCR_{ss}\,(1-e^{-k_e\, t}) \qquad \text{(Eq. 2)}$$

$$LCR_t = LCR_{ss}(1-e^{-k_e\, t}) \,/\, (1+e^{-k_e(t-I)}) \qquad \text{(Eq. 3)}$$

$$LCR_t = A\, t^{k_e} \qquad \text{(Eq. 4)}$$

where LCR_t and LCR_{ss} (g) are load/concentration ratios at time t (d) and at steady-state, respectively, k_e and k_u are the biological depuration and uptake rate constants (d^{-1}), respectively (Whicker and Schultz, 1982) and LCR_0, *I* and A are constants.

Constants (and their statistics) of the best fitting equations (decision based on ANOVA tables for two fitted model objects) were estimated by iterative adjustment of the models using the *nls* curve-fitting routine in R freeware.

Radiotracer depuration kinetics were expressed in terms of change of percentage of remaining activity (i.e., radioactivity at time t divided by initial radioactivity measured in the egg or in the compartment at the beginning of the depuration period * 100) along with time.

The depuration kinetics were best fitted by either a single (Eq. 5) or a double exponential equation (Eq. 6):

$$A_t = A_0 e^{-ke\, t} \quad \text{(Eq. 5)}$$

$$A_t = A_{0s} e^{-kes\, t} + A_{0l} e^{-kel\, t} \quad \text{(Eq. 6)}$$

where A_t and A_0 are the remaining activities (%) at time t (d) and 0, respectively, k_e is the biological depuration rate constant (d^{-1}), and « s » and « l » subscripts refer to the short- and long-lived component of the depuration kinetics (Warnau et al., 1999). The determination of k_e allows the calculation of the radiotracer biological half-life ($Tb_{1/2} = \ln 2 / k_e$).

3. Exposure to stable metals

The cuttlefish eggs were collected on pots from the west coast of Cotentin, France by local fishermen. Because pots were picked up every day, sampled eggs were layed in the previous 24h. In the laboratory, eggs were separated for optimal oxygenation and placed into floating sieves in a rearing structure as described by (Koueta and Boucaud-Camou, 1999). Few days after the collection, 700 eggs were randomly placed in each out of the 9 tanks containing 11 l seawater (constantly aerated closed circuit; temperature 17°C; 34 p.s.u.; light/dark cycle 12h/12h).

Cuttlefish eggs were then exposed to Ag (2 μg l^{-1} added as $AgCl_2$) and Cd (1 μg l^{-1} added as $CdCl_2$) all along their development (50 d). Metals and seawater were renewed daily to maintain water quality and metal concentration constant. At different time intervals, 2 eggs were collected from each tank to determine the metal concentrations in the different compartments (eggshell, vitellus, embryo, and perivitellin fluid). Eggs were weighed (wet wt), frozen in liquid nitrogen, and stored at -20°C before further analyses.

After the dissections, each separated egg compartment was dried at 70°C for two days and weighed (dry wt). Dried samples were digested with 4 ml 65% ultrapur HNO_3 for several days at 100°C. After evaporation, the residues were dissolved in 2 ml of 0.3 N ultrapur HNO_3. Ag and Cd were determined by flame and furnace atomic absorption spectrophotometry using a Z-5000 Hitachi spectrophotometer with Zeeman background correction. Before use, all plastic- and glassware were cleaned overnight with a mixture of 0.45 N HNO_3 and 0.9 N HCl in milli-Ro quality water and rinsed with Milli-Q water. Blanks and a certified reference material (DOLT-3 CRM dogfish liver, NRCC) were treated and analysed in the same way as the samples. Results for the CRM were in good agreement with certified values (1.27 ± 0.01 *vs.* 1.20 ± 0.07 and 18.75 ± 0.31 *vs.* 19.40 ± 0.60 for Ag and Cd, respectively). Metal concentrations were expressed as $\mu g\ g^{-1}$ dry wt. Distribution percentages were also computed on a dry wt basis.

Results

3. Uptake kinetics in whole eggs

The uptake kinetics of ^{110m}Ag and ^{109}Cd in whole eggs all along the embryonic development are shown in Figures 1.A and 1.B. Uptake of both metals showed a two-phase kinetics. In the case of ^{110m}Ag, the uptake kinetics followed a power model with a coefficient of 0.83 from spawning time up to day 30 of the development. Then, Ag uptake kinetics followed a combined (saturation + logistic) model reaching an estimated LCR_{ss} of 1740 ± 354. Regarding ^{109}Cd, the first phase was also best fitted by a saturation exponential model until day 27, with a steady-state equilibrium (LCR_{ss} = 260 ± 12) reached after only 8 d of exposure. Then, LCR values decreased linearly between day 30 and the time of hatching although radiotracer concentration in the surrounding water remained constant.

2. Uptake kinetics in the different egg compartments

During the first month of the embryonic development, the ^{110m}Ag uptake kinetics in the eggshell displayed the same pattern than that of the whole eggs (Fig. 2.A), with the same power constant value (i.e., 0.83 ± 0.08 *vs.* 0.83 ± 0.06) although, at day 30, the LCR was significantly higher than that measured for whole eggs (i.e., 1726 ± 132 *vs.* 1059 ± 75). After day 30, the LCR decreased rapidly according to a single exponential equation, indicating that the radiotracer was no longer accumulated in the eggshell. At the same time, ^{110m}Ag was

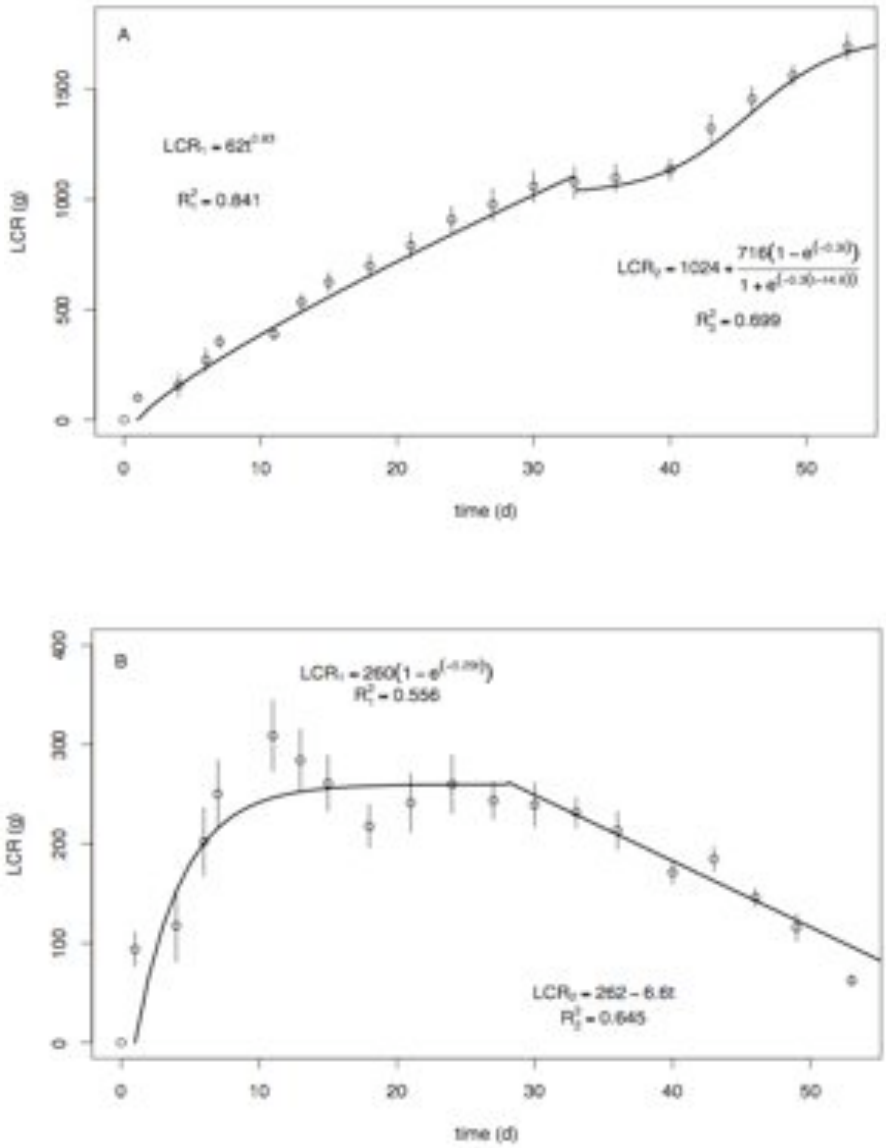

Fig. 1. *Sepia officinalis*. Whole-body uptake kinetics of ^{110m}Ag (A) and ^{109}Cd (B) in cuttlefish eggs exposed for the whole development time to the radiotracers dissolved in seawater (load-concentration ratio, LCR (g); mean ± SE, n=8).

accumulated in the embryo according to a combined (saturation + logistic) model, reaching an estimated LCR_{ss} of 1902 ± 141. Finally, the LCR reached at the end of the development in the embryo was significantly higher than in the eggshell (i.e. 1688 ± 74 *vs.* 1074± 57).

Accumulation of ^{110m}Ag in perivitellin fluid increased dramatically during the last 10 d of development, reaching, a few hours before hatching, a LCR value 12-fold higher than the LCR value at day 40 (Table 3), which probably resulted in allowing Ag to be accumulated by the embryo from the perivitellin fluid. Indeed, the LCR between the embryo and the

perivitellin fluid displayed a maximum value of 21.4 ± 2.8 at day 40 and then decreased until the end of the development period down to 7.5 ± 0.7.

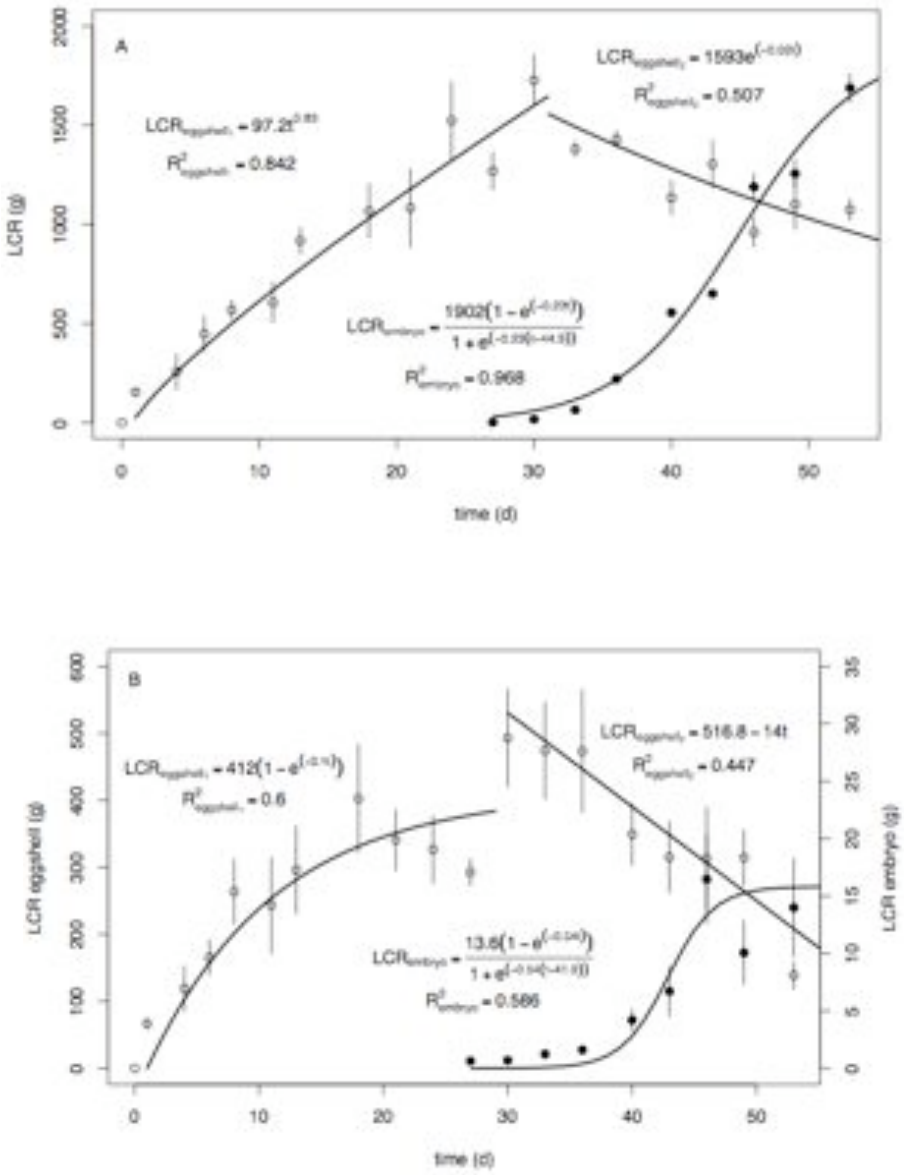

Fig. 2. *Sepia officinalis*. Eggshell (○) and embryo (●) uptake kinetics of ^{110m}Ag (A) and ^{109}Cd (B) in cuttlefish eggs exposed for the whole development time to the radiotracers dissolved in seawater (load-concentration ratio, LCR; mean ± SE, n=4).

The accumulation kinetics of ^{109}Cd in the eggshell (Fig. 2.B) displayed the same pattern as previously described for whole eggs. However, as for ^{110m}Ag, the estimated ^{109}Cd LCR_{ss} was higher in eggshell than in the whole egg at the end of the uptake phase (viz., 412 ±

49 *vs.* 260 ± 12). In contrast to ^{110m}Ag, the perivitellin fluid showed low ^{109}Cd LCR values during the last 20 d of the development, with a maximum reached at day 40 (5.8 ± 1.8; see Table 3).

For the embryo, ^{109}Cd LCR values followed a combined (saturation + logistic) uptake equation, with a steady-state equilibrium reached a few hours before hatching (LCR_{ss} = 14 ± 2, viz. one order of magnitude lower than in the eggshell). The ratio between the ^{109}Cd activity in the embryo and in perivitellin fluid was 10 times higher at day 50 than at day 40 (viz., 11.4 *vs.* 0.81), which indicates a marked change in metal behaviour towards the embryo at the end of the development period. Just before hatching, the ^{109}Cd uptake efficiency in the embryo was 120-fold lower than that of ^{110m}Ag.

The accumulation of ^{110m}Ag and ^{109}Cd in the vitellus remained very low during the first 30 d of development (data not shown). Then, LCR values increased progressively until reaching 70 ± 6 and 1.6 ± 0.6 for ^{110m}Ag and ^{109}Cd, respectively, in the outer yolk sac before its resorption by the inner yolk sac from day 46 onwards.

3. Depuration kinetics in whole eggs

The depuration kinetics following a 7-d and an 18-d exposure for both metals and also after a 27-d exposure for ^{109}Cd were best fitted using a single exponential equation (Table 1). In contrast, a double exponential model best described the depuration kinetics following a 27-d exposure for ^{110m}Ag and a 40-d exposure for both radiotracers (Table 1).

Whether after 7 or 18 d of exposure, ^{110m}Ag was lost from the eggs with a similar $Tb_{1/2}$ (i.e. 30 and 26 d), suggesting that similar processes governed its depuration at these stages. After a 27- or a 40-d exposure, 27 and 24% of the accumulated ^{110m}Ag was lost according to a short-lived component ($Tb_{1/2}$ < 3 d), whereas 83-86% were depurated according to a long-lived component, with a $Tb_{1/2}$ of 34 d (27-d exposure) or 76 d (40-d exposure).

The distribution of ^{110m}Ag among the different egg compartments varied between the beginning of the depuration period and the hatching. Indeed, radiotracer activity increased significantly in the embryo while it decreased in the eggshell (Table 2). After the 7-d, 18-d and 27-d exposures, respectively 13, 15 and 26% of the ^{110m}Ag initially contained in the eggshell was taken up by the embryo at the end of the development. After the 40-d exposure, 19% of ^{110m}Ag accumulated by the embryo during the last 10 d of development in clean seawater came from the eggshell, the vitellus and/or the perivitellin fluid.

Table 1. *Sepia officinalis*. Parameters of the equations describing the loss kinetics of ^{110m}Ag and ^{109}Cd in the whole cuttlefish eggs previously exposed to the radiotracers during (a) 7 days, (b) 18 days, (c) 27 days, (d) 40 days. O and T: one- and two-exponential depuration equations, respectively; *** and **: p-values < 0.001 and < 0.01, respectively.

Pathway	Model	A_{0s} (SE)	k_s	$T_{b½s}$ ± SE (d)	A_{0l} (SE)	k_l	$T_{b½l}$ ± SE (d)	R^2
(a) Loss in whole eggs after a 7-d exposure								
^{110m}Ag	O	74.4 (3.5) ***	0.023 ***	30 ± 4	-	-	-	0.821
^{109}Cd	O	98.7 (3.1) ***	0.030 ***	23 ± 2	-	-	-	0.933
(b) Loss in whole eggs after a 17-d exposure								
^{110m}Ag	O	97.6 (0.8) ***	0.026 ***	26 ± 1	-	-	-	0.949
^{109}Cd	O	93.3 (2.0) ***	0.041 ***	18 ± 1	-	-	-	0.825
(c) Loss in whole eggs after a 27-d exposure								
^{110m}Ag	T	27.0 (5.0) ***	0.286 ***	2.4 ± 0.6	71.8 (5.2) ***	0.021 ***	34 ± 6	0.959
^{109}Cd	O	96.5 (2.6) ***	0.062 ***	11 ± 1	-	-	-	0.824
(d) Loss in whole eggs after a 40-d exposure								
^{110m}Ag	T	23.7 (13.9)	0.431	1.6 ± 1.4	76.5 (14.2) ***	0.009	76 ± 135	0.755
^{109}Cd	T	82.5 (16.3) ***	0.453 **	1.5 ± 0.5	17.6 (16.7)	0.008	90 ± 996	0.926

Table 2. *Sepia officinalis*. Total radiotracer activities (Bq; mean ± SD; n=4) in the different compartments of eggs exposed to spiked seawater at the beginning (t_0) and at the end (t_f) of the development, the percentage of the remaining content and the percentage of translocated activity in the embryo from the eggshell (ratio between embryo activity at the end of development and eggshell activity at the beginning of the depuration period).

Experiment	Compartment	t_0	t_f	% remaining	Ratio embryo/eggshell (%)
(a) Loss after 7 days of exposure					
^{110m}Ag	Eggshell	302 ± 26	76.3 ± 10.6	25.2	13.6
	Embryo	-	41.2 ± 1.2	-	
	Vitellus	0.05 ± 0.00	-	-	
^{109}Cd	Eggshell	350 ± 22	119 ± 18	33.9	0.4
	Embryo	-	1.77 ± 0.44	-	
	Vitellus	0.42 ± 0.05	-	-	
(b) Loss after 18 days of exposure					
^{110m}Ag	Eggshell	552 ± 83	135 ± 30	24.5	15.1
	Embryo	-	83.4 ± 8.5	-	
	Vitellus	0.11 ± 0.03	-	-	
^{109}Cd	Eggshell	535 ± 125	270 ± 50	50.4	0.9
	Embryo	-	4.82 ± 1.39	-	
	Vitellus	0.59 ± 0.29	-	-	
(c) Loss after 27 days of exposure					
^{110m}Ag	Eggshell	714 ± 55	107 ± 14	14.9	26.0
	Embryo	1.51 ± 0.33	186 ± 7.9	-	
	Vitellus	1.14 ± 0.43	-	-	
	Perivitellin fluid	0.86 ± 0.20	0.69 ± 0.00	-	
^{109}Cd	Eggshell	418 ± 30	189 ± 45	45.2	1.0
	Embryo	0.91 ± 0.51	5.23 ± 1.24	-	
	Vitellus	0.25 ± 0.05	-	-	
	Perivitellin fluid	1.85 ± 1.01	-		
(d) Loss after 40 days of exposure					
^{110m}Ag	Eggshell	707 ± 56	330 ± 75.82	46.7	18.7
	Embryo	347 ± 14	486 ± 28.95		
	Vitellus	28.6 ± 8.3			
	Perivitellin fluid	13.8 ± 3.1	5.8 ± 1.8		
^{109}Cd	Eggshell	552 ± 47	279 ± 26	50.5	0.7
	Embryo	6.22 ± 3.04	13.52 ± 2.57		
	Vitellus	3.60 ± 0.80			
	Perivitellin fluid	8.31 ± 3.01	2.01 ± 0.42		

The retention capacity of ^{109}Cd in eggs decreased with increasing duration of egg pre-exposure ($Tb_{1/2}$ was 23, 19 and 11 d after a 7-, 18- and 27-d exposure, respectively). Regarding the 40-d exposure, a part (18%) of the ^{109}Cd was lost slowly ($Tb_{1/2l}$: 90 d); however most of the metal (82%) was rapidly lost according to a short-lived component characterized by a $Tb_{1/2l}$ of 1.5 d.

Under depuration conditions, the distribution of ^{109}Cd decreased significantly in the eggshell (Table 2). In contrast to ^{110m}Ag, the proportion of ^{109}Cd in the embryo, the vitellus and the perivitellin fluid did not increase significantly with time, which suggests a low redistribution of the radiotracer from the eggshell to the internal compartments.

4. Uptake and distribution of stable Ag and Cd

When eggs were exposed to elevated concentrations of the stable metals, results were somewhat different from those obtained from the radiotracer experiments. Indeed, the bioaccumulation kinetics of both stable metals were characterized by a continuous positive exponential equation that depart from the two-phase kinetics found for ^{110m}Ag and ^{109}Cd (Fig. 3).

Uptake of both metal reached saturation in the eggshell after 25 d for Ag and 40 d for Cd. This compartment contained total metal load of 0.158 ± 0.013 μg of Ag and 0.226 ± 0.026 μg of Cd at steady-state equilibrium. The LCR ratio between metal contents in the eggshell and seawater was 79 and 226 for Ag and Cd, respectively (i.e., 20 and 2 fold lower than in the previous experiments using background Ag and Cd concentrations, respectively).

As in radiotracer experiments, Ag was efficiently taken up by the embryos and increased according to a combined (saturation + logistic) model, reaching a final content value of 0.095 ± 0.023 μg embryo^{-1}, whereas Cd did not accumulate significantly in the internal compartments of the egg (Fig. 3).

The highest proportion of both metals was associated with the eggshell (Fig. 4). Nevertheless, the relative proportion of eggshell-bound Ag decreased consistently with the increase in Ag relative contents in embryo. At the end of the exposure period, i.e. just before hatching, 40% of total Ag burden was found in the embryo and 10% in its surrounding perivitellin fluid. Moreover, during the last 20 d of development, the stable Ag concentrations in the perivitellin fluid were significantly higher for eggs exposed to dissolved Ag than for the controls ($p < 0.002$) (Table 3). Regarding Cd, distribution results showed that it remained mainly associated with the eggshell all along the embryonic development (Fig.4).

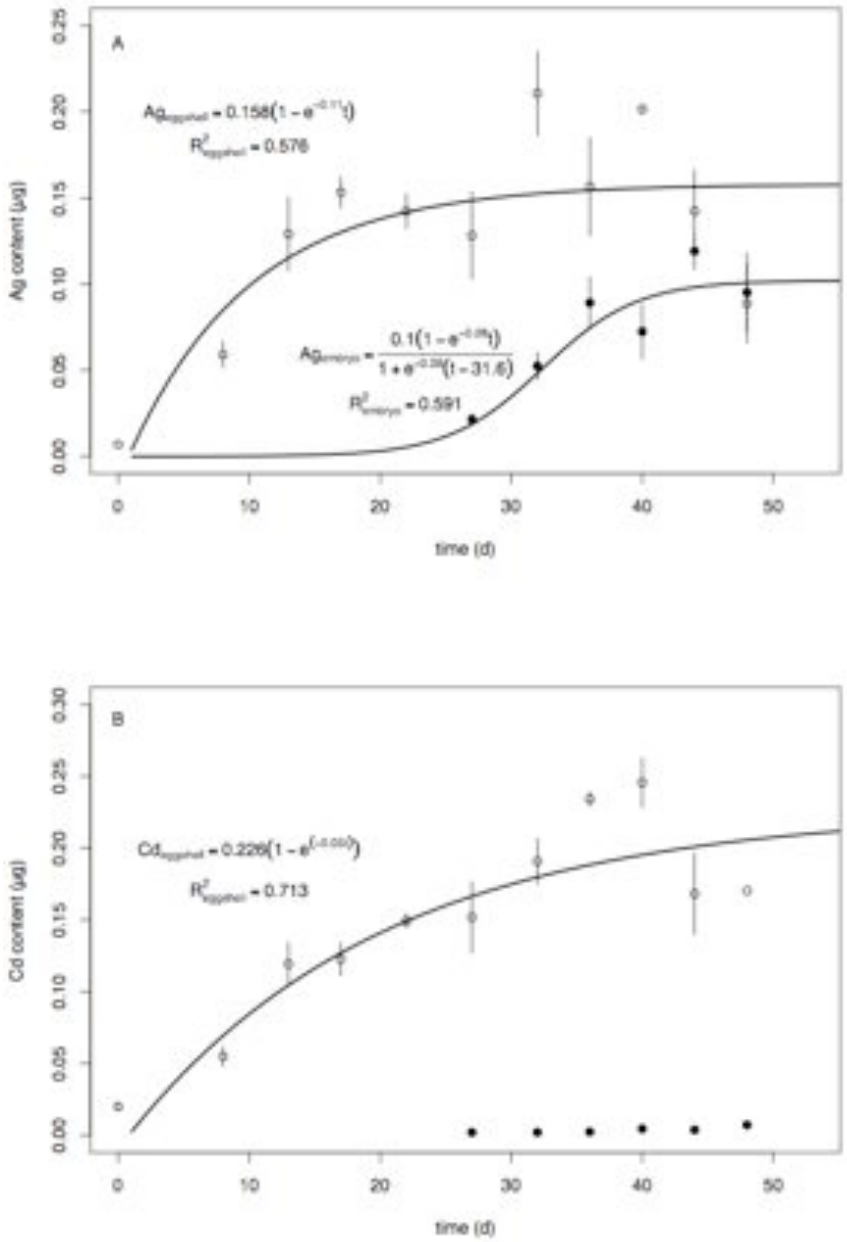

Fig. 3. *Sepia officinalis*. Stable Ag (A) and Cd (B) content (µg; mean ± SE, n=6) during the whole development time in the eggshell (○) and the embryo (●) of cuttlefish eggs exposed to 2 µg l^{-1} and 1 µg l^{-1} of dissolved Ag and Cd, respectively.

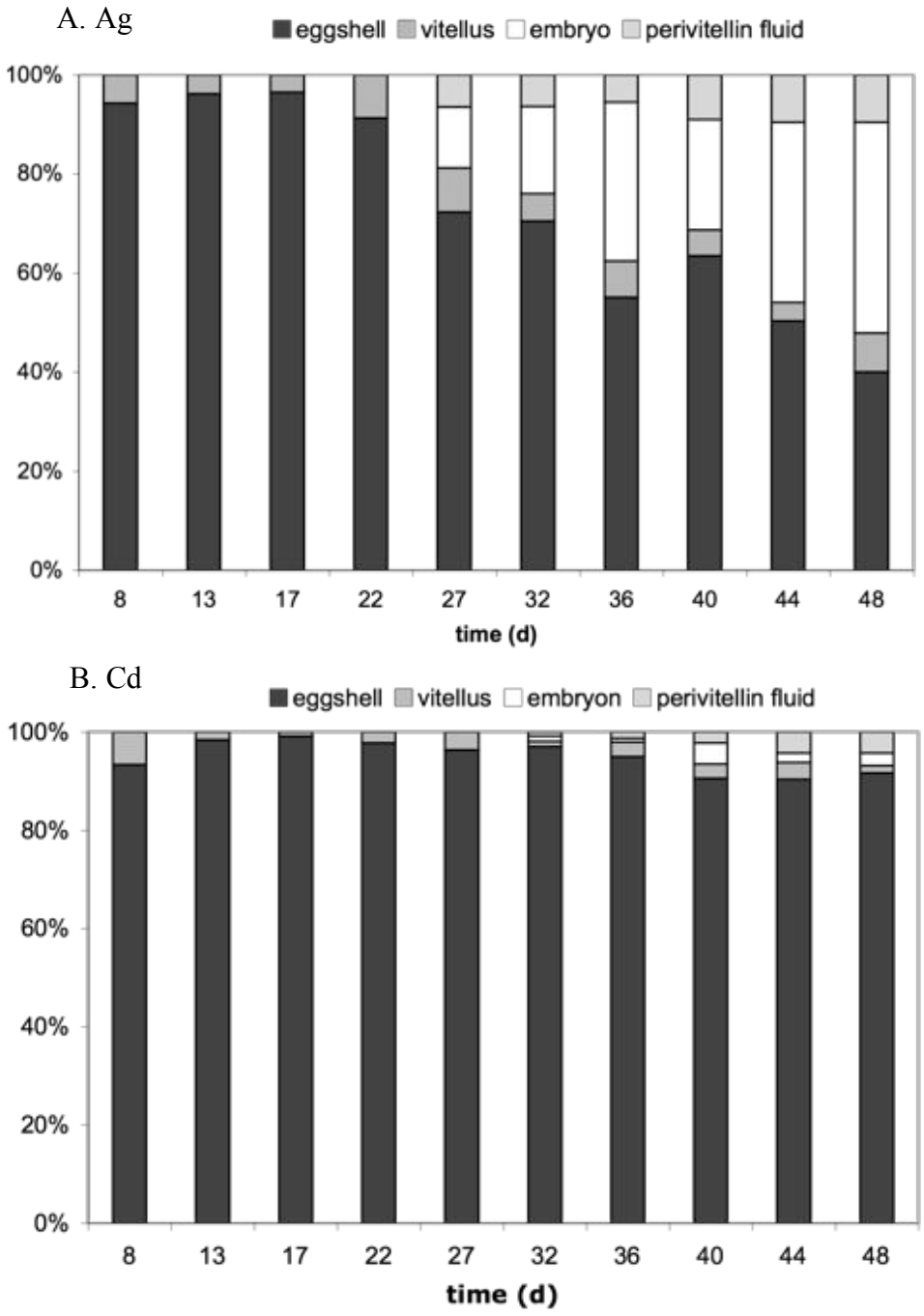

Fig. 4. *Sepia officinalis*. Distribution (%; mean values) of Ag (A) and Cd (B) among the cuttlefish egg compartments at different times of the development during seawater exposure experiments.

Table 3. *Sepia officinalis*. (A) ^{110m}Ag and ^{109}Cd uptake expressed as LCR (mean ± SD, n=4) at day 32, 40 and at the end of the embryonic development (ca. 50 d), (1) between perivitellin fluid (PVF; Bq) and seawater (SW; Bq ml^{-1}) and (2) between embryo (Bq) and PVF (Bq ml^{-1}). (B) Stable Ag and Cd concentrations (μg l^{-1} ; mean ± SD, n=3) in the PVF of control and exposed eggs (2 and 1 μg l^{-1} of dissolved Ag and Cd, respectively, in seawater) and LCR between PVF (μg ml^{-1}) and embryo (μg); values sharing the same superscript are not significantly different from each other (Tukey test, $\alpha = 0.05$).

Experiment	**Day of development**		
	32	40	End of development
(A) Radiotracer experiments			
^{110m}Ag			
$LCR_{PVF/SW}$	5.95 ± 0.38	22.17 ± 5.05	272 ± 90
$LCR_{embryo/PVF}$	3.06 ± 0.68	21.38 ± 2.79	7.54 ± 0.70
^{109}Cd			
$LCR_{PVF/SW}$	0.51 ± 0.13	5.72 ± 2.07	4.02 ±1.65
$LCR_{embryo/PVF}$	1.08 ± 0.37	0.81 ± 0.25	11.40 ± 3.82
(B) Stable metal experiments			
Ag			
Control	1.34 ± 0.19 ^{a}	0.20 ± 0.05 ^{a}	0.19 ± 0.06 ^{a}
Exposed (*)	12.35 ± 0.72 ^{b}	11.07 ± 0.99 ^{b}	10.32 ± 2.19 ^{b}
$LCR_{embryo/PVF}$	4.20 ± 0.41	6.38 ± 0.96	9.06 ± 0.49
Cd			
Control	2.49 ± 0.72 ^{ab}	0.28 ± 0.04 ^{a}	0.22 ± 0.05 ^{a}
Exposed (*)	3.50 ± 0.17 ^{ab}	3.03 ± 0.43 ^{ab}	5.01 ± 1.98 ^{b}
$LCR_{embryo/PVF}$	2.30 ± 0.19	3.18 ± 0.52	3.85 ± 1.29

Discussion

In cuttlefish, egg and embryo growth is not continuous all along the development duration. At 17°C, the egg growth rate is very slow during the first 25 to 27 d and then increases substantially during the second half of the development duration (Lemaire, 1970, Wolf et al., 1985, Gomi et al., 1986). The end of the first half of the development corresponds to the beginning of water entry into the egg, which results in an increase in perivitellin fluid volume that provides the appropriate medium for the embryo development. From this moment onwards, the embryo starts growing dramatically. Both the increases in perivitellin fluid

volume and embryo growth provoke an important variation in the weight of the egg. In parallel, the yolk is transferred from the outer to the inner yolk sack (Boletzky, 2003). The egg growth therefore provokes a dilution effect on metal concentrations present in the internal compartments. Thus, in order to take into account the weight variations due to vitellus reduction, embryo growth and incorporation of water during the developpement, the bioaccumulation of both stable and radioactive metals in this study was expressed in terms of metallic content in the whole egg and its different compartments (eggshell, embryo, vitellus, and perivitellin fluid).

During the embryonic development, Ag and Cd were efficiently taken up from seawater by the eggs (see Figs 1 and 2). However, the behaviour of ^{110m}Ag and ^{109}Cd was characterized by two contrasting phases. From the spawning up to day 30, ^{110m}Ag was accumulated by the eggs following a power model, which indicates that the metal binding sites of the eggs were not saturated at the end of this first period. Surprisingly, from day 30 uptake kinetics shifted and was then best described using a combined (saturation + logistic) model, revealing a dramatic change in the egg metabolism. It is worth to note that this period corresponds to the completion of the embryo organogenesis and to the beginning of the growth of the organs and tissues (Boletzky, 1986). As mentioned above, the last stages of the development are characterized by an important increase in the perivitellin space and by the rapid consumption of the yolk. These radical changes in the developmental physiology could explain the increasing accumulation of ^{110m}Ag occurring in parallel with the growth of the embryo. Conversely to ^{110m}Ag, uptake kinetics of ^{109}Cd rapidly reached the saturation, suggesting that the metal binding sites were saturated after only 8 d of exposure. This observation is similar to the one previously reported on ^{109}Cd saturation kinetics obtained during the last 11 d of the development of the cuttlefish eggs (Bustamante et al., 2002). This strongly suggests that whatever the period of development is, the Cd binding capacity of cuttlefish eggs is rather limited. It is also noteworthy that the LCR values decreased during the last third of the development period, suggesting that the eggs have then lower capacities to accumulate the metal due to their growth accelaration.

When considering the different egg compartments, the greatest amount of Ag and Cd remained mainly associated with the eggshell (including the chorion) during the first month and all along the development of the egg, respectively. Moreover, the same power coefficient was found to characterize the uptake kinetics in both the whole egg and the eggshell, which strongly suggests that the mechanisms involved in the Ag uptake in the whole egg are those that govern metal bioaccumulation in the eggshell. These observations are consistant with

previous reports indicating that both metals are mainly bound to the chorion and to the egg case of fish eggs (Michibata et al., 1987, Guadagnolo et al., 2001, Jeffree et al., 2006). It is thus likely that both metals were bound to mucopolysaccharides (Beattie and Pascoe, 1978) and/or anionic glutamic acid (Rombough, 1985). Moreover, Sugiyama et al. (1996) have shown that chorionic proteins have significant amounts of sulfhydryl-rich cystein residues that have a high affinity for Ag and Cd (Bell and Kramer, 1999). A similar mechanism may occur on the external chorion of *Daphnia magna* eggs (Bodar et al., 1989).

In cuttlefish, the eggshell contains a high proportion of mucin proteins (Boletzky, 1986) that also have a high content in cystein residues (Kimura et al., 2004) that can be involved in metal binding and retention. Therefore, the eggshell would act as a protective barrier limiting/hindering the incorporation of waterborne metals into the embryo, as suggested for other metals and radionuclides such as ^{241}Am, Cd, Co, Pb, V and Zn (Bustamante et al. 2002, 2004, 2006, Miramand et al., 2006, Villanueva and Bustamante, 2006). Nevertheless, both metal uptake kinetics in eggshell decreased as from day 30 while eggs were under exposure conditions (Fig. 2). At this period of the development, the volume of the eggs increases rapidly as a consequence of seawater entry (Wolf et al., 1985, Gomi et al., 1986). The decrease in uptake capacity of the eggshell is however somewhat surprising if one considers that it should increase proportionally to the eggshell surface (Wang and Zauke, 2004). In fact, the outer layers of the eggshell are slowly lost by delamination along the growth of the egg and this could result in the loss of metal bound on the external envelope. In addition, the complete polymerization of the eggshell components could limit metal access to the eggshell binding sites. However, during exposures to elevated metal concentrations using stable Ag and Cd, the metal burden in the eggshell remained at the steady state until the end of the development, which supports its limited capacity to accumulate the metals (Fig. 3).

Despite the shielding properties of the eggshell, ^{110m}Ag was accumulated efficiently by the embryo during the last 20 d of the embryonic development period (i.e., from days 30 to 50; Fig. 2). Similarly, when eggs were exposed to an elevated concentration of Ag, the metal started to be accumulated by the embryo after 30 d of development (see Fig. 3). Although the embryo weight remained lower than the eggshell one throughout the experiment duration, most of the Ag taken up was associated with the embryo and the perivitellin fluid at the end of the development (the embryos accounted for up to 55% of the total ^{110m}Ag egg burden before the hatching). This highligths the strong capacity of Ag bioaccumulation in cuttlefish during its embryonic development (Bustamante et al., 2004, Miramand et al., 2006) and the limited protective action of the eggshell against this metal.

When non-contaminated conditions were restored, the radiotracers were lost from the whole egg according to different kinetic models, depending on the metal considered and the duration of the previous exposure. Overall, the longer the exposure duration, the more complex the lost regression model was. Concerning ^{110m}Ag, the depuration kinetics followed a single compartment model when the exposure occurred during the first month of development. This indicates that Ag was simply bound to one compartment, i.e. the eggshell. The relative long biological half-lifes ($Tb_{½}$ =30 and 26 d after 7 and 17 days of exposure, respectively) suggest that Ag is bound to specific sites (e.g. sulfhydryl groups). After more than 27 days of exposure, the depuration kinetics were best fitted by a 2-compartment model with a fraction of the radiotracer pool that is weakly associated with the egg (short biological half-life) and a fraction that is tightly bound (long biological half-life). This model complexification can be linked to the association of the metal with internal egg compartments.

The distribution of ^{110m}Ag after different exposure times showed that the metal was accumulated by the embryo during the depuration phase while it was lost from the eggshell during the same period. As the eggshell constituted the only source of radiotracers for the embryo during the depuration phase, translocation of ^{110m}Ag should have occurred from the eggshell towards the embryo. This process occurs from day 30 when, as previously indicated, the eggshell becomes thinner and permeable to water (Wolf et al., 1985, Cronin and Seymour, 2000). This would allow the various metals dissolved in seawater to pass the eggshell and the chorion (Villanueva and Bustamante, 2006). Alternatively, the penetration of Ag in the egg could also be due to Na^+-related ionoregulation processes, since Ag can act as a Na^+ antagonist (Guadagnolo et al., 2001). Nevertheless, once in the perivitellin fluid, Ag can be taken up by the embryo. Indeed, at this stage, the embryo is well developed and interacts actively with its surrounding medium and can for example accumulate the metal as it has been shown for newborn cuttlefish which efficiently accumulate Ag from seawater (Bustamante et al., 2004).

In contrast to ^{110m}Ag, ^{109}Cd remained mainly associated with the eggshell: only 9% of the total radiotracer burden was contained in the embryo a few hours before hatching. This was further confirmed by the results on egg distribution of stable Cd (Fig. 3), indicating that low Cd accumulation capacity of the embryo was not dependent on the intensity of Cd exposure. These results are consistent with previous studies reporting the contrasting behaviour of both metals during the last two weeks of the cuttlefish egg development (Bustamante et al., 2002, 2004). In addition, in depuration conditions, the ^{109}Cd biological half-lifes calculated for the whole eggs were slightly shorter than those of ^{110m}Ag, which suggests that Cd could be bound

less tightly to the egg (Table 1). The half-life of ^{109}Cd decreased as the depuration period occurred later in the egg development. After 40 days of exposure, ^{109}Cd was lost according to a 2-compartment model, which suggests the involvement of high and low affinity binding sites ($T_{b½}$ = 90 *vs.* 1.5 d).

The low Cd accumulation observed in the embryo would result from the combination of the eggshell shielding properties as well as the limited capacity of embryo to take up dissolved Cd. Indeed, LCR calculated both for the radiolabelled and the stable Cd concentrations between seawater and perivitellin fluid showed that Cd passed the eggshell only during the last days of the cuttlefish egg development (Table 3). Furthermore, even when Cd reached the perivitellin fluid, the $LCR_{embryo/PVF}$ remained very low. A similar low capacity of bioaccumulating dissolved Cd has been shown in juvenile and adult cephalopods for which seawater exposure leads to very low CF of 1.3 ± 0.3 (Bustamante et al., 2002).

It is worth noting that the contrasting bioaccumulation capacity for Ag and Cd found in embryos is no longer observed in feeding individuals of *S. officinalis*. Indeed, in offshore adult cuttlefish, Cd concentrations are typically higher than the Ag ones (Miramand et al., 2006). The main feature differentiating pre-hatching individuals from feeding ones is the functional maturation of the digestive gland which is fully reached ca. 30 d after hatching (Yim and Boucaud-Camou, 1980, Nixon and Mangold, 1998). This maturation process essentially results in the acquisition of a complete and functional hepatic lysosomal system (Yim and Boucaud-Camou, 1980), which has often been suggest to be involved in the storage and/or detoxification of Ag and Cd. These features strongly suggest that the maturation of this organ could be the key event responsible for the observed differences in Ag and Cd behaviour in embryos and feeding juvenile and adult cuttlefish. Indeed, an increase in Cd storage/trapping efficiency and in Ag detoxification/excretory efficiency related to the functional maturation of the digestive gland would easily explain that the digestive gland accumulates Cd all along the cuttlefish lifespan (Bustamante et al. 2002, Miramand et al., 2006) as well as the fact that Ag levels substantially decrease in cuttlefish when they migrate from contaminated coastal zones where they spent the first months of their post-hatching life to unpolluted offshore waters (Miramand et al., 2006).

In summary, the eggshell acts as an efficient shield protecting the embryo against direct metal exposure. This could be an important advantage for organisms that live and reproduce in the coastal waters, which are often heavily contaminated by metals. Nevertheless, in the case of Ag, the eggshell membrane shielding capacities appeared to be limited due to increasing permeability from the 30th day of development onwards. Moreover, the strong retention

capacities of the eggshell for Ag were found to be at the origin of translocation of this element towards the embryo later on during the development period, which may subsequently induce damages to the growing embryo.

ACKNOWLEDGMENT: Authors are grateful to M. Metian (IAEA-MEL) for skilful assistance during the experiments. MW is an Honorary Senior Research Associate of the National Fund for Scientific Research (NFSR, Belgium). The IAEA is grateful for the support provided to its Marine Environment Laboratories by the Government of the Principality of Monaco. This work was financially supported by the IAEA and the CRELA (University of La Rochelle).

CHAPITRE II

Effets chroniques de métaux sur les fonctions digestives et immunitaires au cours du développement embryonnaire

Partie 1. Effets chroniques de métaux non-essentiels (Ag et Cd) et essentiel (Cu) sur le développement des œufs de seiche, *Sepia officinalis* : réponse des activités des phosphatases acides et des cathepsines lysosomales

Lacoue-Labarthe T.[1], Bustamante P.[1], Le Bihan E.[2], Borg D.[1], Koueta N.[2]

1- Centre de Recherche sur les Ecosystèmes Littoraux Anthropisés, UMR 6217, CNRS-IFREMER-Université de La Rochelle, 22 avenue Michel Crépeau, F-17042 La Rochelle Cedex 01, France

2- Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, UMR 100, IFREMER Physiologie et Ecophysiologie des Mollusques Marins, Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France

Résumé : Au printemps, les seiches *Sepia officinalis* pondent leurs œufs dans la zone côtière sujette à la contamination métallique d'origine anthropique. Pour évaluer les effets d'une contamination chronique sur le développement embryonnaire, des œufs de seiche ont été exposés à l'Ag, Cd et Cu aux concentrations suivantes : : 0,05, 1, 50 et 1000 ng $Ag.l^{-1}$, 25, 50, 250, 500 ng $Cd.l^{-1}$ et 0,25, 2,5, 25 et 250 µg $Cu.l^{-1}$. Les stades de développement et la croissance de l'œuf ont été suivis sur tout le temps du développement. Le poids des nouveaux-nés a été mesuré à l'éclosion. Enfin, après avoir défini les variations des activités des phosphatases acides et des cathepsines dans l'œuf entier, un effet des métaux sur ce paramètre a été recherché. L'exposition des œufs aux 3 métaux n'entraîne ni de mortalité, ni de malformation, ni délai dans le développement de l'embryon, par rapport aux contrôles. Néanmoins, il apparaît que les poids des juvéniles à l'éclosion sont significativement inférieurs à ceux des témoins pour des contaminations à l'Ag, à 250 ng.l^{-1} et 500 ng.l^{-1} de Cd et 2,5, 25 et 250 µg.l^{-1} de Cu. Au cours du l'embryogenèse, les activités phosphatases acides et cathepsines montrent des variations corrélées aux stades de développement de l'embryon. Les enzymes lysosomales du vitellus semblent progressivement remplacées par les enzymes produites *de novo* par l'embryon en fin de développement. Les phosphatases acides de l'embryon semblent répondre à l'exposition aux métaux lourds au moment où entre en fonction la glande digestive de l'embryon. En revanche, les activités cathepsines mesurées dans des œufs sujets à une exposition ne montrent pas de variations comparées aux témoins. Dans le milieu, les embryons de seiche sont protégés pendant la période d'organogenèse. Dans la deuxième moitié du développement, les embryons subissent la pression de contamination et sont donc sujets à un ralentissement de la croissance jusqu'à l'éclosion.

Introduction

Dans l'Atlantique Nord-est, les adultes de la seiche commune *Sepia officinalis* entreprennent une migration printanière des eaux du large vers la côte pour s'accoupler, pondre, et mourir (e.g. Boucaud-Camou et al., 1991). Les œufs, fixés au substrat dans les eaux peu profondes du littoral, sont soumis tout au long du développement embryonnaire aux contraintes du milieu. Parmi elles, les polluants d'origine anthropique, rejetés directement ou *via* les cours d'eau qui drainent les bassins versants, contaminent la zone côtière (Chiffoleau et al., 1994). Les œufs de seiche sont donc exposés, entre autres, aux éléments métalliques dont les concentrations peuvent se révéler être au-dessus des bruits de fond définis dans des zones peu soumises à l'influence continentale. Les chapitres précédents de cette étude ont montré que les embryons étaient relativement bien protégés des métaux par la capsule de l'œuf. Néanmoins, à partir d'un certain stade de développement, les embryons peuvent accumuler différents éléments comme l'Ag, le Cd, le Hg ou le Zn indépendamment de leur caractère essentiel ou non.

Peu d'études se sont intéressées aux effets toxiques des métaux sur le développement des œufs chez les céphalopodes (e.g. Establier et Pascual, 1983, Paulij et al., 1990, Le Bihan et al., 2003, Sen et Sunlu, 2007). Néanmoins, la question de la toxicité des métaux sur le développement embryonnaire et les capacités de survie des juvéniles à l'éclosion doit être posée. En effet, du fait du caractère semelpare de la seiche, l'état des juvéniles conditionne le recrutement à l'automne et la survie du stock.

Les précédents travaux traitant des effets des métaux sur les œufs de seiche se sont essentiellement portés sur l'impact du Cd et du Cu à des niveaux aigus d'expositions, i.e. 200 – 800 µg $Cd.l^{-1}$ et 50 - 800 µg $Cu.l^{-1}$ (Establier et Pascual, 1983, Paulij et al., 1990). Dans ces gammes de concentration, les auteurs ont observé des effets allant de l'induction d'éclosions précoces pour le Cu, jusqu'à des arrêts du développement embryonnaire pour les deux métaux. Aucune étude publiée n'a néanmoins porté sur l'effet de l'Ag, réputé toxique pour les jeunes stades de vie chez les invertébrés (Calabrese et al., 1973, Martin et al., 1981) et hautement accumulé par les embryons de seiche (Lacoue-Labarthe et al., Chap.I.1). Enfin, les concentrations utilisées dans ces expérimentations étaient bien supérieures à celles rapportées pour le milieu marin, même pour des zones fortement contaminées.

Chez la seiche adulte, la glande digestive est le principal organe d'accumulation des métaux (e.g. Miramand et Bentley, 1992, Bustamante et al., 2002a, 2002b, 2004, Miramand et al., 2006). Dans ce tissu, le système lysosomal des cellules digestives est fortement impliqué

dans les mécanismes de détoxication des métaux, notamment en les compartimentant et en prenant en charge la dégradation des protéines de détoxication telles que les métallothionéines (Viarengo et Nott, 1993, Bustamante et al., 2002a). Chez les bivalves, il a été démontré que la pollution métallique pouvait engendrer des perturbations de la structure de ces lysosomes (Marigomez et al., 1996) ainsi qu'inhiber certaines enzymes lysosomales telles que les phosphatases acides (Mazorra et al., 2002). Le Bihan et al. (2004) ont montré d'autre part une inhibition, *in vitro*, des activités spécifiques des cathepsines lors de l'exposition de cellules de la glande digestive au Cu et au Zn en forte concentration (1.3 $mg.l^{-1}$). Par contre, une exposition plus faible au Zn, et à l'Ag induit une stimulation des cathepsines.

De nombreuses études ont décrit les cathepsines et les phosphatases acides comme étant les enzymes responsables de la dégradation du vitellus dans les œufs d'oiseaux (Gerhartz et al., 1997), de poissons (Sire et al., 1994, Kestemont et al., 1999, Martinez et al., 1999, Carnevali et al., 2001), d'amphibiens (Lemanski et Aldoroty, 1974, Fagotto et Maxfield, 1994b, Yoshizaki et Yonezawa, 1994, Komazaki et Hiruma, 1999), d'insectes (Fialho et al., 1999, 2002, 2005), d'échinodermes (Schuel et al., 1975, Mallya et al., 1992), et de polychètes (Bonnier et Baert, 1992). Les phosphatases acides sont des enzymes ubiquistes capables de catalyser l'hydrolyse des monoesters orthophosphoriques de nombreux substrats. Les cathepsines sont quant à elles des protéases dont il existe plusieurs types : cystéine protéase ou cathepsin B et L, aspartique protéinase ou cathepsin D et E.

Phosphatases acides et cathepsines ont été localisées dans les granules vitellins qui s'apparentent à des lysosomes modifiés dans lesquels sont stockées les réserves vitellines, i.e. sous forme de vitellogenine, phosvitine, lipovitelline, ainsi que de petites quantités d'acides nucléiques, des polysaccharides acides, des lectines, et des facteurs de croissance (Fagotto, 1990, 1995, Komazaki et Hiruma, 1999). La digestion de ces réserves dépend donc de la transmission de ces enzymes lysosomales au cours de l'ovogenèse de la mère à l'œuf (Fausto et al., 1997). De plus, les réserves vitellines n'étant pas dégradées avant le début de l'embryogenèse, ceci implique l'existence de mécanismes régulant les activités des enzymes (Fagotto et Maxfield, 1994a). Leurs activations au cours du développement sont dépendantes 1) de la fertilisation de l'œuf (Fialho et al., 2002) et 2) de la stimulation des granules vitellins. En effet, les enzymes sont rendues actives grâce à l'acidification des organelles dont le pH est inférieur à 5 pendant les périodes de digestion du vitellus (Fagotto, 1990, Fialho et al., 1999, 2005). Chez la punaise *Rhodnius prolixus*, le système d'acidification implique des pompes à protons localisées sur les membranes des granules (Fialho et al., 2002). De plus, Yoshizaki et al. (1998) rapportent que la cathepsine D peut être transformée en une molécule plus active

grâce à l'action d'une cystéine protéase. Enfin, Fialho et al. (2005) ont démontré que l'activité de la cathepsine D était bloquée par des inhibiteurs de la phosphatase acide, prouvant une activation conjointe de ces deux enzymes dans la digestion des réserves vitellines.

Dans ce contexte, le but de cette étude est de rechercher et d'évaluer les effets chroniques de deux métaux non essentiels et potentiellement toxiques, l'Ag et le Cd d'une part et d'autre part d'un métal essentiel, le Cu, à des concentrations sub-léthales sur les œufs de seiche exposés tout au long du développement embryonnaire. Au cours de ces expositions aux polluants, plusieurs paramètres du développement ont été suivis : la croissance de l'œuf, les stades embryonnaires, le poids des juvéniles à l'éclosion. De plus, les activités des phosphatases acides et des cathepsines ont été dosées tout au long du développement pour 1) définir leur évolution au cours de l'embryogenèse et 2) évaluer un potentiel impact des métaux sur ces enzymes de type lysosomal.

Matériels et Méthodes

1. Organismes, solutions métalliques et protocole expérimental

Les œufs de seiche ont été récupérés sur des casiers de pêcheurs locaux, le long de la côte Ouest du Cotentin (Normandie, France) entre avril et mai 2005. Ensuite, au laboratoire, ils ont été placés dans les structures d'élevage (Figure 1) décrites par Koueta et Boucaud-Camou (1999) de la station marine (CREC) de Luc-sur-Mer (Calvados). Avant d'être placés sur des supports flottants, les œufs ont été, en quelques heures, progressivement acclimatés à la température des structures et séparés des grappes, afin d'optimiser leur oxygénation au cours du développement. Ils ont été ainsi maintenus 2-3 jours dans un circuit semi-ouvert (aération constante ; 37 p.s.u ; cycle jour/nuit 12h/12h) à une température de 15 °C afin de limiter leur développement, avant le début de l'expérimentation.

Pour ces expérimentations, de l'Ag (expérimentation 1 ; E1), du Cd (expérimentation 2 ; E2) et du Cu (expérimentation 3 ; E3) ont été ajoutés dans les milieux d'incubation sous forme de sels de chlorure, i.e. $AgCl_2$, $CdCl_2$ et $CuCl_2$. Les solutions stocks ont été préparées à partir d'HCl 0,3 N afin d'obtenir la concentration souhaitée dans le milieu expérimental grâce à l'ajout de quelques millilitres de solutions stocks (typiquement 100 – 1000 µl).

Les œufs (n = 600 par condition) ont été placés pour tout le temps de développement (i.e. 50 jours à 17°C) dans des bacs de 11 l contenant de l'eau de mer naturelle (circuit fermé avec aération constante ; température 17°C ; 37 p.s.u ; cycle jour/nuit 12h/12h). Ils ont été disposés sur un tamis les rehaussant du fond et favorisant ainsi la circulation de l'eau dans le bac pour optimiser leur oxygénation. Le plan expérimental comprenait 4 concentrations pour chaque métal et un contrôle, chaque condition étant réalisée en triplicat. Les concentrations testées ont été les suivantes : 0,05, 1, 50 et 1000 ng $Ag.l^{-1}$, 25, 50, 250, 500 ng $Cd.l^{-1}$ et 0,25, 2,5, 25 et 250 µg $Cu.l^{-1}$. L'eau a été renouvelée chaque jour ainsi que les apports métalliques afin de maintenir une bonne qualité du milieu et des concentrations métalliques constantes.

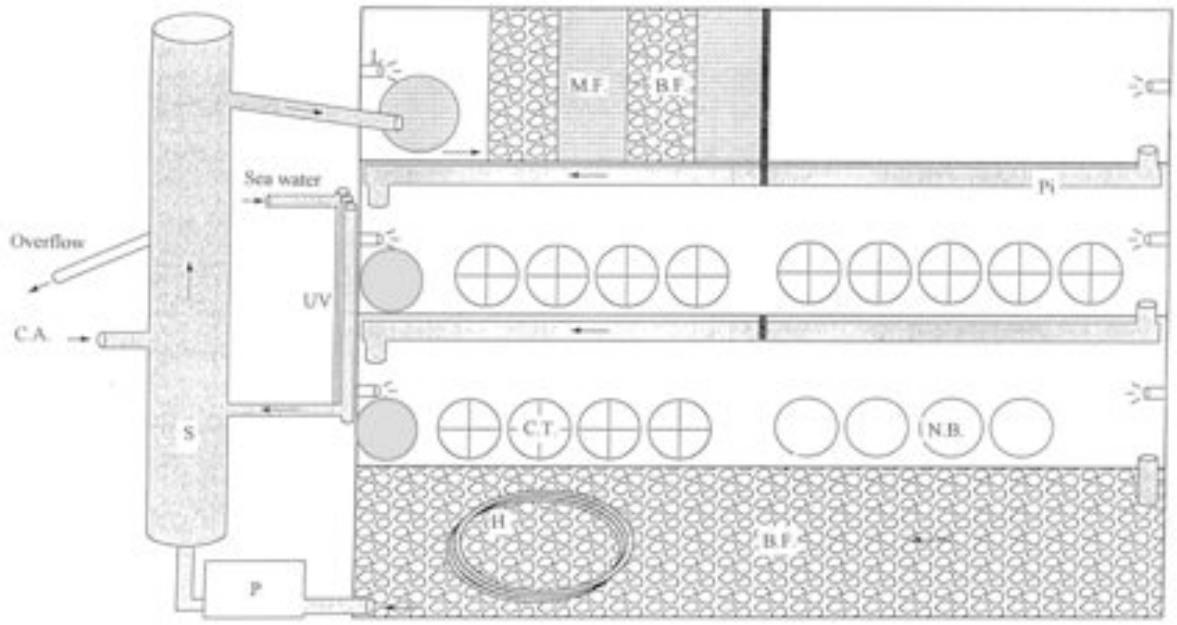

Figure 1. *Sepia officinalis.* Schéma des structures d'élevage de seiche de la station marine de Luc-sur-Mer.

2. Suivis de la croissance de l'œuf, du développement et échantillonnage

À différents temps du développement, pour chaque condition expérimentale, des œufs ont été prélevés (n = 24) puis pesés afin de suivre la croissance de l'œuf. Les œufs dédiés aux dosages des activités enzymatiques (n = 6 par condition) ont été immédiatement plongés dans l'azote liquide et stockés à - 80 °C jusqu'aux analyses. Enfin, 6 œufs ont été disséqués afin de déterminer les stades de développement décrits par Lemaire (1970). Au terme du développement embryonnaire, des juvéniles nouveaux-nés ont été prélevés puis pesés.

3. Bioessais enzymatiques

Extraction : 6 œufs par condition ont été prélevés pour l'analyse des activités phosphatases acides et cathepsines. Les 2 œufs issus du même réplicat expérimental sont poolés, pesés et broyés mécaniquement à l'aide d'un mortier et d'un pilon en céramique dans de l'azote liquide. L'échantillon est repris dans un tampon d'extraction (2,5 volumes par gramme d'œuf entier) correspondant à 1% de KCl contenant 1mM d'EDTA. L'homogénat obtenu est ensuite centrifugé 30 min à 10 000 à 4 °C. Seul le surnageant est utilisé pour les mesures d'activité enzymatique.

Essais enzymatiques : la mesure de l'activité des phosphatases acides est basée sur l'utilisation du p-nitrophenyl-phosphate à 2% en tant que substrat dans du tampon TRIS 1M à pH 3 (Moyano et al., 1996). Ainsi, 100 µl d'échantillon ont été ajoutés à 100 µl de substrat. Pour chaque échantillon, le dosage a été réalisé en triplicat. Après 30 minutes d'incubation à 25°C, la réaction a été stoppée par ajout de 1 ml de NaOH 1M. L'absorbance a été mesurée à 405 nm. L'activité totale des phosphatases acides est exprimée en unité (U) par œuf entier où une unité enzymatique correspond à 1 µmol.l^{-1} de p-nitrophénol formée par minute.

L'activité des cathepsines a été dosée selon la méthode de Bonete et al. (1984). Le milieu réactionnel est composé de 100 µl d'échantillon, de 50 µl de tampon acétate 0,4 M (pH 4,0) et de 50 µl de solution d'hémoglobine 2 % (poids/volume). Pour chaque échantillon, le dosage a été réalisé en triplicat. Après 60 min d'incubation à 37 °C, la réaction a été stoppée par ajout de 1 ml d'acide trichloroacétique (TCA) 3%. Après 10 min, le milieu a été centrifugé 10 min à 800 g. Un aliquote a été utilisé pour estimer les produits finaux de l'hydrolyse. Les produits de la réaction ont été dosés par la méthode de Folin - Lowry, en utilisant la tyrosine comme

standard. L'activité cathepsine est exprimée en activité totale dans un œuf (unité (U) / œuf) où une unité enzymatique correspond à 1 µmol tyrosine.

La quantité de protéines présentes dans les bioessais a été déterminée par la méthode de Folin - Lowry et al. (1951) avec de l'albumine sérique de bovin comme standard.

4. Analyses statistiques

Les résultats sont donnés sous forme de moyenne ± 1 écart-type. Les données ont été comparées par analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivie d'un test de Tuckey (Sokal et Rohlf, 1981). Le seuil de significativité des tests statistiques était toujours $\alpha = 0.05$.

Résultats

1. Suivis des stades embryonnaires, de la croissance de l'œuf du développement et des juvéniles à l'éclosion.

Au cours du développement, les stades de développement de l'embryon, définis selon Lemaire (1970), ont été observés aux différents temps de prélèvement. Aucune différence due à l'exposition métallique n'ayant été observée, les cinétiques présentées sur la figure 2, décrivent le développement des œufs utilisés pour les expérimentations E1+E2 et E3. Ces deux courbes sont situées par rapport aux cinétiques de développement rapportées dans la littérature pour deux températures, i.e. 17 et 20 °C (Boletzky, 1983). Ainsi, le développement des œufs de cette étude a suivi une cinétique homogène par rapport aux courbes théoriques, avec toutefois un développement plus rapide pour les œufs d'E1/E2 que d'E3. Ce décalage s'explique par le fait que la température d'incubation d'E3 est restée proche de 15°C pendant la première semaine d'expérimentation en raison de problèmes techniques. Au cours de ces observations, aucune malformation n'a été observée suite à l'exposition aux métaux.

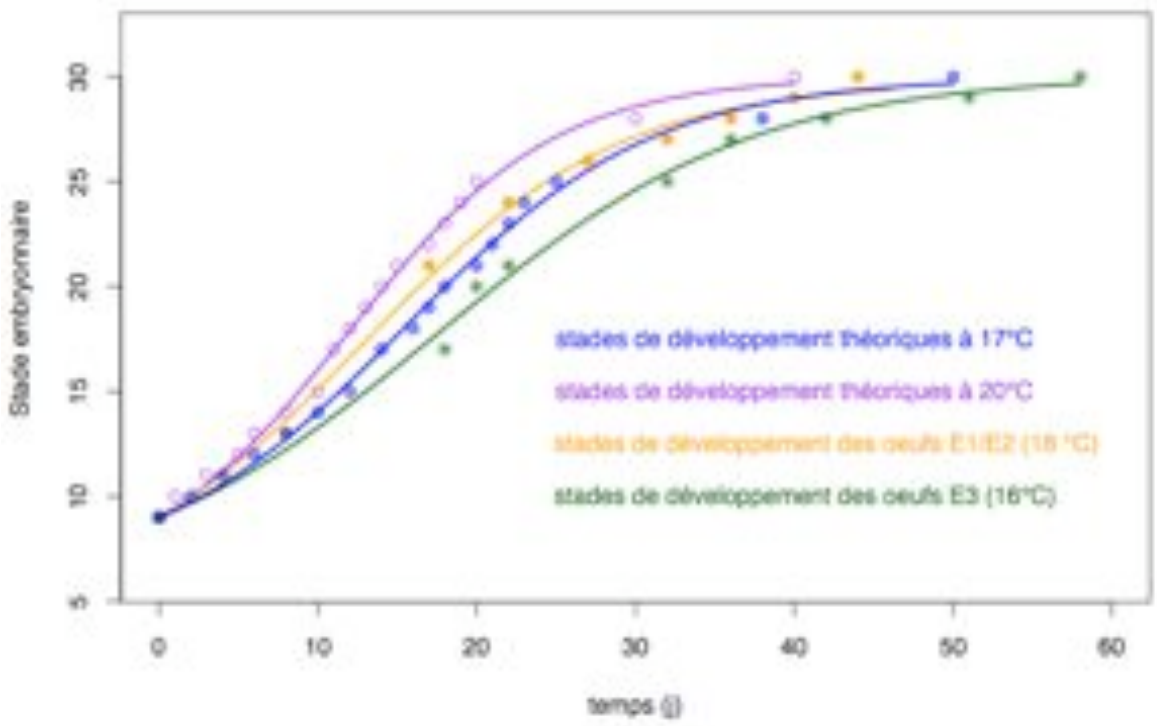

Figure 2. *Sepia officinalis*. Cinétique des stades embryonnaires décrits par Lemaire (Lemaire, 1970) pour les œufs des expérimentations E1/E2 (18 °C) et E3 (16 °C), et cinétiques des stades pour des températures d'incubation de 17 et 20 °C déterminées à partir de la littérature (Boletzky, 1983).

La croissance des œufs exposés à différentes concentrations d'Ag, de Cd et de Cu au cours du développement, sont présentées sur la figure 3. Les courbes montrent clairement que le poids est resté stable les 22 et 27 premiers jours, respectivement pour les œufs témoins de E1/E2 et E3. À partir de ce moment, les œufs ont grossi de manière constante pour atteindre un poids moyen, pour E1/E2 et E3 respectivement, de 4,90 ± 0,21 et 4,03 ± 0,15 g, quelques heures avant l'éclosion. Pour chaque expérimentation, aucun effet des différentes concentrations en Ag, Cd et Cu n'a été observé sur la croissance de l'œuf entier au cours du développement.

Au terme du développement, les juvéniles nouvellement éclos ont été pesés pour chaque condition expérimentale. Ainsi, suite à une contamination à l'Ag pendant le développement embryonnaire (Figure 4), le poids des juvéniles décroît significativement avec l'augmentation de la concentration (ANOVA ; $p < 0,05$) pour atteindre 205 ± 2 mg pour une contamination

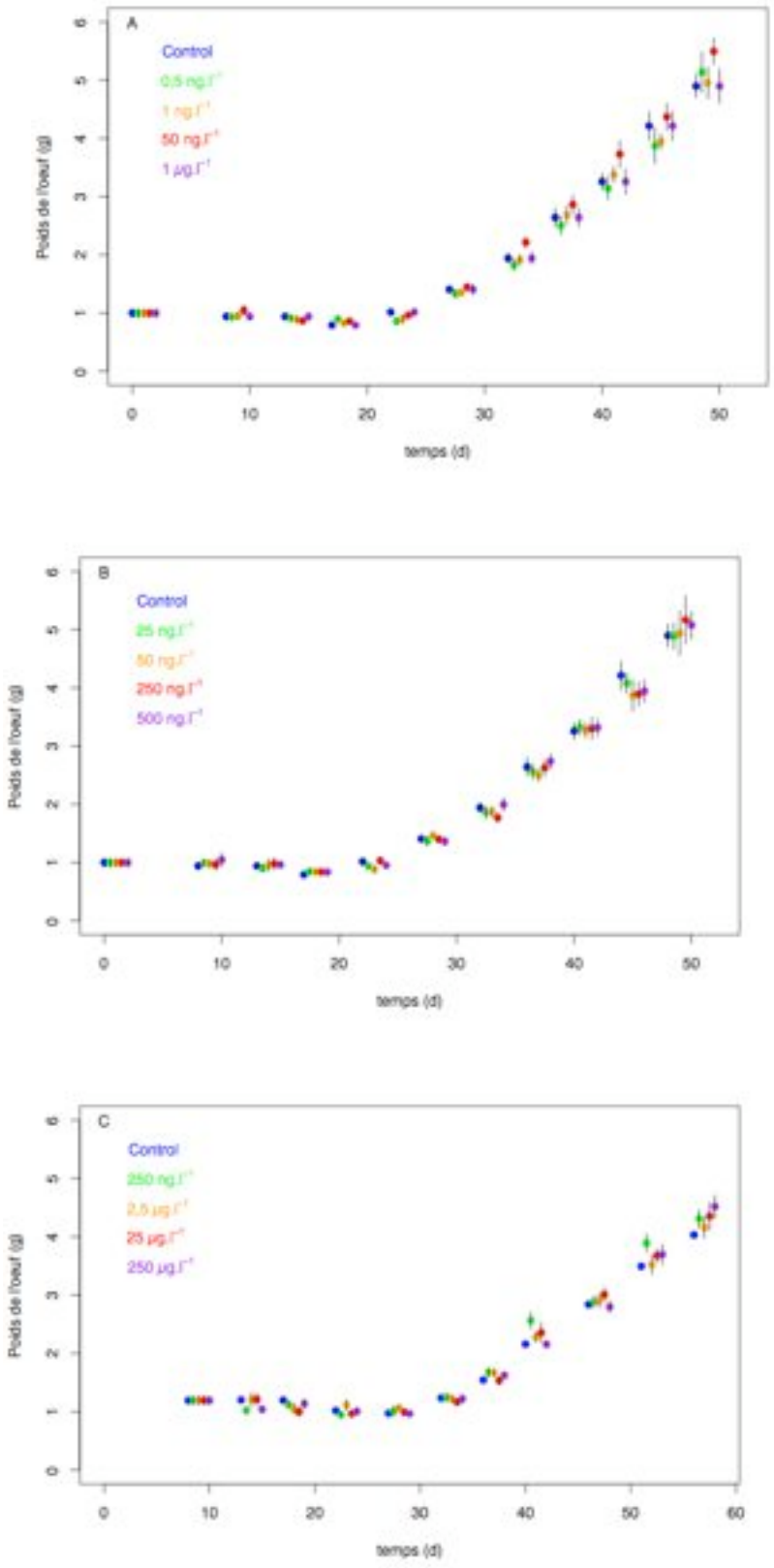

Figure 3. *Sepia officinalis*. Croissance des oeufs (en g ; moyenne ± écart-type ; n = 8), au cours de développement, exposés à différentes concentrations d'Ag (A), de Cd (B) et de Cu (C).

des œufs à 50 ng.l^{-1} (81 % du poids des contrôles). Par contre, pour une concentration 200 fois plus forte (1 µg.l^{-1}), le poids des juvéniles n'est significativement pas différent de celui de juvéniles ayant subi une exposition à 1 ng.l^{-1} au cours de l'embryogenèse. En ce qui concerne le Cd, une réduction significative de 5 et 8 % du poids des juvéniles a été observée suite à une exposition à 250 ng.l^{-1} et 500 ng.l^{-1}, respectivement, par rapport aux contrôles (Figure 5). Enfin, les juvéniles issus d'œufs exposés à 2,5, 25 et 250 µg Cu.l^{-1} sont significativement 4, 8 et 9 % plus légers que les témoins (Figure 6).

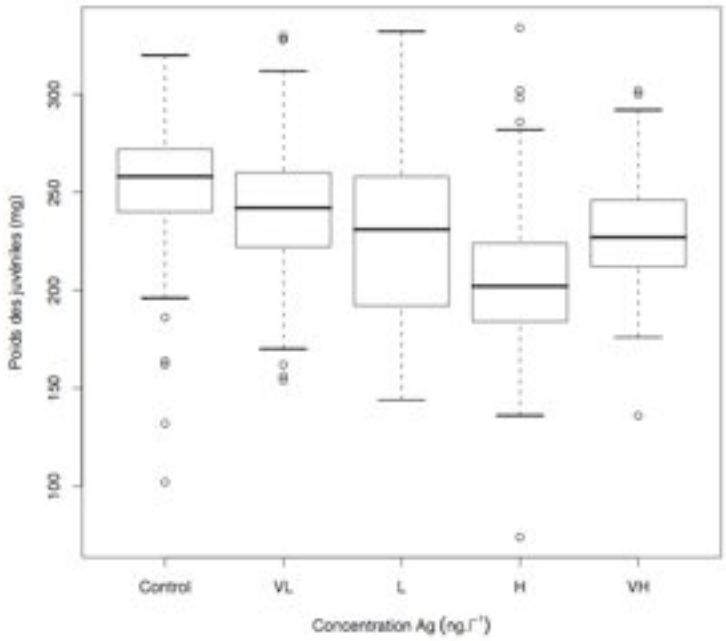

Figure 4. *Sepia officinalis*. Poids des juvéniles à l'éclosion (g ; moyenne ± écart-type ; n = 150) suite à une exposition à 5 concentrations d'Ag au cours du développement embryonnaire : Contrôle, VL (0,05 ng.l^{-1}), L (1 ng.l^{-1}), H (50 ng.l^{-1}) et VH (1 µg.l^{-1}).

2. Activités des phosphatases acides et des cathepsines au cours du développement

La figure 7 présente la quantité de protéines dosées dans l'œuf entier au cours du développement. Celle-ci chute pendant la première semaine de développement puis reste stable jusqu'à l'éclosion.

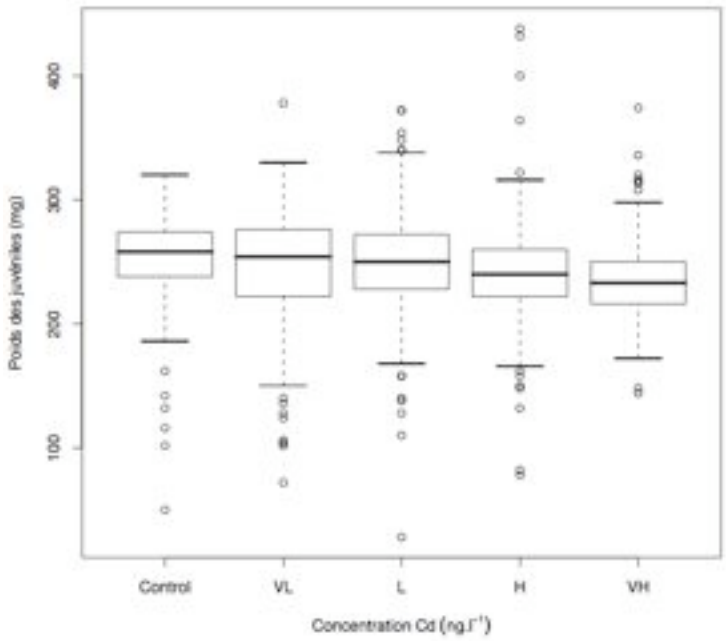

Figure 5. *Sepia officinalis*. Poids des juvéniles à l'éclosion (g ; moyenne ± écart-type ; n = 150) suite à une exposition à 5 concentrations de Cd au cours du développement embryonnaire : Contrôle, VL (25 ng.l^{-1}), L (50 ng.l^{-1}), H (250 ng.l^{-1}) et VH (500 ng.l^{-1}).

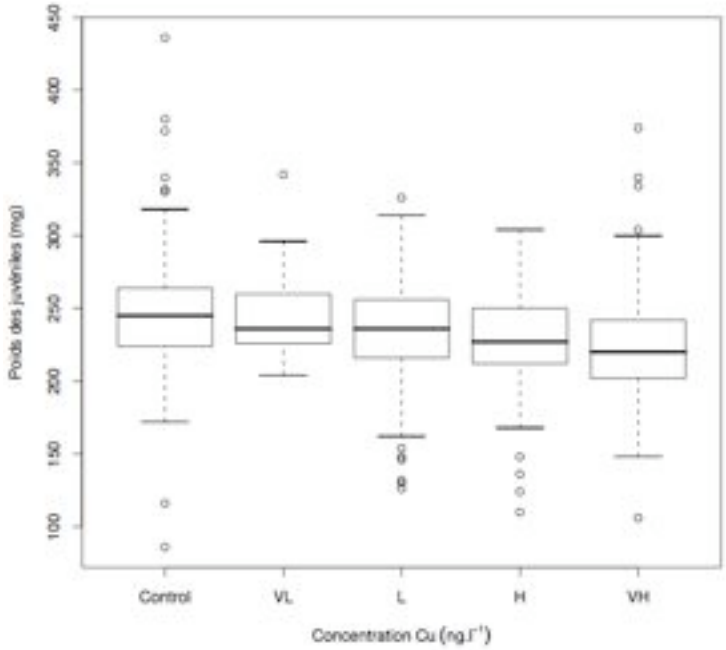

Figure 6. *Sepia officinalis*. Poids des juvéniles à l'éclosion (g ; moyenne ± écart-type ; n = 150) suite à une exposition à 5 concentrations de Cu au cours du développement embryonnaire : Contrôle, VL (250 ng.l^{-1}), L (2,5 µg.l^{-1}), H (25 µg.l^{-1}) et VH (250 µg.l^{-1}).

L'évolution de l'activité totale des phosphatases acides, dosée dans les œufs entiers au cours du développement, est illustrée par la figure 8. Globalement, l'activité des phosphatases acides augmente avec le développement embryonnaire. Néanmoins, ce phénomène n'est pas constant au cours du temps, mais varie selon les périodes du développement. En effet, pendant les 22 premiers jours, l'activité des phosphatases acides augmente faiblement de 0,29 ± 0,08 à 0,77 ± 0,05 U. Elle affiche ensuite des valeurs 2 fois plus élevées entre le jour 27 et 36 (1,62 ± 0,28 et 1,70 ± 0,04 U au jour 27 et 36 respectivement). Enfin, à ce stade, l'activité enzymatique augmente soudainement pour atteindre une activité maximale quelques heures avant l'éclosion (4,01 ± 0,27 U au jour 48).

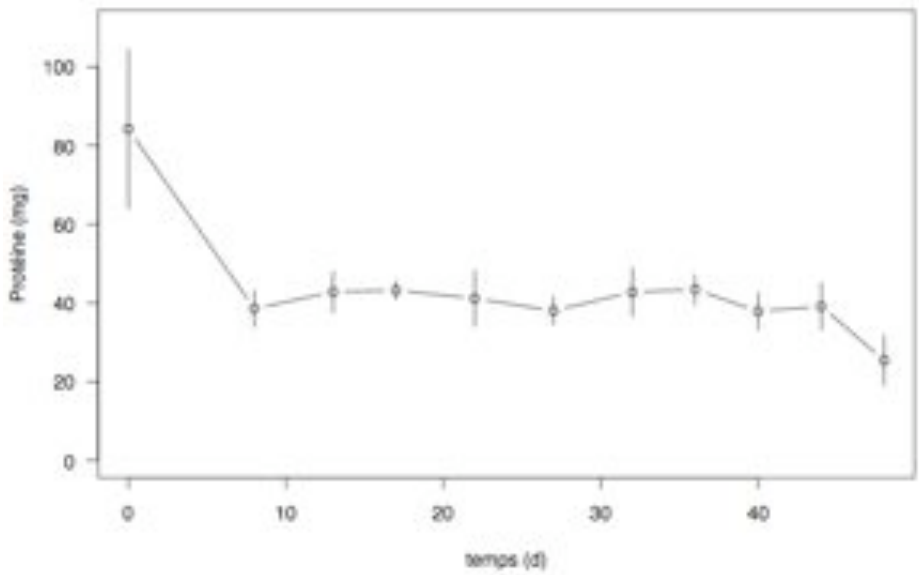

Figure 7. *Sepia officinalis*. Évolution de la quantité de protéines totales dans les œufs contrôles au cours du développement (mg ; moyenne ± écart-type ; n = 6)

L'activité cathepsine mesurée dans les œufs entiers montre des variations au cours du développement embryonnaire (Figure 9). Elle présente une valeur maximale au jour 27 de développement 2 fois plus élevée qu'au jour 8 ($p < 0.05$). Ensuite, l'activité cathepsine décroît jusqu'aux jours 36 et 40 auxquels sont mesurées les activités les plus faibles (45 ± 10 et 50 ± 15 U au jour 36 et 40, respectivement) avant d'augmenter à nouveau jusqu'à l'éclosion (123 ± 35 U au jour 48).

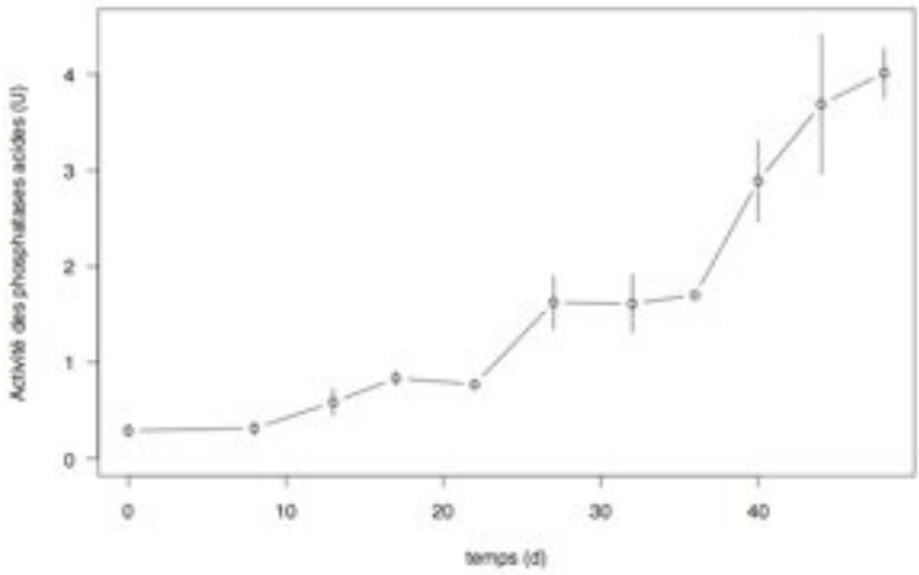

Figure 8. *Sepia officinalis*. Évolution de l'activité des phosphatases acides mesurée dans les œufs contrôles entiers au cours du développement ($U.oeuf^{-1}$; moyenne ± écart-type ; n = 6)

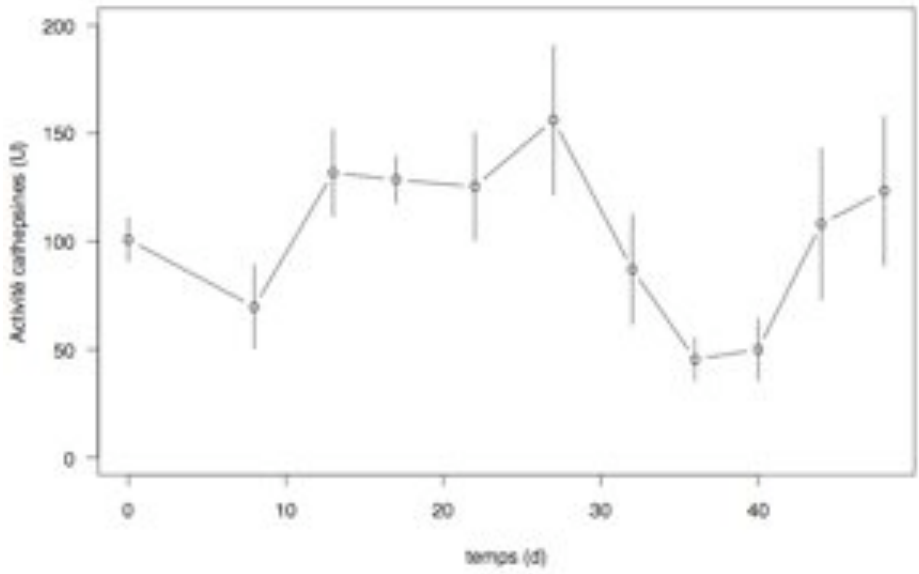

Figure 9. *Sepia officinalis*. Évolution de l'activité des cathepsines mesurée dans les œufs contrôles entiers au cours du développement ($U.oeuf^{-1}$; moyenne ± écart-type ; n = 6)

3. Réponses des activités enzymatiques à l'exposition à l'Ag, au Cd et au Cu

L'activité phosphatase acide mesurée au cours du temps d'incubation des œufs, pour chaque concentration métallique, ne montre pas de variation liée à l'exposition (résultats non montrés). Néanmoins, en raison du grand nombre d'œufs récoltés directement dans le milieu pour cette expérimentation, il en ressort une variabilité importante des stades de maturation pour un âge donné, déterminé artificiellement au moment de la récolte. Par contre, le poids se révèle être un bon indicateur de l'avancement du développement, particulièrement pendant sa deuxième moitié où la croissance de l'œuf est rapide. De plus, l'exposition aux métaux dans cette étude n'entraîne pas d'effet sur ce paramètre. Ainsi, il est possible de représenter par un modèle linéaire l'augmentation de l'activité phosphatase acide en fonction de l'augmentation du poids de l'œuf pendant la deuxième moitié du développement (i.e. à partir du jour 22 pour les œufs E1/E2 et du jour 32 pour les œufs de E3). Dans ce contexte, un impact des métaux sur l'augmentation de l'activité de l'enzyme pourrait se traduire par une variation des pentes des modèles linéaires déterminés. Ainsi pour chaque condition d'exposition (métal/concentration), les différences de pente des modèles par rapport aux témoins ont été estimées statistiquement (ANCOVA).

Le tableau 1 rassemble l'ensemble des paramètres des régressions linéaires entre l'activité phosphatase acide totale et le poids de l'œuf, pour les 5 concentrations testées d'Ag, de Cd et de Cu. Concernant l'exposition à l'Ag, les données montrent une inhibition de l'activité enzymatique dans les œufs exposés à 1 $\mu g.l^{-1}$ par rapport aux témoins (pentes pour les témoins *vs.* les exposés à 1 $\mu g.l^{-1}$: 0,42 ± 0,04 *vs.* 0,29 ± 0,02). Dès une exposition à 25 $ng.l^{-1}$ de Cd, les valeurs des pentes déterminées pour des œufs exposés sont significativement inférieures à celle des œufs témoins. Par contre, une exposition à 2,5 µg.l-1 de Cu active l'évolution de l'activité phosphatase acide. Les autres concentrations testées de Cu n'entraînent, par contre, pas d'effet sur le paramètre étudié.

Concernant les cathepsines, aucun effet des métaux n'a été observé sur les activités enzymatiques dosées dans l'œuf quelle qu'ait été la concentration employée du métal.

Table 1. *Sepia officinalis*. Paramètres de la régression linéaire des activités totales des phosphatases acides en fonction du poids des oeufs pendant la période de croissance linéaire de l'œuf (du jour 22 à l'éclosion). Comparaison des pentes observées chez les œufs exposés à l'Ag, au Cd et au Cu par rapport à la pente des œufs témoins (ANCOVA ; * pour $p < 0,005$)

Metals	Pente (U. g^{-1})	R^2	p
(a) œufs exposés à l'Ag pendant le développement embryonnaire			
Témoin	0.42 ± 0.04	0.679	
0.05 $ng.l^{-1}$	0.42 ± 0.02	0.854	0.992
1 $ng.l^{-1}$	0.33 ± 0.03	0.615	0.067
50 $ng.l^{-1}$	0.35 ± 0.02	0.820	0.093
1 $\mu g.l^{-1}$	0.29 ± 0.02	0.712	0.004*
(b) œufs exposés au Cd pendant le développement embryonnaire			
Témoin	0.42 ± 0.04	0.679	
25 $ng.l^{-1}$	0.31 ± 0.02	0.872	0.006*
50 $ng.l^{-1}$	0.28 ± 0.02	0.796	< 0.001*
250 $ng.l^{-1}$	0.23 ± 0.02	0.719	< 0.001*
500 $ng.l^{-1}$	0.28 ± 0.02	0.739	0.001*
(c) œufs exposés au Cu pendant le développement embryonnaire			
Témoin	0.34 ± 0.02	0.881	
0.25 $\mu g.l^{-1}$	0.33 ± 0.02	0.954	0.957
2.5 $\mu g.l^{-1}$	0.44 ± 0.03	0.879	0.019*
25 $\mu g.l^{-1}$	0.35 ± 0.03	0.865	0.735
250 $\mu g.l^{-1}$	0.30 ± 0.03	0.859	0.283

Discussion

1. Suivis des stades embryonnaires, de la croissance de l'œuf du développement et du poids des juvéniles à l'éclosion.

À notre connaissance, peu d'études se sont intéressées aux effets toxiques des éléments métalliques sur le développement embryonnaire des céphalopodes (Establier et Pascual, 1983, D'Aniello et al., 1990, Paulij et al., 1990). Néanmoins, les premiers stades de vie chez les invertébrés sont connus pour être particulièrement sensibles aux métaux (e.g. Calabrese et al., 1973, Warnau et al., 1996). L'exposition des œufs de seiche pondus au printemps dans les eaux côtières contaminées peut donc altérer le développement et entraîner une réduction du recrutement des juvéniles à l'automne dont dépend l'avenir des stocks exploités.

L'observation des différents stades de développement a montré que l'Ag, le Cd et le Cu n'induisaient pas de retard ni de précocité dans la cinétique du développement. Ces données révèlent néanmoins que les œufs E1/E2 se sont développés plus vite que les œufs E3, suggérant une température d'incubation plus basse dans E3. En effet, la température de l'eau dans cette expérimentation était de 15 ± 1 °C, pendant la première semaine d'incubation, en raison de problèmes techniques, confirmant un développement de 58 jours au lieu de 48 jours pour les œufs E1/E2 (Mangold-Wirz, 1963). Enfin, ces résultats permettent d'identifier, pour un jour de prélèvement donné, le stade de développement correspondant. Ainsi le stade 25 de Lemaire marquant la fin de l'organogenèse est atteint au jour 25 et au jour 32 pour les œufs de E1/E2 et E3, respectivement.

En raison du développement d'une bactériose dans les bacs expérimentaux en toute fin de développement, il n'a pas été possible d'évaluer l'impact des métaux sur le taux d'éclosion des œufs. Néanmoins, le suivi régulier des stades embryonnaires permet d'affirmer que les embryons étaient vivants jusqu'au dernier jour de prélèvement. Ainsi, l'exposition chronique à l'Ag, au Cd et au Cu à des concentrations réalistes (i.e. retrouvées dans l'environnement) n'entraîne pas de mortalité des embryons. Establier et Pascual (1983) ont montré qu'une concentration de 400 $\mu g.l^{-1}$ de Cd et Cu entraînait une mortalité de 60% et 25%, respectivement, des embryons dès les premiers stades de développement. Paulij et al. (1990) n'observent pas d'effet du Cu à 50, 100 et 200 $\mu g.l^{-1}$ sur le pourcentage d'éclosions. Les

concentrations utilisées dans cette étude ($\leq$ 250 $\mu g.l^{-1}$), similaires à celles employées par ces derniers auteurs, n'entraînent pas de mortalité comme l'affirme la littérature.

Au cours des expérimentations, aucune malformation des embryons de seiche n'a été observée en relation avec le niveau d'exposition aux métaux. De nombreuses études rapportent, pourtant, l'apparition d'anomalies morphologiques chez les embryons d'invertébrés exposés à l'Ag et au Cd (e.g. Martin et al., 1981, Lavolpe et al., 2004, Bielmyer et al., 2005) mais pour des concentrations 10 à 100 fois plus grandes que les concentrations maximales testées dans cette étude. Par contre, pour des concentrations inférieures à 250 $\mu g.l^{-1}$, il a été montré que le Cu perturbait l'embryogenèse chez l'oursin *Paracentrotus lividus* (50 $\mu g.l^{-1}$, (Radenac et al., 2001); 30 $\mu g.l^{-1}$, (Warnau et al., 1996)), chez l'huître *Crassostrea gigas* et chez le crabe *Cancer magister* (5.3 $\mu g.l^{-1}$ et 50 $\mu g.l^{-1}$; Martin et al., 1981). L'absence de malformations due à l'exposition aux métaux dans cette étude est néanmoins concordante avec la dynamique de pénétration des éléments tels que l'Ag et le Cd décrite dans le chapitre (Lacoue-Labarthe et al., Chap.I.1). En effet, les œufs de seiche semblent perméables à l'Ag à partir du moment où ils initient leur croissance linéaire par augmentation du volume du liquide péri-vitellin. Concernant le Cd, l'accumulation dans l'embryon n'est observée que dans les derniers stades de développement alors que l'embryon est complètement formé.

Pour des œufs exposés au Cu, le métal s'accumule essentiellement dans la capsule de l'œuf mais pas significativement dans l'embryon et le vitellus (Decleir et al., 1970, Paulij et al., 1990). Establier et Pascual (1983) émettent l'hypothèse, qu'à des concentrations aigues de métaux, les mortalités observées chez les embryons seraient dues aux propriétés antiseptiques du Cu, qui élimine les populations bactériennes symbiotiques de la capsule ne contribuant plus à l'oxygénation de l'embryon, ni à la protection immunitaire (Barbieri et al., 1997). Ces résultats suggèrent donc que le Cu ne pénètre pas dans l'œuf au cours des premiers stades du développement. Néanmoins, les éclosions précoces induites par l'exposition au Cu (Paulij et al., 1990, observations personnelles) laissent penser que le métal peut traverser la capsule en fin de développement. Ainsi, pour ces deux métaux non essentiels et ce métal essentiel, les embryons restent protégés pendant toute la période de l'organogenèse qui se déroule avant le changement de perméabilité de la capsule (Lemaire, 1970, Wolf et al., 1985).

Au cours du développement, la croissance des œufs, suivie pour chaque condition expérimentale, ne montre pas d'impact des métaux sur ce paramètre. Une inhibition de la croissance a été observée par Le Bihan et al. (2003) à partir du second tiers du développement, sur des œufs exposés pendant toute la durée du développement à 0,34 $ng.l^{-1}$,

340 ng.l^{-1}, 340 µg.l^{-1} d'Ag et à 10 mg.l^{-1} de Cu. Le poids de l'œuf est en majeure partie dû aux pertes et aux entrées d'eau au cours du développement. En effet, dans le second tiers du temps de développement, au terme de l'organogenèse, l'œuf commence à gonfler par augmentation du volume du liquide péri-vitellin, nécessaire à la phase de croissance de l'embryon dans la phase de développement post-organogenèse. Gomi et al. (1986) ont montré que ce gonflement résultait d'une entrée d'eau à travers la capsule, suivant une pression osmotique créée par la libération de protéines par l'embryon dans l'espace péri-vitellin. Une inhibition de ce gonflement pourrait donc être due à une action des éléments métalliques sur les mécanismes permettant (1) un changement de la structure physico-chimique de la capsule perturbant sa perméabilité, ou (2) une perturbation du maintien d'un gradient osmotique dans le liquide péri-vitellin par l'embryon. Rosenthal et Sperling (1974) ont montré qu'une exposition au Cd d'œuf de hareng (*Clupea harengus*) changeait les propriétés de la capsule. Une exposition au Cu à 100 µg.l^{-1} entraîne des éclosions précoces pour l'œuf de seiche (Paulij et al., 1990), suggérant une fragilisation de la capsule. Les résultats de Le Bihan et al. (2003) suggèrent que dans le cas d'une exposition aigüe (i.e. de l'ordre du mg.l^{-1}), le Cu perturbe les propriétés physico-chimiques en empêchant le passage de l'eau à travers la capsule et donc le gonflement de l'œuf.

Ikeda et al. (1993) ont montré que les enveloppes de la capsule produites par la glande de l'oviducte étaient nécessaires pour induire l'élévation du chorion (i.e. le gonflement de l'œuf), chez le calmar *Todarodes pacificus*. Il a été suggéré que les protéines responsables du gradient osmotique dans le liquide péri-vitellin et provoquant l'entrée d'eau (Gomi et al., 1986) provenaient de ces couches de la capsule. Il est donc envisageable que les perturbations des propriétés physico-chimiques de la capsule empêchent ces molécules organiques de pénétrer à travers le chorion et de s'accumuler dans l'espace péri-vitellin. Enfin, plus simplement, les métaux en concentration aigüe peuvent provoquer la mort de l'embryon stoppant ainsi le développement normal de l'œuf.

2. **Activités des phosphatases acides et des cathepsines au cours du développement.**

La dégradation des protéines du vitellus accumulées et stockées dans les ovaires de la femelle est essentielle pour le développement de l'embryon. A notre connaissance, les informations rapportées aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés indiquent que des enzymes de type lysosomal (i.e. les phosphatases acides et les cathepsines) sont responsables de la dégradation du vitellus (e.g. Lemanski et Aldoroty, 1974, Carnevali et al.,

1999). Le système lysosomal contient ainsi un ensemble d'enzymes nécessaires à la digestion du vitellus. Néanmoins, au contraire des lysosomes « classiques » qui digèrent rapidement les protéines en acides aminés, les lysosomes présents dans le vitellus ne sont actifs qu'à certains stades spécifiques du développement (Fagotto, 1995).

Dans cette étude, les phosphatases acides ont montré trois périodes distinctes selon leur niveau d'activité. En effet, de l'éclosion au jour 22, l'activité phosphatase acide n'augmente que faiblement alors que l'œuf subit les phases de segmentation et de gastrulation qui s'achèvent au jour 13 (stade 17). Pendant cette période, l'aire embryonnaire s'accroît et se différencie tandis que le vitellus est progressivement recouvert par le syncytium vitellin (Lemaire, 1970), désigné comme responsable de la digestion du vitellus (Boletzky, 1975). Cette phase prépare l'organogenèse qui commence au jour 17 du développement (stade 18) et s'achève au jour 27 (stade 25). L'activité phosphatase acide reste stable jusqu'au jour 22, alors que la mise en place du plan de l'organogenèse nécessite une surface convexe comme celle du vitellus non digéré (Boletzky, 2002). Elle augmente ensuite jusqu'au jour 22, suggérant que les derniers stades de l'organogenèse requièrent plus d'énergie que les précédents. En effet, entre le stade 22 et 25, la taille de l'embryon double : elle passe de 0,8 à 2 mm et nécessite de l'énergie pour la synthèse des tissus. Au jour 27, la phase post-organogenèse commence et l'embryon grandit jusqu'à atteindre une taille de 7 mm à l'éclosion. Cette période de croissance s'accompagne d'une résorption importante du vitellus, ce qui peut expliquer le niveau élevé des activités phosphatases jusqu'à l'éclosion. De plus, dans les 10 derniers jours de développement, la mise en place d'une glande digestive fonctionnelle peut participer à l'augmentation de l'activité enzymatique. Le vitellus du sac vitellin externe est transféré vers le sac vitellin interne en relation avec sa rapide assimilation (Bouchaud et Daguzan, 1989). La digestion des réserves par le syncytium vitellin est progressivement remplacée par la glande digestive de l'embryon (Boletzky, 2002). En effet, à partir du jour 40 (stade 27) la structure des cellules hépatiques se modifie avec l'apparition des cellules à « boules » (Lemaire et al., 1975), qui bien que peu nombreuses prouvent la mise en place de processus de digestion de type intracellulaire. La multiplication des « boules » (i.e. appartenant au système lysosomal) caractérise la glande digestive immature des juvéniles leur permettant une digestion intracellulaire (Boucaud-Camou et Roper, 1995), des réserves vitellines et des premiers nutriments exogènes. Ainsi dans la fin du développement, l'activité enzymatique dosée reflète la mise en place du système lysosomal propre à l'embryon et la synthèse *de novo* des phosphatases acides.

L'augmentation de l'activité phosphatase acide au cours du développement a été décrite chez la punaise *Rhodnius prolixus* (Fialho et al., 2002). Ces protéines catalytiques, comme les autres enzymes impliquées dans la dégradation du vitellus, sont compartimentées dans les organelles appelés « granules vitellins » (i.e. yolk platelets) (Ribolla et al., 2001). Ces granules sont considérés comme étant des lysosomes modifiés (Schuel et al., 1975, Mallya et al., 1992, Fagotto, 1995). Les enzymes sont transmises par la femelle au moment de l'ovogenèse sous une forme inactive (Carnevali et al., 1999). Elles sont donc activées au cours du développement embryonnaire. L'un des deux facteurs responsables de la régulation de la dégradation du vitellus est l'acidification des granules vitellins (Fagotto, 1995). Fagotto et Maxfield (1994b) ont montré, dans l'œuf de grenouille, que l'acidification des granules ne concernait que quelques granules, en réponse aux besoins limités en nutriment pendant les premiers stades embryonnaires. En fin de développement, alors que tout le vitellus est digéré, tous les granules deviennent acides. Ainsi, il semble que l'activité phosphatase acide dans l'œuf de seiche soit soumise à une régulation semblable durant le développement embryonnaire.

Différents types de cathepsines ont été caractérisées dans les réserves vitellines d'œufs de poisson (Kestemont et al., 1999, Carnevali et al., 2001), d'oiseau (Gerhartz et al., 1997), mais aussi d'oursin (Mallya et al., 1992) et d'amphibien (Yoshizaki et Yonezawa, 1998). Dans cette étude, le dosage ne permet pas de distinguer les différents types de cathepsines potentiellement présents. Dans le futur, une caractérisation biochimique sera nécessaire pour identifier le type d'enzyme dosée dans l'œuf de seiche.

L'étude des activités de type cathepsines dans l'œuf entier de seiche montre des variations au cours du développement. Néanmoins, comme pour les phosphatases acides, ces fluctuations sont liées au stade de développement. En effet, dans une première période, correspondant à la phase de gastrulation, les activités enzymatiques tendent à décroître (du jour 0 au jour 8). Les cathepsines s'activent dès que le syncytium vitellin a recouvert le vitellus (jour 13). Ce niveau d'activité se maintient ensuite pendant toute l'organogenèse pour atteindre une activité maximale au jour 27 (stade 25). À partir de ce moment, les activités cathepsines chutent jusqu'au stade 26-27 alors que l'embryon entre en phase de croissance, puis réaugmentent à partir du stade 27, jusqu'à l'éclosion. Peu d'études ont rapporté des variations des activités cathepsines au cours du développement embryonnaire (Kestemont et al., 1999, Carnevali et al., 2001). Chez le poisson, Carnevali et al (2001) observent des activités cathepsines maximales durant les premiers stades de développement suggérant que

ces enzymes sont impliquées dans la mise en place des tissus. Cette hypothèse concorde avec les activités maximales relevées pendant l'organogenèse chez la seiche. De plus, Yoshazaki et al. (1998) décrivent des changements d'activité de la cathepsine D dans l'œuf de Xénope (*Xenopus laevis*), au cours du développement, très semblables à ceux observés dans cette étude. Ainsi, l'augmentation de l'activité enzymatique au début de l'organogenèse serait liée à la transformation de la cathepsine D en une forme plus légère dont l'activité spécifique est 5 fois plus efficace que celle de la forme initiale. Ensuite, ces auteurs justifient la décroissance de l'activité à partir du stade 25 par la disparition progressive de l'enzyme par digestion mutuelle. Ils n'expliquent néanmoins pas l'augmentation de nouveau observée dans les derniers stades de développement. Dans notre étude, cette augmentation coïncide avec l'apparition des lysosomes fonctionnels dans la glande digestive immature (Lemaire et al., 1975). Il est donc envisageable que les activités cathepsines dosées entre le jour 40 et l'éclosion reflètent une production *de novo* et propre à l'embryon d'enzymes digestives de type cathepsines.

3. Réponse des activités phosphatases acides et des cathepsines à l'exposition aux métaux

Malgré le fait que le système lysosomal de la glande digestive chez les céphalopodes soit impliqué dans les mécanismes de détoxication et de stockage des éléments métalliques (Miramand and Bentley, 1992, Bustamante et al., 2002a, 2004, 2006, Miramand et al., 2006), peu d'études se sont intéressées au possible impact de ces métaux sur les enzymes de la digestion intracellulaire (Le Bihan et al., 2004). Ces derniers ont montré une inhibition en conditions *in vitro* des activités spécifiques des cathepsines lors de l'exposition de cellules de la glande digestive de seiche adulte au Cu et au Zn à 1.3 $mg.l^{-1}$. Par contre, à des concentrations 1000 fois plus faibles, l'Ag et le Zn induisent une augmentation de l'activité cathepsine.

Dans cette étude, aucune différence significative n'a été observée en mesurant les activités enzymatiques en fonction de l'âge des œufs. Néanmoins, en étudiant la relation entre les activités enzymatiques et le poids de l'œuf, dont la croissance rapide en fin de développement reflète bien l'avancement dans l'embryogenèse, des effets des métaux sur les phosphatases acides sont observés. Ainsi, concernant ces enzymes, l'Ag et le Cd inhibent l'augmentation de l'activité enzymatique observée en fin de développement. À l'opposé, une exposition à 2,5 $\mu g.l^{-1}$ de Cu stimule l'activité enzymatique. Aucun effet n'a été démontré sur

les activités cathepsines suggérant une action spécifique des métaux dans les conditions de cette étude. Mazorra et al. (2002) ont démontré une inhibition de l'activité phosphatase acide dans la glande digestive du bivalve *Scrobicularia plana* par le Cd et le Cu. Jing et al. (2006) observent aussi une inhibition des phosphatases acides de la glande digestive de l'huître *Pinctada fucata* exposée au Cu. En accord avec les hypothèses formulées précédemment, les résultats de cette étude suggèrent que l'action des métaux porte sur les phosphatases acides produites *de novo* par la glande digestive en cours de maturation de l'embryon.

Les embryons montrent de fortes capacités d'accumulation de l'Ag comparé au Cd. Cette différence pourrait être due à l'état immature de la glande digestive qui ne commence à devenir active qu'à partir du stade 27, avec l'apparition des premiers lysosomes, comme évoqué précédemment. L'acquisition d'une fonctionnalité complète et mature de cet organe n'est atteinte qu'après un mois suivant l'éclosion (Yim et Boucaud-Camou, 1980).

L'étude de la distribution subcellulaire des métaux dans la glande digestive d'organismes adultes a révélé que le Cd et le Cu étaient principalement associés à des protéines solubles du cytosol (Bustamante et al., 2006). Par contre, l'Ag est distribué préférentiellement dans la fraction insoluble comprenant les organelles cellulaires tels que les lysosomes ou les mitochondries. L'inhibition des phosphatases acides, dès une exposition à 25 $ng.l^{-1}$ de Cd, alors que ce dernier est faiblement accumulé dans l'embryon, suggère 1) l'absence de protéines cytosoliques capables de prendre en charge le Cd (Tanaka et al., 1983, Finger et Smith, 1987), 2) une action du Cd sur les « conditions » de fonctionnement des enzymes. Il est, par exemple, possible que le Cd libre dans le cytosol altère la stabilité des membranes lysosomales (Cajaraville et al., 2000) et inhibe ainsi l'activité des enzymes présentes dans les organites. Inversement, la stimulation des phosphatases acides, induite par une concentration de 2,5 $\mu g.l^{-1}$ de Cu, pourrait être la conséquence d'une activation du métabolisme de l'embryon du fait du caractère essentiel de ce métal pour la seiche (Decleir et al., 1970, Decleir et al., 1978). Néanmoins, à partir de 25 $\mu g.l^{-1}$, la concentration de Cu accumulé dans l'embryon semble dépasser le seuil à partir duquel le métal n'apparaît plus bénéfique. À de plus forte concentration, le Cu se révèle effectivement toxique pour les embryons (Paulij et al., 1990).

Concernant l'Ag, l'augmentation des phosphatases acides est perturbée à partir d'une concentration de 1 $\mu g.l^{-1}$. Ceci suggère qu'à partir d'une certaine concentration d'exposition, les mécanismes de détoxication deviennent insuffisants pour éviter les dommages dus à l'Ag accumulé par la voie dissoute. L'immaturité de la glande digestive de l'embryon, dont le

système lysosomal commence à se mettre en place, peut être mis en cause dans l'observation de ces résultats.

Les concentrations en Ag, Cd, et Cu testées dans cette étude n'ont engendré ni mortalité des embryons, ni malformations, ni arrêts de la croissance de l'œuf. Néanmoins, des effets chroniques de ces trois métaux ont été observés sur le poids des juvéniles à l'éclosion ainsi que sur les activités lysosomales dans les derniers stades embryonnaires. Des juvéniles plus petits ou aux capacités digestives réduites à l'éclosion, en été, ont moins de chance de survivre durant les premières semaines de la vie juvénile. Il est donc possible que la contamination côtière ait un impact sur le recrutement des juvéniles de seiche et donc sur le maintien de la population.

Néanmoins, au cours de ces expérimentations, pour des raisons de choix de protocole mais aussi de problèmes techniques au cours de la longue période d'incubation des œufs, les sources de variabilité dans les échantillons sont apparues nombreuses (grand nombre d'œufs dans chaque bac expérimental, variation de la température dans les structures d'élevage, bactériose en fin de développement). En conséquence, il paraît justifié de prendre les résultats concernant l'impact des métaux sur les activités enzymatiques avec précaution. En effet, les métaux ne suppriment pas totalement les activités enzymatiques, mais ralentissent leur augmentation en fin de développement. En revanche, il est possible qu'un suivi de l'exposition chronique aux métaux révèle des effets plus importants chez les juvéniles qui plus est exposés aux métaux *via* la voie dissoute et trophique quelques jours après l'éclosion. Malgré tout, cette étude a permis de définir l'existence d'activité phosphatases acides et cathepsines dans l'œuf entier de seiche et d'en tracer les variations au cours du développement. Des travaux parallèles se sont intéressés à la caractérisation biochimique des phosphatases acides dans l'embryon et dans le vitellus et révèle l'existence d'une forme différente dans le vitellus de celle détectée dans l'embryon (Coulonval, 2005). Ces résultats concordent avec l'augmentation, au stade 27 de développement, des activités des enzymes produites *de novo* par la glande digestive en début de maturation.

Enfin, les effets de l'Ag, du Cd et du Cu observés sur les activités enzymatiques lysosomales posent la question des mécanismes de toxicité des métaux accumulés dans l'embryon en fin de développement. En effet, une inhibition des activités enzymatiques peut découler d'une interaction directe entre le métal et l'enzyme (Mazorra et al., 2002). Ceci paraît peu probable puisque, dans la glande digestive immature des embryons et des juvéniles, les métaux ne suivent pas une distribution identique à celle la glande digestive mature des

seiches adultes. Une autre voie d'action à prendre en compte peut être l'altération de la structure lysosomale ou encore une répression de l'expression des gènes codant pour les enzymes ou des facteurs les régulant par les ions métalliques. Ces effets supposent aussi que les métaux soient libres dans la cellule et donc soulèvent la question de l'existence de protéines de détoxication de type métallothionéines dans l'embryon. De futures études pourront être menées en vue de doser ces protéines dans l'œuf, d'en définir la cinétique au cours du développement, et d'en déterminer les mécanismes d'induction. En effet, il a été démontré par ailleurs un transfert maternel de la tolérance aux juvéniles du cyprinidé *Pimephales promelas* (Peake et al., 2004). Ceci suggère plusieurs explications : 1) un transfert maternel des ARN messagers des métallothionéines (Lin et al., 2000) ou, plus simplement, 2) un transfert maternel du métal par association aux protéines du vitellus (Montorzi et al., 1995). Cette dernière hypothèse peut être une voie non négligeable de contamination de l'embryon s'il est considéré que 1) les œufs sont produits à partir des réserves somatiques des femelles et que 2) ces dernières accumulent les métaux en grande quantité dans leurs tissus.

Remerciements

Ces travaux ont été conduits à la station CREC de Luc-sur-Mer et au LBBM de Caen. Les auteurs remercient vivement les pêcheurs de la côte Ouest du Cotentin, MM. Lapie, père et fils, M. Guenon, M. Le Monnier, M. Longuet pour avoir fourni tous les oeufs nécessaires à cette étude. Que soient remerciés Aline Coulon, Agnès Meslon, Aurélie Montcuit, Hélène Viala et Georges Safi pour leur aide dans les expérimentations d'expositions des œufs, ainsi que tout le personnel technique de la station marine.

Partie 2. Activation de la phénoloxydase dans l'embryon de la seiche commune *Sepia officinalis* et réponses à l'exposition à l'Ag et au Cu

Lacoue-Labarthe T.[1], Bustamante P.[1], Hörlin E.[1], Bado-Nilles A.[1,2], Koueta N.[3], Thomas-Guyon H.[1]

1- Centre de Recherche sur les Ecosystèmes Littoraux Anthropisés, UMR 6217, CNRS-IFREMER-Université de La Rochelle, 22 avenue Michel Crépeau, F-17042 La Rochelle Cedex 01, France

2- Centre de Documentation, de Recherche et d'Expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux (CEDRE), rue Alain Colas, 29182 Brest Cedex, France

3- Laboratoire de Biologie et Biotechnologies Marines, UMR 100, IFREMER-Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex 05, France

Correspondence to: P. Bustamante
CRELA
UMR 6217
CNRS-IFREMER-Université de La Rochelle,
22 avenue Michel Crépeau
F-17042 La Rochelle Cedex 01, France
Phone: +33 5 46 50 02 94
Fax: +33 5 46 45 82 64
E-mail: pbustama@univ-lr.fr

Résumé: Au cours du développement, la capsule de l'œuf de la seiche commune *Sepia officinalis* se modifie et devient perméable à certains métaux les laissant pénétrer à l'intérieur de l'œuf. Ainsi, l'accumulation des métaux dans l'embryon peut engendrer une modulation des activités enzymatiques impliquées dans la fonction immunitaire comme la phénoloxydase (PO). Après avoir étudié le déclenchement du système PO, par transformation de la L-Dopa en quinones à deux stades de développement de l'embryon (début de phase post-organogenèse et dernier stade avant l'éclosion), l'impact d'une exposition d'œufs à 1 $\mu g.l^{-1}$ d'Ag et à 250 $\mu g.l^{-1}$ Cu sur l'expression phénoloxydasique à été suivi durant la fin de développement. L'absorbance à 490 nm atteint un maximum après 96 h d'incubation suggérant que la PO est présente sous une forme inactive (proPO) dans l'embryon. Les réponses de l'activité PO à différents inhibiteurs et activateurs varient entre les deux stades étudiés impliquant un changement de la forme de la protéine, i.e. l'hémocyanine, au cours du développement. L'exposition des œufs à l'Ag entraîne une inhibition de l'activité PO dans l'embryon excepté quelques heures avant l'éclosion où le métal stimule l'enzyme. La prédominance d'une nouvelle forme d'hémocyanine de type « juvénile » sur la forme embryonnaire plus ancienne est soupçonnée dans l'explication de cette observation. Suite à une exposition au Cu, l'activité PO est dans un premier temps activée, puis inhibée au cours de la période d'étude. Ce résultat laisse penser qu'une accumulation progressive du métal essentiel confère un effet stimulant sur l'enzyme, les premiers jours, puis exerce une action toxique une fois une concentration seuil atteinte dans les tissus embryonnaires.

Mots-clés : métal essentiel, métaux toxiques, modulation, capacité immunitaire, embryon, céphalopode

Introduction

Au moment de la ponte, les ovocytes de la seiche commune *Sepia officinalis* sont encapsulés dans trois enveloppes différentes, i.e. le chorion, puis une enveloppe polysaccharidique sécrétée par la glande de l'oviducte et enfin, l'enveloppe sécrétée par les glandes nidamentaires (Jecklin, 1934). Cette capsule délimite ainsi l'espace péri-vitellin dans lequel l'embryon va se développer et croître. Ce dernier est ainsi protégé au cours du développement contre les prédateurs, les attaques microbiennes, ainsi que la dessiccation. La capsule joue le rôle de tampon physique et chimique entre le microenvironnement de l'embryon et le milieu marin (Boletzky, 2003).

Néanmoins, au cours du développement, les propriétés de la capsule se modifient. À partir de la phase post-organogenèse de l'embryon (Lemaire, 1970), la capsule devient perméable à certains éléments métalliques (Lacoue-Labarthe et al., Chap. I.1, Chap. I.2, Chap. I.3). Ces métaux peuvent donc s'accumuler dans les tissus embryonnaires et induire des effets toxiques sur certaines activités enzymatiques comme les phosphatases acides (Lacoue-Labarthe et al., Chap. II.1) impliquées dans les processus de digestion intracellulaire. De plus, la pénétration des métaux à travers la capsule peut potentiellement engendrer une modulation d'autres activités enzymatiques comme celles impliquées dans la fonction immunitaire de l'embryon.

La phénoloxydase (PO) est une enzyme cuivre-dépendante (Coles et Pipe, 1994) détectée dans l'hémolymphe de nombreuses espèces d'invertébrés. Cette enzyme prend une part active dans les mécanismes de défense par le biais de la réaction d'oxydation intervenant dans les processus de réparation des blessures, d'encapsulation et de mélanisation (Söderhall et Smith, 1983). Le système PO a bien été décrit chez les Arthropodes (e.g. Söderhall et Smith, 1983, Johansson et Söderhall, 1989, Hernandez-Lopez et al., 1996) et plus récemment chez les Mollusques Bivalves (e.g. Gagnaire et al., 2004, Siddiqui et al., 2006, Thomas-Guyon et al., *soumis*). Ce système comprend un ensemble de réactions enzymatiques qui s'enchaînent en cascade et aboutissent à l'activation de la pro-phénoloxydase inactive (proPO) en phénoloxydase active (PO) (Figure 1). Cette dernière catalyse la conversion de la dihydrophénylalanine (L-dopa) et de la dopamine en dopaquinone. La dopaquinone est polymérisée à son tour, par une voie non enzymatique (Coles et Pipe, 1994), en un pigment bactéricide (Carballal et al., 1997), i.e. la mélanine (Söderhäll et Cerenius, 1998). Plusieurs composés peuvent activer ce système proPO-PO : les lipopolysaccharides (LPS) ou peptidoglycanes de bactéries ainsi que les ß-1,3-glycanes de champignons (Asokan et al.,

1997, Söderhäll et Cerenius, 1998) qui induisent le clivage de la pro-PO en PO active par digestion protéolytique (Smith et Söderhäll, 1991). La trypsine purifiée, une protéase, stimule l'activation de la PO chez l'huître creuse (Bado-Nilles et Thomas-Guyon, 2003, Gagnaire et al., 2004). Chez les crevettes *Panaeus californiensis* (Hernandez-Lopez et al., 1996) et les Bivalves *Crassostrea gigas* et *Nodipecten subnodosus*, la laminarine augmente l'activité PO (Luna-Gonzalez et al., 2003) alors qu'elle ne montre pas d'effet chez les ascidies *Styela plicata* (Arizza et al., 1995). Le β-mercaptoéthanol, le sodium diethylthiocarbonate (Hellio et al., 2000) et la tropolone (Arizza et al., 1995) ont été, par contre, décrits comme des inhibiteurs spécifiques de la PO capables de supprimer totalement le déclenchement du système proPO-PO chez les Bivalves marins. Ainsi la cascade phénoloxydasique peut être activée ou inhibée par une grande variété de substances spécifiques d'une espèce ou d'un *phylum*. Cette spécificité pourrait découler des différentes enzymes, par leur taille et leur séquence, trouvées chez les animaux, les plantes et les champignons, impliquant donc des types différents de PO (Decker et Jaenicke, 2004). En ce qui concerne les Céphalopodes, une oxydation de diphénols en quinone par l'hémocyanine a été décrite chez le poulpe *Octopus vulgaris* (Salvato et al., 1998). Plus récemment, Siddiqui et al. (2006) ont caractérisé et localisé le site actif de l'enzyme PO sur une sous-unité de l'hémocyanine de la seiche *Sepia officinalis*. L'essentiel de ces travaux ont été menés sur les stades adultes des Invertébrés alors que peu d'études ont été consacrées à l'expression phénoloxydasique au cours des jeunes stades de vie. Il a été démontré une activité PO dans le sac vitellin du phasme *Carausius morosus* (Locci et al., 1998). Bai et al. (1997) ont isolé l'activité PO extraite des œufs de l'escargot *Biomphalaria glabrata*. Chez la moule, *Mytilus edulis*, l'activité PO a été détectée dans les larves, particulièrement au stade véligère, suggérant ainsi une maturation progressive d'une réponse immunitaire (Dyrynda et al., 1995). En revanche, aucune transformation de la L-Dopa n'a été observée chez les larves des Bivales *Crassostrea gigas, Argopecten ventricosus, Nodipecten subnodosus,* et *Atrina maura* (Luna-Gonzalez et al., 2003). Enfin, l'activité PO dosée à des stades précoces du développement de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, varie au cours du développement présentant un maximum en fin de développement (Thomas-Guyon et al., *submitted*). Cette activité mesurée à des jeunes stades de vie répond positivement à des modulateurs décrits chez les adultes : ainsi (1) une activité PO propre au stade de vie existe et (2) les caractéristiques biochimiques de cette activité PO varient au cours du développement (Thomas-Guyon et al., *soumise*). Cette dernière information suggère une évolution, une maturation progressive du système proPO-PO au cours du cycle de vie.

Dans l'environnement marin, les contaminants peuvent avoir une action toxique directe sur les tissus dans lesquels ils sont accumulés, ou peuvent induire des effets plus subtils sur les mécanismes d'homéostasie tels que le système immunitaire (Coles et al., 1994). Cette modulation de l'activité PO par les polluants a été essentiellement étudiée chez les Arthropodes et les Bivalves (e.g. Pipe et al., 1999, Gagnaire et al., 2004, Hernroth et al., 2004). Parmi les polluants organiques, les polychlorobiphényles (PCBs) répriment l'activité de type PO chez la crevette grise *Crangon crangon* après 5 jours d'exposition (Smith et Johnston, 1992). En revanche, l'expression phénoloxydasique est stimulée en présence de fluoranthrène chez la moule *Mytilus edulis* (Coles et al., 1994). En ce qui concerne les métaux, il a été démontré que le manganèse bloquait l'activation du système proPO-PO chez la langoustine, *Nephrops norvegicus* (Hernroth et al., 2004), tandis que mercure inhibe complètement la transformation de la L-Dopa dans l'hémolymphe de *C. gigas*, en condition *in vitro* (Gagnaire et al., 2004).

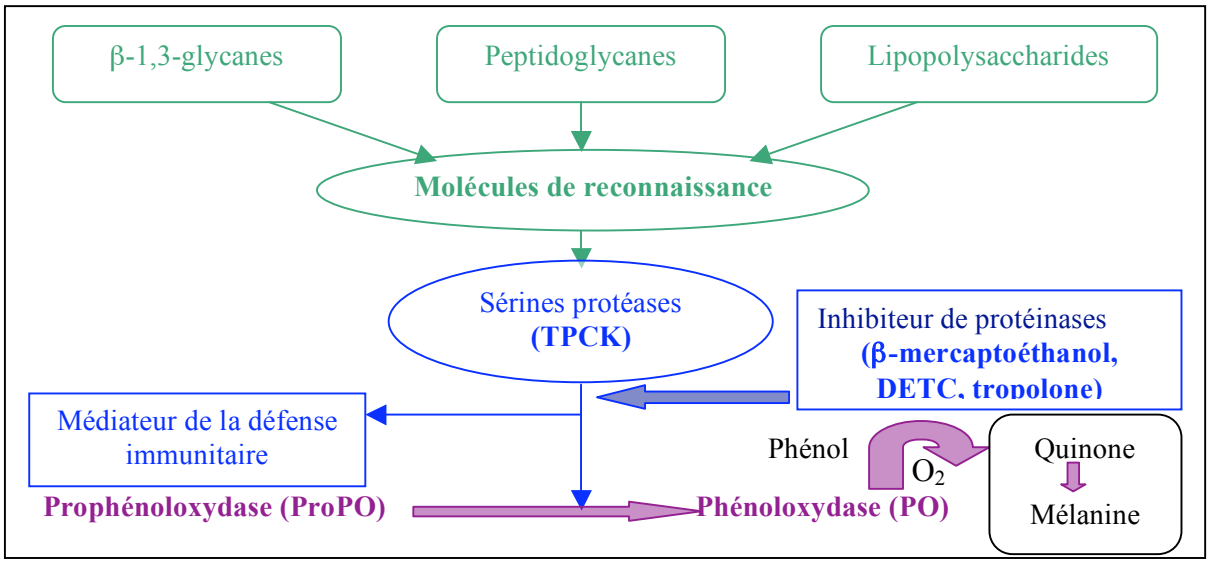

Figure 1. *Sepia officinalis*. Représentation schématique simplifiée de l'activation du système pro-phénoloxydase. Modifié d'après Söderhäll et Cerenius (1998).

Dans ce contexte, le but de cette étude est de déterminer l'effet d'une exposition aux métaux (Ag et Cu) sur l'expression de type PO dans les embryons de seiche, en fin de développement. En effet, l'Ag s'accumule fortement dans les tissus embryonnaires dès la fin de l'organogenèse (Lacoue-Labarthe et al., Chap. I.3). Le Cu, quant à lui, est un co-facteur de la phénoloxydase, donc essentiel à son fonctionnement. Après avoir défini l'activation du

système proPO dans les tissus embryonnaires, l'activité PO a été dosée dans des embryons, du début de la phase post-organogenèse à l'éclosion, suite à une contamination aux éléments métalliques tout au long du développement.

Matériels & Méthodes

5. Organismes, solutions métalliques et protocole expérimental

Les œufs de seiche ont été récupérés sur des casiers de pêcheurs locaux, le long de la côte Ouest du Cotentin (Normandie, France) entre avril et mai 2005. Au laboratoire, ils ont été placés dans les structures d'élevage (Figure 1) décrites par Koueta et Boucaud-Camou (1999), de la station de marine (CREC) de Luc-sur-Mer (Calvados). Avant d'être placés sur des supports flottants, les œufs ont été progressivement acclimatés à la température des structures et séparés des grappes afin d'optimiser leur oxygénation au cours du développement. Ils ont été ainsi maintenus dans un circuit semi-ouvert (aération constante ; température 17°C ; 37 p.s.u ; cycle jour/nuit 12h/12h) avant le début de l'expérimentation.
Pour ces expérimentations, de l'Ag et du Cu ont été ajoutés dans les milieux d'incubation sous forme de sel de chlorure, soit $AgCl_2$ et $CuCl_2$. Les solutions stocks (Tableau 1) ont été préparées à partir d'HCl 0,3 N afin d'obtenir une concentration finale dans le milieu expérimental grâce à l'ajout de quelques millilitres de solutions stocks (typiquement 100 – 1000 µl).

Tableau 1. Préparation des solutions stocks (Ag, Cu) en vue de l'exposition des œufs de seiche à 1 $\mu g.l^{-1}$ d'Ag et 250 $\mu g.l^{-1}$.

Métal	Ag	Cu
Solutions stocks	$AgCl_2$	$CuCl_2$
Concentrations stocks	2 $mg.l^{-1}$	500 $mg.l^{-1}$
Concentrations finales	2 $\mu g.l^{-1}$	500 $\mu g.l^{-1}$

Les œufs (n = 600 par condition) ont été placés pour la durée totale du développement (i.e. 50 jours à 17°C) dans des bacs de 11 l contenant de l'eau de mer naturelle (circuit fermé avec aération constante ; température 17°C ; 37 p.s.u ; cycle jour/nuit 12h/12h). Ils ont reposé sur un tamis les rehaussant du fond et favorisant ainsi la circulation de l'eau dans le bac pour optimiser leur oxygénation. Le plan expérimental comprenait un témoin et une concentration testée pour chaque métal, chaque condition étant réalisée en triplicat. Les concentrations testées ont été les suivantes : 1 µg $Ag.l^{-1}$ et 250 µg $Cu.l^{-1}$. L'eau a été renouvelée chaque jour ainsi que les apports métalliques afin de maintenir une bonne qualité du milieu et les concentrations métalliques constantes.

6. Échantillonnage et bioessais enzymatiques

Au terme d'un mois d'incubation, pour chaque condition expérimentale, des œufs ont été prélevés à intervalle régulier, jusqu'à l'éclosion, pour le dosage de l'activité de type phénoloxydase (n = 4). Ils ont ensuite été immédiatement plongés dans l'azote liquide et stockés à - 80 °C au laboratoire jusqu'aux analyses. Des œufs non exposés aux éléments métalliques ont également été prélevés en vue de la caractérisation de la PO.

Extraction : les œufs ont été disséqués afin de séparer l'embryon des autres compartiments, i.e. le vitellus, la capsule, et le liquide péri-vitellin. Chaque embryon a été pesé puis broyé mécaniquement à l'aide d'un piston plastique adapté au tube de type Eppendorf. L'échantillon était repris dans un tampon CAC (0,01 M CAC, 0,45 M NaCl, 100 mM citrate de sodium, 10 mM $CaCl_2$, 26 mM $MgCl_2$, pH 7) à raison de 8 volumes par gramme d'échantillon. L'homogénat obtenu est centrifugé 20 min à 1500 g à 4 °C. Le surnageant obtenu est utilisé pour les mesures d'activité enzymatique.

Essais enzymatiques : le dosage de l'activité de type phénoloxydase a été adapté du protocole utilisé sur les larves d'huîtres de (Thomas-Guyon et al., *submitted*). La mesure est basée sur la transformation de la L-Dopa (L-3,4-dihyroxyphénylalanine $C_9H_{11}NO_4$, Sigma) en dopachromes. Ainsi, 20 µl d'échantillon ont été rajoutés à 20 µl de L-Dopa (3 $mg.ml^{-1}$) dans 80 µl de tampon CAC. Ce test a été réalisé en triplicats. En parallèle, un témoin négatif a été réalisé (20 µl d'échantillon dans 100 µl de CAC) afin de suivre la coloration naturelle de l'échantillon au cours du temps. De même, la coloration naturelle du substrat a été suivie en ajoutant 100 µl de CAC à 20 µl de L-Dopa, en triplicat. Enfin, pour chaque échantillon, la

transformation de la L-Dopa par l'échantillon a été testée en association avec un inhibiteur ou un activateur de la PO (20 µl d'échantillon, 20 µl de L-Dopa, 20 µl de modulateur, 60 µl de tampon CAC). L'activité de type phénoloxydase est exprimée en absorbance à 490 nm (A_{490}), après 96h d'incubation.

Caractérisation de la PO : l'absorbance due à l'apparition des dopachromes a été suivie régulièrement sur 125 heures d'incubation de l'échantillon avec le substrat L-Dopa pour les embryons non exposés aux métaux,. La cinétique d'activation obtenue, dans ces conditions d'expérience, a permis de déterminer le temps d'incubation pour lequel l'activation du système proPO-like est optimale. L'activité de type PO a ensuite été caractérisée par l'utilisation de modulateurs spécifiques de la PO chez les mollusques marins. Ces essais ont porté sur des embryons prélevés après un mois de développement et sur des embryons prélevés peu avant l'éclosion. Les activateurs de la PO ont été testés: la trypsine purifiée TPCK (N-Tosyl-l-phenylalanine chlorométhyl kétone, Sigma) à 1 $g.l^{-1}$; la phénylthio-urée PTU (1-Phényl-3-(2-Thiazolyl)-2-thio-Urée, Sigma) à 20 mM ; le LPS (Lipopolysaccharides d'*Escherichia coli* 0111 :B4, Sigma) à 1 $g.l^{-1}$. Les inhibiteurs testés on été: le ß-2 mercaptoéthanol (Sigma) à 3,5 mM (5%) ; l'EDTA (Ethylène Diamine-Tétra acétic acide, Sigma) à 5 mM ; le SDS (Dodécyl Sulphate de Sodium, Sigma) à 6 $mg.mL^{-1}$; le Benzamidine (Sigma) à 2,2 mM ; le Zymosan A (Sigma) à 1 $g.L^{-1}$; la Tropolone (Sigma) à 10 mM ; et enfin, l'éthanol absolu.

Résultats

1. Caractérisation de l'activité de type phénoloxydase

La cinétique de l'activité phénoloxydase (PO), dosée dans l'embryon, en fonction du temps d'incubation est présentée par la Figure 2. La transformation de la L-Dopa en quinones augmente au cours du temps puis amorce un plateau à partir de 80 heures d'incubation. Après 96 h d'incubation, les valeurs d'absorbance mesurées ne sont significativement pas différentes des valeurs mesurées à 80 et 125 heures. Ainsi pour l'ensemble des résultats suivants, l'activité PO est exprimée en absorbance à 490 nm après 96 heures d'incubation

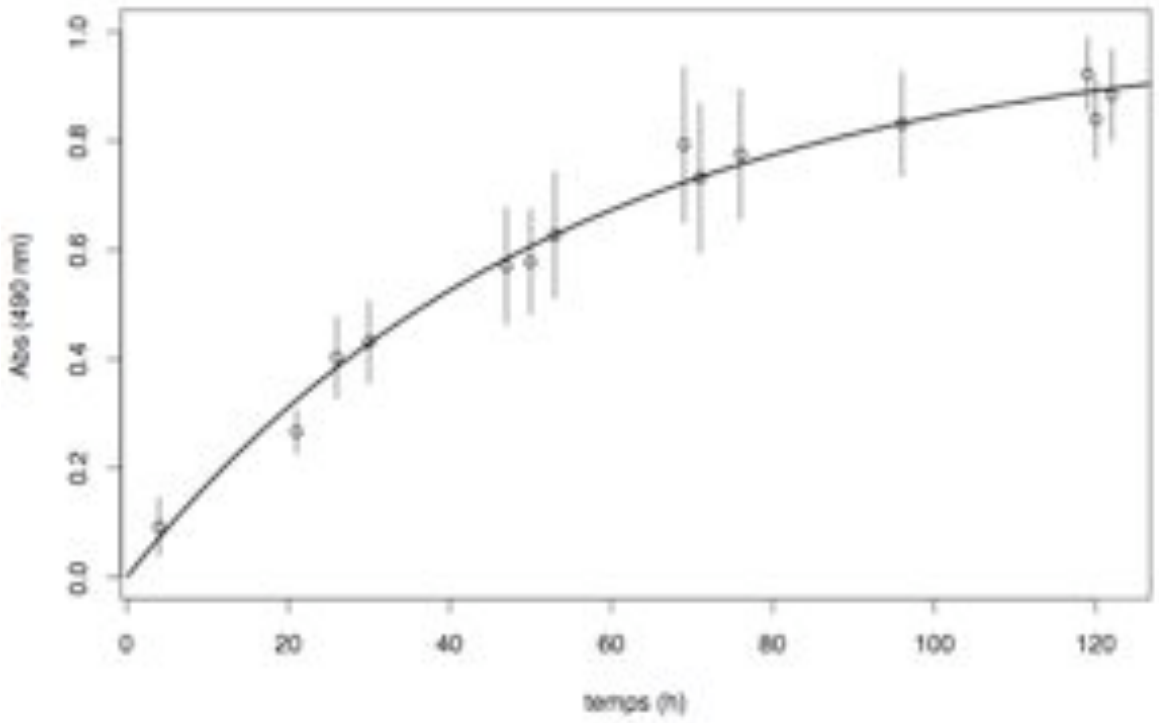

Figure 2. *Sepia officinalis*. Cinétique de l'absorbance (490 nm ; moyenne ± erreur standard ; n = 6) due à la transformation de la L-Dopa en dopachromes dans l'embryon.

Différents modulateurs spécifiques de la PO ont été testés chez des embryons non soumis à la contamination métallique afin de caractériser le déclenchement du système pro-phénoloxydase (proPO). La Figure 3 regroupe les absorbances mesurées pour différents tests d'inhibiteurs, exprimées en pourcentage de l'activité spontanée, chez des embryons en fin

d'organogenèse (A) ou en fin de développement (B). En fin d'organogenèse, l'inhibition des 5 modulateurs testés est totale alors que, pour des embryons proches de l'éclosion, le SDS entraîne une inhibition de seulement 33% par rapport à l'activité spontanée ($p < 0,05$). Ainsi, le système proPO ne répond pas de la même façon aux inhibiteurs selon le stade de développement.

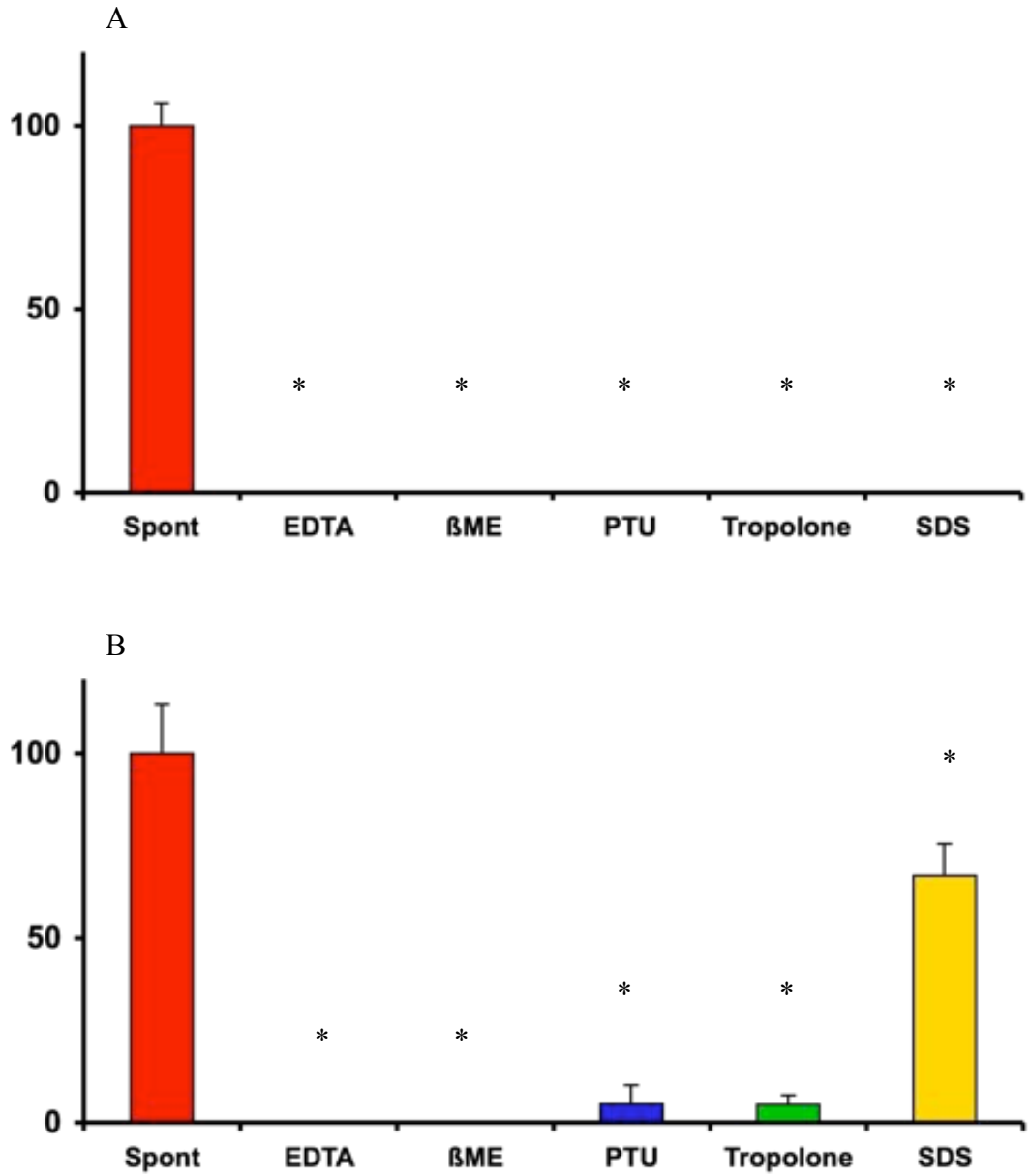

Figure 3. *Sepia officinalis*. Activité phénoloxydase observée suite à l'ajout de différents inhibiteurs spécifiques dans le milieu réactionnel, exprimée en pourcentage d'activité spontanée (% ; moyenne ± erreur standard ; n = 5) chez des embryons en fin d'organogenèse (A) et en fin de développement (B).

La trypsine purifiée (TPCK) et le Zymosan activent significativement ($p < 0,005$) l'activité PO chez l'embryon en fin d'organogenèse (Figure 4A). Cette propriété se retrouve chez l'embryon en fin de développement pour lequel l'activité PO en présence de TPCK est 3 fois plus forte que l'activité spontanée (Figure 4B). Par contre, le Zymosan, comme la Benzamidine ou encore l'éthanol n'activent pas l'activité PO à ce stade de développement. Le déclenchement du système PO est significativement stimulé par les LPS en fin de développement alors qu'aucun effet n'est observé en fin d'organogenèse.

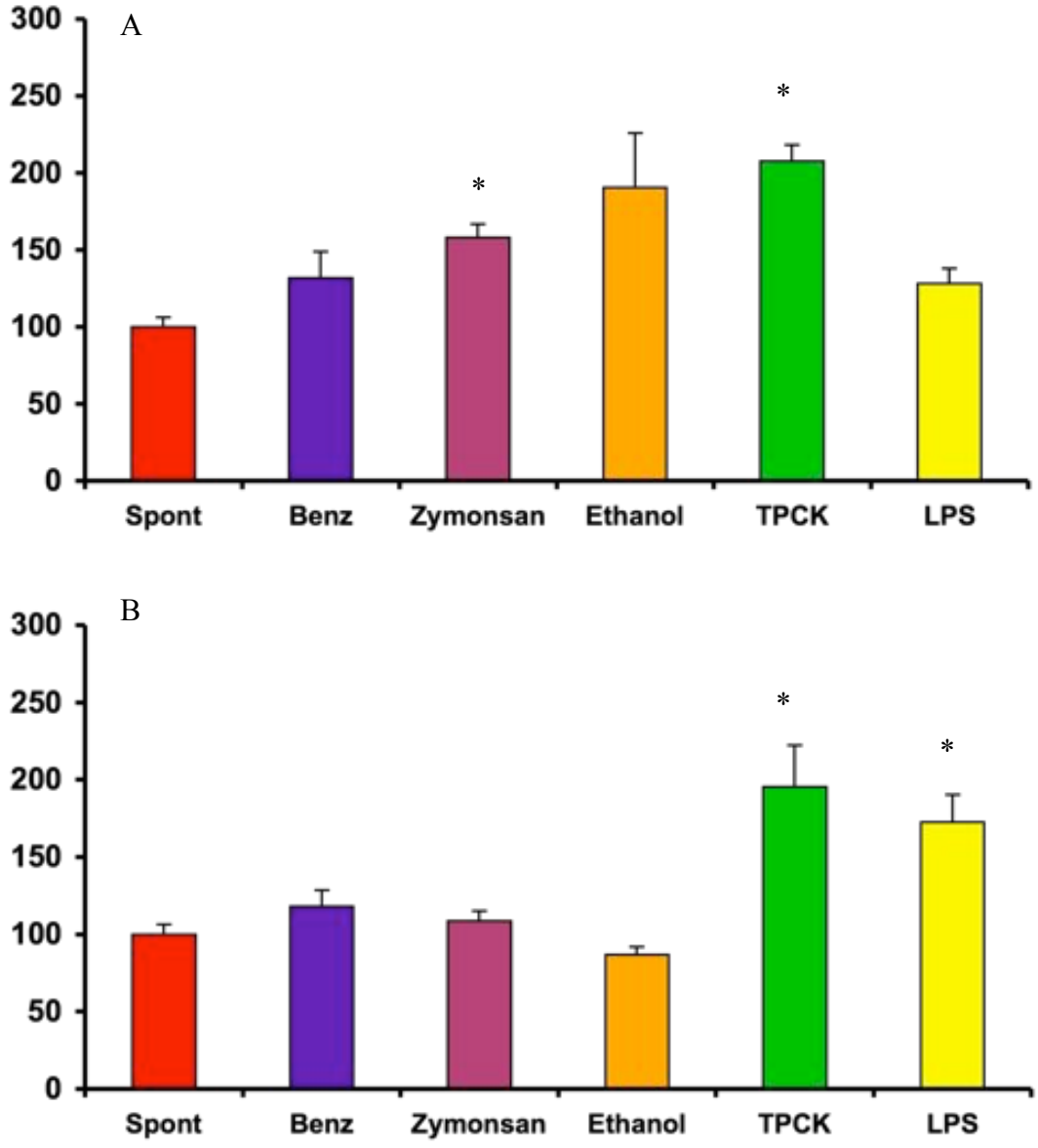

Figure 4. *Sepia officinalis*. Activité phénoloxydase observée suite à l'ajout de différents activateurs spécifiques dans le milieu réactionnel, exprimée en pourcentage d'activité spontanée (% ; moyenne ± erreur standard ; n = 5) chez des embryons en fin d'organogenèse (A) et en fin de développement (B).

2. Modulation de l'activité PO par l'Ag et le Cu en fin de développement embryonnaire

L'activité PO a été suivie de la fin de l'organogenèse (J32) jusqu'à l'éclosion (J48) chez des embryons de seiche témoins et des embryons exposés à 1 µg.l^{-1} d'Ag (Figure 5). De J32 à J44, les embryons exposés à l'Ag présentent une activité PO 2 à 3 fois plus faible que celle mesurée chez les embryons témoins. Par contre, quelques heures avant l'éclosion, l'activité PO chez les témoins décline alors qu'elle augmente chez les embryons exposés au métal et devient donc significativement plus élevée (0,64 ± 0,03 *vs*. 0,44 ± 0,04 chez les contaminés et les témoins, respectivement).

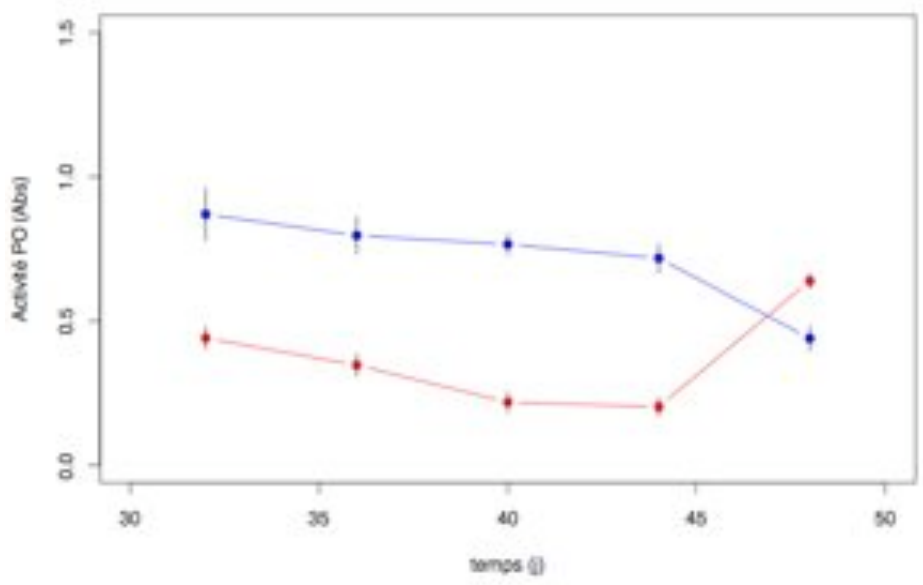

Figure 5. *Sepia officinalis*. Activité de type phénoloxydase (Abs ; moyenne ± erreur standard ; n = 4) mesurée dans l'embryon, de la fin de l'organogenèse (J32) jusqu'à l'éclosion (J48), issue d'œufs témoins (●) et d'œufs exposés à l'Ag (●).

La Figure 6 montre la cinétique de l'activité PO dans les embryons témoins et les embryons exposés à 250 µg.l^{-1} de Cu au cours de la même période de développement. D'une manière générale, le Cu contribue à induire une modulation sur l'activité PO dans les embryons au cours du développement.

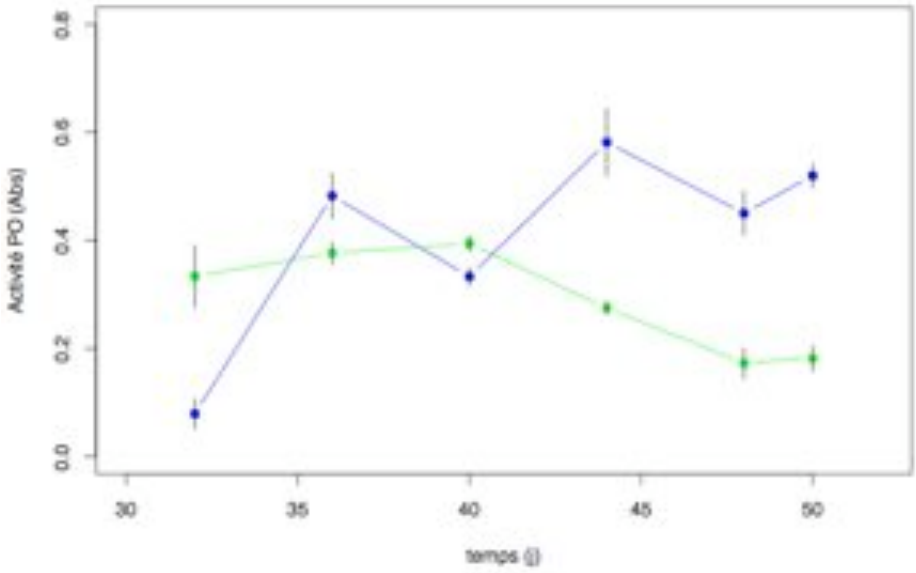

Figure 6. *Sepia officinalis*. Activité de type phénoloxydase (Abs ; moyenne ± erreur standard ; n = 4) mesurée dans l'embryon, de la fin de l'organogenèse (J32) jusqu'à l'éclosion (J50) ; embryons issus d'œufs témoins (●) et d'œufs exposés au Cu (●).

L'activité PO dans les embryons issus d'œufs soumis à une exposition au Cu montre une évolution au cours du développement selon deux phases. Une première phase, entre J32 et J40 pendant laquelle l'activité PO, chez les embryons exposés, est supérieure à celle des témoins (J32 et J40 ; $p < 0,05$) ou similaire (J36). Il est remarquable, tout de même, que l'activité PO chez le témoin à J32 soit plus faible que la valeur attendue au vu de la cinétique observée en Figure 4. Un problème de décongélation entre le prélèvement et l'analyse peut être mis en cause dans l'observation de ces valeurs faibles. Au cours de la seconde phase, de J44 à J50, alors que l'expression phénoloxydasique mesurée dans les embryons témoins se maintient entre 0,45 et 0,58 d'absorbance, l'activité PO dosée dans les embryons exposés au Cu décroît significativement et reste significativement plus faible que les témoins ($p < 0,05$) jusqu'à l'éclosion.

Discussion

La PO est une enzyme cuivre-dépendante (Coles et Pipe, 1994) détectée dans l'hémolymphe de plusieurs espèces d'invertébrés. Elle prend une part active dans les mécanismes de défense par le biais de la réaction d'oxydation intervenant dans les processus de réparation des blessures, d'encapsulation et de mélanisation (Söderhall et Smith, 1983). Dans cette étude, la transformation de la L-Dopa en quinone observée démontre l'existence d'une activité de type PO pendant la période post-organogenèse du développement de l'embryon de la seiche *Sepia officinalis*. L'action d'inhibiteurs spécifiques de la PO permet aussi une confirmation de la nature de l'activité enzymatique mesurée. En effet, la disparition d'une absorbance à 490 nm en présence de la tropolone et du PTU confirme que la transformation de la L-Dopa est due à une activité de type PO et non de type péroxydase. En effet, la tropolone, inhibiteur spécifique de la PO, se révèle être un substrat potentiel pour les péroxydases (Hellio et al., 2007). De même, l'inhibition par le PTU, qui forme des complexes cupriques, confirme que l'oxydation est bien due à une enzyme cuivre-dépendante, i.e. la PO, et non fer-dépendante comme les péroxydases (Arizza et al., 1995).

La détection d'une activité PO chez les embryons de seiche est cohérente avec les observations de Decleir et al. (1970) qui avaient détecté l'apparition d'une couleur brune dans des extraits d'hémolymphes d'embryon suggérant une activité PO. De même, Siddiqui et al (2006) ont clairement déterminé et localisé une sous unité de l'hémocyanine comme étant responsable de l'activité PO chez les seiches adultes. Ainsi, il semble que l'embryon de seiche bénéficie de fonctions enzymatiques impliquées dans le système inné de défense immunitaire au moins dès la fin de l'organogenèse.

La cinétique d'activation du système PO montre un plateau après 96 h d'incubation dans le vitellus et l'embryon. Chez l'huître creuse, le maximum d'activité PO dans la fraction acellulaire de l'hémolymphe a été obtenu après 21 h d'incubation (Gagnaire et al., 2004, Hellio et al., 2007). Par ailleurs, Coles et Pipe (1994) ont mis en évidence une activation du système pro-PO après 96 h d'incubation chez la moule *Mytilus edulis*. Ainsi, ce délai dans l'activité suggère la présence de l'enzyme PO sous une forme inactive transformée progressivement en une forme active (Gagnaire et al. 2004). Cette hypothèse est confirmée par la stimulation de l'activité PO induite par la trypsine purifiée (TPCK) qui entraîne un clivage protéolytique de la proPO en PO.

Le système PO est modulé par différentes substances, ce qui met en évidence des possibilités de régulation à différents niveaux de la cascade de déclenchement du système PO. Le PTU, qui supprime l'augmentation de l'absorbance dans les embryons, a été montré comme étant inhibiteur spécifique de la phénoloxydase chez la seiche adulte (Siddiqui et al., 2006). L'EDTA, et le ß-mercaptoéthanol induisent aussi une inhibition de l'activité PO chez le crabe *Tachypleus tridentatus* (Nagai et Kawabata, 2000) ou chez les juvéniles de *Crassostrea gigas* (Thomas-Guyon et al., *soumise*). En revanche, le SDS inhibe l'expression phénoloxydasique dans nos conditions d'expérimentation alors que ce composé a été décrit comme un activateur chez la moule verte *Perna viridis*, chez la langouste *Panulirus interruptus* et chez la crevette *Penaeus californiensis* (Hernandez-Lopez et al., 1996, Asokan et al., 1997). En effet, en se liant, le SDS modifie la conformation de l'hémocyanine et transforme cette dernière en prophénoloxydase (Nagai et Kawabata, 2000, Decker et Jaenicke, 2004), elle-même activable par la suite, par des protéases. Bien qu'inhibant l'expression PO dans l'embryon de seiche, l'inhibition du SDS tend à s'estomper entre la fin de l'organogenèse et le dernier stade avant l'éclosion. Parmi les activateurs, i.e. la benzamidine, le Zymosan, l'éthanol, la trypsine et les LPS, décrits comme spécifiques de la phénoloxydase (Arizza et al., 1995, Asokan et al., 1997, Hernandez-Lopez et al., 2003), seule la trypsine augmente significativement l'activité PO dans les embryons pour les deux stades de développement étudiés. Par contre, l'effet stimulateur de l'activité PO est perdu entre les stades en fin d'organogenèse et les derniers stades avant l'éclosion. À l'inverse, les LPS n'augmentent significativement l'activité PO qu'en fin de développement.

L'ensemble de ces variations dans la réponse du déclenchement du système PO entre le stade de fin d'organogenèse et le dernier stade du développement laisse penser qu'il existe un changement de l'enzyme responsable de l'activité de type PO. Chez les larves d'huître creuse, l'activité PO augmente en fin de développement ce qui pourrait être dû à un changement de la structure de l'enzyme PO ou bien du site actif de celui-ci durant l'embryogénèse (Thomas-Guyon et al., *soumise*). Plus précisément, Decleir et al. (1971) ont démontré l'existence de 11 fractions protéiques identifiées comme étant des hémocyanines entre le stade embryonnaire et le stade juvénile chez la seiche. Ces formes changent progressivement au cours du développement jusqu'au stade adulte (De Wachter et al., 1988). Ces observations pourraient, en conséquence, expliquer pourquoi (1) la modulation de l'activité PO par les activateurs et inhibiteurs testés dans cette étude diffère entre les deux stades de développement embryonnaire et, (2) pourquoi l'EDTA agit, ici, comme un inhibiteur alors qu'il n'engendre aucun effet chez la seiche adulte (Siddiqui et al., 2006).

Quelques travaux ont étudié l'impact des métaux lourds sur l'activité PO chez les Arthropodes et les Mollusques, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (e.g. Pipe et al., 1999, Gagnaire et al., 2004, Hernroth et al., 2004). Dans cette étude, l'Ag réprime l'expression phénoloxydasique dans les embryons exposés au métal dès le début de la phase post-organogenèse. À partir de ce stade de développement, il a été montré que l'Ag s'accumulait fortement dans les tissus embryonnaires (Lacoue-Labarthe et al., Chap. I.3), pouvant ainsi avoir un effet toxique sur certaines activités enzymatiques de l'embryon. A notre connaissance, l'effet de l'Ag sur le système PO n'a jamais été étudié *in vivo* ou *in vitro* chez les Invertébrés. Néanmoins, on peut évoquer que l'Ag perturbe l'activité spécifique d'autres enzymes Cu-dépendantes comme les cathepsines des cellules hépatiques de seiches (Le Bihan et al., 2004). Malgré tout, il est surprenant d'observer qu'en fin de développement, l'activité PO devient plus élevée chez les embryons intoxiqués que chez les témoins. Il est possible que peu de temps avant l'éclosion, une nouvelle forme d'hémocyanine dite « juvénile » prédomine sur la forme embryonnaire plus ancienne (Decleir et al., 1971, De Wachter et al., 1988). L'Ag ne semble donc pas avoir le même impact sur cette nouvelle forme protéique. Pour vérifier cette hypothèse, de futures expérimentations devront être menées afin d'établir l'impact d'une exposition à l'Ag sur l'activité PO chez les juvéniles pendant les premières semaines suivant l'éclosion.

Si l'on omet le premier point de prélèvement (cf. résultat), l'exposition des œufs de seiche au Cu entraîne une modulation de l'activité PO selon deux phases : en début de période post-organogenèse, le métal semble stimuler l'expression phénoloxydasique. Chez les œufs de seiche, le Cu semble être transféré de la femelle à l'embryon *via* une incorporation du métal dans le vitellus (Decleir et al., 1970, Craig et Overnell, 2003). Ainsi, la concentration du Cu varie peu au cours du développement en condition normale de développement. Néanmoins, Lacoue-Labarthe et al. (Chap.II.1) montrent un impact du Cu sur les activités phénoloxydasiques de l'embryon en fin de développement. Il se pourrait donc qu'un apport exogène puisse induire une pénétration progressive du métal à travers la capsule de l'œuf, comme il a été montré pour le Zn, un autre métal essentiel (Lacoue-Labarthe et al., Chap. I.2.). Ainsi, accumulé en faible quantité dans l'embryon, le Cu semble avoir un effet stimulateur sur l'activité PO. En revanche, passé un certain stade (J40 dans cette étude), l'activité PO est inhibée par le métal. Ce résultat est cohérent avec une accumulation progressive de l'élément, qui peut exercer, une fois une concentration seuil dépassée, un effet inhibiteur (Pipe et al., 1999).

Remerciements

Nous remercions vivement les pêcheurs de la côte Ouest du Cotentin, MM. Lapie, père et fils, M. Guenon, M. Le Monnier, M. Longuet pour avoir fourni tous les oeufs nécessaires à cette étude. Une partie de ce travail a été conduit à la station marine CREC de Luc-sur-Mer (14) dont nous remercions tout le personnel technique.

CHAPITRE III

Premiers résultats expérimentaux sur le transfert maternel des métaux chez la seiche *Sepia officinalis*

Premières expérimentations sur le transfert maternel des métaux chez la seiche commune, *Sepia officinalis*

Résumé : le but de cette étude a été d'apporter les premiers résultats concernant l'incorporation de 8 métaux dans les œufs de seiche, *Sepia officinalis* via le transfert maternel, en utilisant différents radiotraceurs (^{110m}Ag, ^{241}Am, ^{109}Cd, ^{60}Co, ^{134}Cs, ^{54}Mn, ^{75}Se et ^{65}Zn). La seiche a été nourrie quotidiennement avec des crabes contaminés durant 2 semaines jusqu'au commencement de la ponte. Parmi les 8 radiotraceurs, seulement ^{110m}Ag, ^{75}Se et ^{65}Zn sont significativement transférés aux oeufs. La distribution des radiotraceurs dans les différents compartiments de l'oeuf montre que ^{75}Se et ^{65}Zn sont principalement accumulés dans le vitellus alors que l'^{110m}Ag est trouvé aussi bien dans le vitellus que dans la capsule. Pendant le développement embryonnaire, ^{75}Se et ^{65}Zn contenus dans le vitellus sont progressivement transférés dans les tissus de l'embryon, afin probablement de subvenir à ses besoins en métaux essentiels. Bien qu'il n'a pas de fonction biologique connue, l'Ag contenu à la fois dans le vitellus et la capsule est aussi transféré dans l'embryon. Globalement, nos résultats montrent que le transfert de l'Ag, du Se et du Zn existe de la mère à l'oeuf, et cela, au moins durant les 2 semaines précédant la ponte.

Mots-clés : métaux essentiels, éléments toxiques, radionucléide, vitellus, céphalopode

First experiments on the maternal transfer of metals in the cuttlefish *Sepia officinalis*

Thomas Lacoue-Labarthe[1], Michel Warnau[2], François Öberhansli[2], Jean-Louis Teyssié[2], Ross Jeffree[2], Paco Bustamante[1*]

1 Centre de Recherche sur les Ecosytèmes Littoraux Anthropisés, UMR 6217, CNRS-IFREMER-Université La Rochelle, 22 Avenue Michel Crépeau, F-17042 La Rochelle Cedex 01, France

2 Marine Environment Laboratories, International Atomic Energy Agency, 4 Quai Antoine Ier, MC- 98000 Principality of Monaco

*Corresponding author: Prof. Paco Bustamante
CRELA
UMR 6217, CNRS-IFREMER-Université de La Rochelle
22 Avenue Michel Crépeau
F-17042 La Rochelle Cedex 01, France

Phone: +33-546-500-294
Fax: +33-546-458-264
E-mail: pbustama@univ-lr.fr

Abstract

The aim of this study was to provide a first insight on the incorporation of 8 metals in the eggs of the cuttlefish *Sepia officinalis* via maternal transfer, using radiotracer techniques (^{110m}Ag, ^{241}Am, ^{109}Cd, ^{60}Co, ^{134}Cs, ^{54}Mn, ^{75}Se and ^{65}Zn). The cuttlefish was fed daily with radiolabelled crabs for 2 weeks; it then started to spawn every 3 days. Among the 8 tracers, only ^{110m}Ag, ^{75}Se and ^{65}Zn were significantly transferred to the eggs. The radiotracer distribution among the egg compartments showed that ^{75}Se and ^{65}Zn were accumulated mainly in the vitellus whereas ^{110m}Ag was found in similar proportion in the vitellus and the eggshell. During the embryonic development, ^{75}Se and ^{65}Zn contained in the vitellus were progressively transferred to the embryo, likely to supply its metabolic needs in these essential elements. Although it has no known biological functions, Ag contained in both vitellus and eggshell was also transferred to the embryo. Overall, our results showed that transfer of Ag, Se, and Zn does actually occur from a female cuttlefish to its eggs, at least during the last two weeks before spawning.

Key Words: Essential elements – toxic elements – radionuclide – vitellus – cephalopod

Introduction

Metal enrichment of coastal waters mainly originates from river inputs (e.g., Chiffoleau et al., 1994). Exposure to pollutants is therefore of prime concern for biota inhabiting coastal areas, particularly during their early development, which is a stage very sensitive to toxic effects of trace elements (e.g. Calabrese and Nelson, 1974, Warnau et al., 1996).

The common cuttlefish *Sepia officinalis* lives offshore during the winter season and makes long reproductive migrations in spring to mate and to spawn in coastal waters (Boucaud-Camou and Boismery, 1991). The eggs are laid in shallow water areas and are therefore potentially subjected to chronic and/or acute contaminations. Overall, very little attention has been paid to the accumulation and toxicity of metals either on cuttlefish embryos or juveniles. Previous investigations on the behaviour of some metals during the egg development showed that Ag, Co and Zn were accumulated within the embryo (Bustamante et al., 2002b, 2004) whereas Am, Cd, Pb, and V remained mainly associated with the glycoproteinic eggshell (Bustamante et al., 2004, 2006c, Miramand et al., 2006), thereby acting as a shield against potential toxic effects of the latter elements.

In addition to the direct contamination from the environment, the cuttlefish egg could also possibly suffer from a second contamination pathway, viz. the transfer of metals from the gravid female during the prespawning period. Indeed, the somatic tissues of the gravid cuttlefish female are partly used to produce the eggs (Guerra and Castro, 1994) and a fraction of their contaminant burden may therefore be transferred to the eggs and then to offspring. Indeed, despite their short life span, cuttlefish are known to strongly accumulate heavy metals in their tissues and particularly in the digestive gland (Miramand et al., 2006).

In fish, several studies have shown that essential metals (Peake et al., 2004) but also toxic elements (Sellin and Kolok, 2006a) are maternally transferred to the eggs. However, few studies have considered the maternal transfer of metals in invertebrates and, to the best of our knowledge, this issue has never been considered in cephalopods.

The aim of this study was therefore to provide a first insight on the possible incorporation of 8 trace elements in cuttlefish eggs via the maternal pathway. This transfer and the subsequent element distribution in the eggs were studied using gamma-emitting radiotracers and highly sensitive nuclear detection techniques.

Materials and Methods

Five adult cuttlefish were collected by net fishing off Monaco in March and April 2006. They were acclimated to the laboratory conditions (constantly aerated open circuit; flux: 50 l h^{-1}; salinity: 37 p.s.u; temperature: 17 ± 0.5°C; pH: 8.0 ± 0.1; light/dark cycle: 12 h/12 h) for 2 weeks during which they were fed frozen smelt and alive green crabs *Carcinus maenas*. Females and males were then mixed in one 400-l tank to obtain copulation. After the mating, the inseminated females were transferred to another tank and were then fed radiolabelled food (crabs *C. maenas*).

The radiolabelling of the crabs was carried out through feeding *ad libitum* for one week on mussels *Mytilus edulis* previously exposed for 6 days to natural seawater spiked with ^{110m}Ag (0.5 kBq l^{-1}), ^{241}Am (0.1 kBq l^{-1}), ^{109}Cd (1.0 kBq l^{-1}), ^{60}Co (0.5 kBq l^{-1}), ^{134}Cs (0.6 kBq l^{-1}), ^{54}Mn (0.2 kBq l^{-1}) , ^{75}Se (0.3 kBq l^{-1}), and ^{65}Zn (0.6 kBq l^{-1}).

After mating, the female cuttlefish were fed daily radiolabelled crabs during 10 days, then every 4 days to ensure a continuous exposure to the radiotracers until day 26. After each feeding, the dorsal carapace and crab legs, which cuttlefish do not ingest were removed as well as cuttlefish faeces in order to avoid radiotracers recycling through seawater. When females were not fed radiolabelled food, they each received daily a non-contaminated alive crab.

One out of the five female started to spawn at day 10 until day 38. Freshly laid eggs were periodically sampled, weighed and radioanalyzed. After gamma-counting, the eggs were dissected to determine the distribution of the radiotracers between the eggshell and the vitellus. At the end of the experiment, the female cuttlefish was sacrificed, weighed and dissected in order to determine the distribution of radiotracers among its organs and tissues.

The activity of the radiotracers was measured using a high-resolution γ-spectrometry system consisting of four coaxial Germanium (N- or P-type) detectors (EGNC 33-195-R, Canberra® and Eurysis®) connected to a multi-channel analyzer and a computer equipped with a spectra analysis software (Interwinner® 6). The detectors were calibrated with an appropriate standard for each counting geometry used and measurements were corrected for background and physical decay of the radiotracers. Counting times were adapted to obtain relative propagated errors less than 5%. They ranged from 10 min to 30 min for whole eggs and from 10 min to 24h for the dissected organs and tissues.

Results

The activities of the different radiotracers in the crabs, in the gravid female cuttlefish and in its eggs are shown in Table 1. The crabs (viz. cuttlefish prey) displayed high activities in ^{110m}Ag, ^{109}Cd, and ^{65}Zn (26.6 ± 16.8, 69.2 ± 41.7, and 29.1 ± 16.0 Bq g^{-1} wet wt, respectively. The activities in crabs were below 7 Bq g^{-1} wet wt for the other radiotracers, ^{241}Am and ^{134}Cs being the less efficiently accumulated elements (< 0.5 Bq g^{-1} wet wt).

Table 1. *Sepia officinalis*. Whole-body radiotracer activities in Bq g^{-1} wet wt in the crabs used as food (n = 7; mean ± SD), the gravid female cuttlefish (n = 1), and the cuttlefish eggs (n = 250; mean ± SD).

	Activity (Bq g^{-1} wet wt)		
	Crabs	Female cuttlefish	Cuttlefish eggs
^{54}Mn	2.3 ± 0.7	< 0.001	< 0.01
^{60}Co	3.8 ± 1.8	0.009	< 0.01
^{65}Zn	29.1 ± 16.0	0.077	0.20 ± 0.13
^{75}Se	6.7 ± 3.4	0.006	0.04 ± 0.03
^{110m}Ag	69.2 ± 41.7	0.123	0.07 ± 0.05
^{109}Cd	26.6 ± 16.8	0.153	< 0.01
^{134}Cs	< 0.5	0.001	< 0.01
^{241}Am	< 0.5	< 0.001	< 0.01

Among the different radiotracers, ^{241}Am, ^{134}Cs and ^{54}Mn showed very low whole-body activities (≤ 0.001 Bq g^{-1} wet wt; Table 1) in the female cuttlefish that was fed the radiolabelled crabs. In contrast to ^{241}Am for which the very low activities in the tissues did not allowed the determination of tissues distribution, ^{134}Cs was mainly found in the digestive system and ^{54}Mn in the genital system, which contained 97.7 % and 62.7 % of the whole-body activity, respectively (Table 2). The activity of ^{60}Co and ^{75}Se in the whole cuttlefish was below 0.01 Bq g^{-1} wet wt, and mainly present in the digestive system (94.9 and 76.3 % of their whole-body activity, respectively; Table 2). It is worth noting that 19.4 % of the ^{75}Se was found in the genital system of the female cuttlefish, of which 76 % (17.7 % of the whole-body activity) were contained in the nidamental gland and 18 % (3.5 % of the whole-body activity)

Table 2. *Sepia officinalis*. Distribution of the radiotracers (%) among the different organs and tissues of the female cuttlefish fed with radiolabelled crabs at the end of the spawning period.

Body compartments	^{54}Mn	^{60}Co	^{65}Zn	^{75}Se	^{109}Cd	^{110m}Ag	^{134}Cs	^{241}Am
Genital system	**62.7**	**0.2**	**1.2**	**19.4**	**0.1**	**0.5**	**1.6**	**-**
Ovary	1.1	0.1	0.4	3.5	0.1	0.4	1.0	-
Nidamental Gland	60.0	0.1	0.7	14.7	0.1	0.1	0.2	-
Accessory Nidamental Gland	0.5	<0.1	0.2	0.8	<0.1	<0.1	0.4	-
Oviductal Gland	1.1	<0.1	<0.1	0.5	<0.1	<0.1	<0.1	-
Digestive system	**32.7**	**94.9**	**98.0**	**76.3**	**99.8**	**99.4**	**97.7**	**-**
Circulatory organs	**2.6**	**4.9**	**0.2**	**2.2**	**<0.1**	**<0.1**	**0.1**	**-**

in the ovary. Among the investigated tracers, ^{110m}Ag, ^{109}Cd and ^{65}Zn displayed the highest activities in the cuttlefish tissues (0.123, 0.153 and 0.077 Bq g^{-1} wet wt, respectively). They were mainly associated with the digestive system (99.4, 99.8, and 98.0 % of their whole-body activity) and particularly with the digestive gland (data not shown).

Among the 8 elements, ^{241}Am, ^{60}Co, ^{134}Cs and ^{54}Mn were not significantly transferred to the cuttlefish eggs. In contrast, ^{110m}Ag, ^{75}Se and ^{65}Zn were detected in the eggs with the following activities: 0.07 ± 0.05, 0.04 ± 0.03 and 0.20 ± 0.13 Bq g^{-1} wet wt, respectively. The radiotracer distribution among eggshell and vitellus showed that the greatest proportion of ^{75}Se and ^{65}Zn was associated with the vitellus (74.6 and 87.0 %, respectively) whereas ^{110m}Ag was found in similar proportion in both compartments (i.e. 51.8 and 48.2 % in the vitellus and the eggshell, respectively). However, the activity of ^{110m}Ag, ^{75}Se and ^{65}Zn in the whole freshly laid eggs varied along the spawning period (Fig. 1). The first eggs were laid 10 days after the beginning of the exposure period and showed low radioisotope activities (< 0.1 Bq g^{-1}). The highest ^{110m}Ag, ^{75}Se and ^{65}Zn activities (0.14, 0.12, 0.43 Bq g^{-1}, respectively) were measured in the eggs laid 14 days after the exposure beginning. From this time on, ^{75}Se and ^{65}Zn decreased progressively until the end of the spawning period despite the radiolabelled feeding at days 23 and 26. In contrast, ^{110m}Ag activity continued to increase in the eggs between the day 23 and 29.

Discussion

When fed with radiolabelled crabs, the activities of the different radioisotopes in the female cuttlefish tissues varied according to the elements, indicating their specific transfer and accumulation as previously reported (Bustamante et al., 2002b, 2004, 2006d), which was different than the one observed in the spawned eggs. Indeed, four groups of elements could be evidenced: (i) elements not incorporated in the adult cuttlefish tissues (^{241}Am), (ii) elements associated with the digestive system, strongly retained in the digestive gland and therefore not transferred to the eggs (^{109}Cd and ^{134}Cs), (iii) elements associated with the genital system but not transferred to the eggs (^{54}Mn), and (iv) elements transferred to the eggs independently of the adult tissues in which they are accumulated (^{110m}Ag, ^{75}Se and ^{65}Zn).

Firstly, ^{241}Am was poorly incorporated in cuttlefish tissues and subsequently not detected in the eggs. This was obviously due to the very low accumulation efficiency of this element in

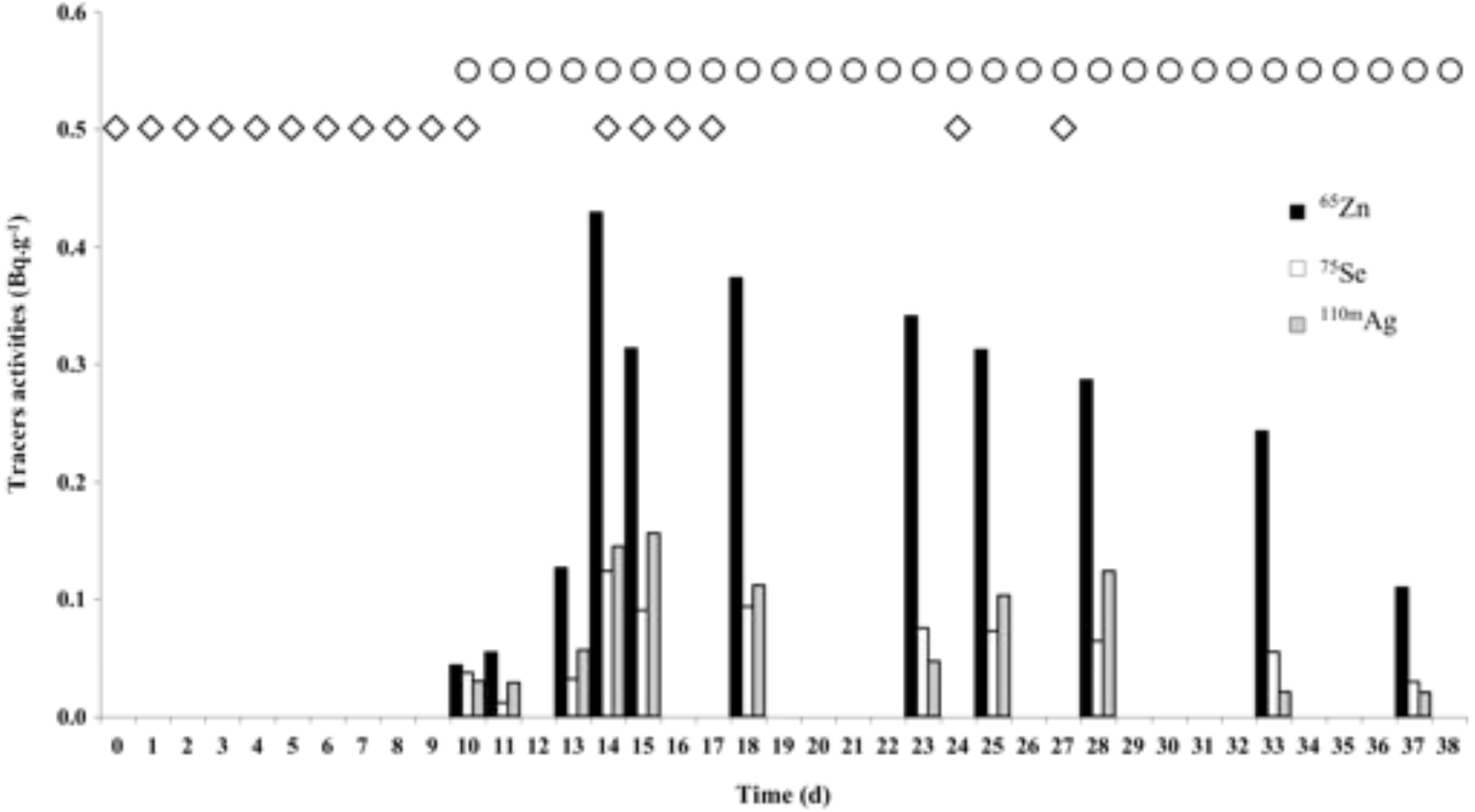

Figure 1. *Sepia officinalis*. Radiotracers activities ($Bq.g^{-1}$) in the freshly laid eggs during the spawning period (○), and time of radiolabelled feeding of the cuttlefish mother (◇).

the crabs used as food and to its subsequent low assimilation efficiency in the cuttlefish (Bustamante et al., 2006d). Secondly, ^{109}Cd and, to a lesser extent, ^{134}Cs, were accumulated in cuttlefish tissues but were not transferred to the eggs. Both tracers remained associated with the digestive system, more particularly with the digestive gland which detoxification and storage role for these elements is well known in cephalopods (e.g. Martin and Flegal, 1975, Bustamante et al., 2002a, 2002b, 2006a). In fish, Cd is transferred to eggs above a given threshold body concentration that exceeds the metallothionein-binding capacity of the fish liver (Sellin and Kolok, 2006a). Such a threshold concentration above which Cd would not be stored any longer in the digestive gland has not been demonstrated in cephalopods and conducting further studies to verify this hypothesis would be most informative.

Similarly to ^{109}Cd and ^{134}Cs, ^{54}Mn was not transferred to the eggs, but in contrast to the former elements, ^{54}Mn was mainly accumulated in the genital system of the cuttlefish, more particularly in the nidamental gland. A previous study has reported that in immature cuttlefish this metal was mainly concentrated in the digestive gland and the cuttlebone (Miramand and Bentley, 1992), suggesting that the target organs of Mn may change with the reproductive stage of the females.

Finally, ^{110m}Ag, ^{75}Se and ^{65}Zn were mainly distributed in the digestive system of the adult female and were the only elements that were transferred to the eggs efficiently. Se and Zn are essential elements that are well-known to be maternally transferred by metabolic mechanisms that depend on the sexual maturation (Montorzi et al., 1995, Unrine et al., 2006). In contrast, Ag has no metabolic role and its transfer to the eggs could represent a maternal depuration mechanism.

In cuttlefish, Zn and Se are stored in the digestive gland (Miramand and Bentley, 1992) and could be a) directly used in the synthesis of yolk proteins and/or b) transferred to the genital system during the sexual maturation. Vitellin is the major yolk protein in cuttlefish eggs; this Zn-binding enzyme is incorporated in the vitellus during the vitellogenesis (Montorzi et al., 1995). According to the latter authors, the vitellin precursor, i.e. vitellogenin, is synthesized in the cuttlefish digestive gland and then transferred to the oocytes, resulting in a concomitant transfer of Zn. Hence ^{65}Zn measured in the egg vitellus in our study could similarly originate from the ^{65}Zn initially that was found to be stored in the digestive gland of the gravid female. This would also explain the very high Zn amounts recorded in oocyte-containing ovaries from mature female cephalopods collected in the field. For example, in the squid *Illex argentinus*, (Gerpe et al., 2000) reported 1056 ± 73 µg wet wt of Zn in the gonad *vs*. 4.5 ± 2.6 µg in the digestive gland.

Previous works have shown that Zn concentrations in the embryos were similar to those measured in the vitellus (Miramand et al., 2006). This suggests that the amount of Zn provided during the vitellogenesis would be sufficient to cover the embryo needs for its complete development. However, it has been shown that waterborne ^{65}Zn accumulated in the embryo during the last third of the egg development period (Lacoue-Labarthe et al., Chap.I.2.). Moreover, juvenile cuttlefish display Zn concentrations that are two-fold higher than in embryos (Miramand et al., 2006). This suggests that embryos and hatchlings are highly dependent on this essential metal to fulfil their metabolic demands and that the maternal transfer could not completely supply the needs.

Se is an essential element, known to be necessary to the proper synthesis and functioning of the glutathione peroxidase, which is a major cellular antioxidant enzyme (Bell et al., 1986). In cuttlefish eggs, Se is mainly found in the vitellus (75 % of the whole egg burden), indicating that specific processes occurred for the integration of this element in the egg. Maternal transfer of Se to the offspring is well documented for fish (Gillepsie and Baumann, 1986) and reptilian (e.g. Unrine et al., 2006) but only few studies have considered invertebrate species (Lam and Wang, 2006). In this latter study, ^{75}Se was found in recently spawned daphnid eggs, which showed that it was transferred from the mother to the eggs. In the sturgeon *Acipenser transmontanus*, Se is bound to the vitellogenin, lipovitellin and phosvitin and is incorporated in the yolk platelets (Kroll and Doroshov, 1991) suggesting a Se transport as yolk proteins from the liver to the eggs via the blood (Unrine et al., 2006). Therefore, similarly to Zn, Se should be first accumulated in the digestive gland of the female cuttlefish and then transferred to the egg yolk. However, in our study, Se was also found in the nidamental gland, suggesting a possible role of Se in the cephalopod egg laying processes.

Finally, contrasting to ^{110m}Ag, ^{75}Se and ^{65}Zn was equally distributed between the vitellus and the eggshell which suggests its integration in the egg through both the yolk components and the nidamental gland involved in the eggshell production. In our study, 99.4 % of the total Ag body burden of the gravid female was stored in its digestive gland, which is in accordance with previous findings (Miramand and Bentley, 1992, Bustamante et al., 2004, Miramand et al., 2006). However, Ag has a short biological half-life in adult cuttlefish as a consequence of its high elimination rate (Bustamante et al., 2004). In addition, it has been shown that in depuration conditions, the body proportion of ^{110m}Ag in the genital system (including the ovary) increased with time (Bustamante et al., 2004), suggesting that maternal transfer could be a way to eliminate a substantial part of the Ag that was previously bioaccumulated in the digestive gland.

Radiotracer activities counted in the first laid eggs showed that metals were already transferred from the mother to the eggs in maximum 10 days. This shows that the metal incorporation occurs in the proximal oviduct, where fully grown oocytes are kept before spawning (Zatylny, 2000). It is known that pheromone peptides are released in the genital tract by these "smooth" oocytes (Zatylny et al., 2000). This implies effective exchanges between the oocytes and the female while the former are at the end of the vitellogenesis process and out the ovary.

The activity of ^{65}Zn and ^{75}Se increased in the newly laid eggs during the first 4 days of spawning. This could be due to a) the obvious longer time spent in the genital tract by the eggs spawned later and/or b) the fact that cuttlefish oocytes undergo an asynchronous maturation (Dhainaut and Richard, 1976). In the latter case, the eggs that were laid later might have been in an earlier maturation stage when the female cuttlefish started to be fed radiolabelled crabs. Hence, the incorporation of the radiotracers could have been more important if the vitellogenesis was not yet completed for them.

After this 4-day period of increase of the tracer activities in the eggs, ^{65}Zn and ^{75}Se slowly decreased in the new laid eggs until the end of the spawning period. This was due to the fact that, after day 17, the daily radiolabelled feeding was stopped and followed by only two pulse feeding at days 23 and 26, which decreased the tracer amounts available for the maternal transfer. In addition, the later the female spawned the more frequent were the unfertilized eggs (viz. without oocytes and vitellus; Boletzky, 1998) found among the spawned egg pool.

The activity of ^{110m}Ag in the spawned eggs showed a similar pattern as ^{75}Se and ^{65}Zn but consistently increased between days 23 and 28. This is to be related to the pulse radiolabelled feeding at the day 23 and 26 and the fact that ^{110m}Ag is rapidly transferred from the mother to the eggs, and especially on the eggshell (Lacoue-Labarthe et al., Chap. I.3.). This could also imply that a fraction of Ag can be directly incorporated in the eggs without intermediary storage step in the mother digestive gland. The rapid synthesis of the eggshell by the oviductal and nidamental glands which results in enwrapping the oocyte just before spawning can therefore be viewed as a rapid and efficient pathway of the maternal transfer of this metal to the eggs.

In conclusion, among the 8 radiotracers present in the prey of the female cuttlefish, only two essential elements (i.e. Zn and Se) and one non-essential metal (i.e. Ag) were transferred efficiently to the vitellus of the eggs. Moreover, ^{110m}Ag was accumulated in the eggshell, probably during the eggshell synthesis by the oviductal and nidamental gland secretions.

These three elements were also detected in the juveniles (results not shown) at the end of the embryonic development confirming the effective transfer from the mother to its offspring.

Acknowledgements

The IAEA is grateful for the support provided to its Marine Environment Laboratories by the Government of the Principality of Monaco. MW is an Honorary Senior Research Associate of the National Fund for Scientific Research (NFSR, Belgium). This work was supported by the IAEA and CRELA (Université de la Rochelle).

Discussion Générale et Perspectives

Discussion générale et perspectives

Le cycle de vie de la seiche commune, *Sepia officinalis*, est caractérisé par des migrations saisonnières liées à la reproduction. En effet, au printemps, les animaux matures partent du large vers la côte pour se reproduire, pondre et mourir. Les œufs sont pondus dans les eaux littorales, sujettes à la contamination métallique d'origine anthropique. Ainsi, pendant le développement embryonnaire, dont la durée peut s'étendre sur plus de 2 mois dans une eau à 15 °C, les œufs sont exposés aux métaux dissous dans l'eau. Par conséquent, la question de l'impact de ces éléments, connus pour leurs propriétés embryotoxiques chez les invertébrés, se pose concernant les jeunes stades de vie.

La seiche, comme les autres céphalopodes, est très sensible aux variations du milieu, notamment lors des premiers stades de vie. De la température, ainsi que de la disponibilité de la nourriture au moment de l'éclosion, dépendent les chances de survie des nouveaux-nés puis des juvéniles. Ces paramètres déterminent donc directement le recrutement des seiches à l'automne, lors de la migration vers le large, et par conséquent, le renouvellement de la population et le maintien des stocks. La contamination par les métaux dans la zone de recrutement des juvéniles peut donc potentiellement influer sur le devenir de la population de la seiche.

Les œufs de *Sepia officinalis* sont déposés les uns après les autres par la femelle, formant ainsi des grappes d'œufs noirs, aussi appelés « raisins de mer ». Chaque œuf, d'un diamètre de 1,5 à 2 cm contient un ovocyte entouré d'une première membrane transparente et élastique, le chorion, puis d'une capsule plus épaisse, imprégnée d'encre noire, dont l'origine est double. Une première enveloppe gélatineuse est déposée par la glande de l'oviducte. Une seconde, composée de polysaccharides, est constituée de plusieurs couches enroulées autour de l'œuf. Ainsi, chaque œuf est protégé par une capsule synthétisée au moment de la ponte. Il est reconnu que cette capsule protège ainsi l'embryon du milieu extérieur, jouant un rôle de tampon face aux variations physiques et chimiques du milieu (Boletzky, 1986). Elle délimite un microenvironnement, i.e. l'espace péri-vitellin dans lequel l'embryon se développe. Néanmoins, elle subit différentes modifications structurelles au cours du développement, se polymérisant pendant les premiers jours au contact de l'eau de mer, puis se dilatant ensuite progressivement au fur et à mesure de la croissance de l'œuf.

1. Incorporation des métaux dans l'œuf de seiche commune, *Sepia officinalis*

Lors d'expositions aux éléments métalliques dissous pendant tout le temps de développement, **l'œuf de seiche** montre **des grandes capacités d'accumulation, néanmoins** variables selon les éléments avec Ag ≈ ^{241}Am > Pb > Co ≈ Zn >> Hg > Cd > Mn >> ^{134}Cs. De plus, tous les éléments ne montrent pas la même dynamique d'accumulation (Tableau 1). L'étude de la distribution des métaux au cours de l'embryogenèse indique que **la capsule** est **le compartiment majeur** impliqué dans leur incorporation au niveau de l'œuf entier. En effet, de la ponte à la fin de l'organogenèse de l'embryon, les métaux ne sont associés qu'à la capsule, les mécanismes contrôlant leur accumulation dans l'œuf étant les mêmes que ceux qui gouvernent leur association avec les enveloppes polysaccharidiques. À ce stade, **la capsule** joue le rôle d'une **barrière protectrice** contre l'accumulation des éléments traces dans l'embryon. En revanche, **à partir de la phase de croissance** de l'œuf, certains éléments sont détectés **dans l'embryon** (Tableau 1), montrant que **la capsule devient perméable** à leur pénétration. En effet, au cours du développement, les enveloppes de l'œuf subissent plusieurs modifications structurelles pouvant en partie expliquer ces changements de propriétés.

Tableau 1. Synthèse des cinétiques d'accumulation dans l'œuf entier, la capsule et l'embryon au cours du développement ; A : accumulation ; P : perte ; S : saturation. Valeur du ratio-quantité accumulé dans l'œuf entier / concentration dans le milieu expérimental (LCR) et phénomène de translocation de la capsule vers l'embryon au cours du développement.

	Œuf entier	Capsule	Embryon	LCR	Translocation
Ag	A	S + P	A $^{+++}$	1700	Oui
^{241}Am	A	A	Non détecté	1400	Non
Cd	S + P	S + P	A $^{+}$	300	Non
Co	A	A	A $^{+}$	1100	Oui
^{134}Cs	A	Cs	A $^{+++}$	4	Non
Hg	A	A	A $^{+++}$	500	Oui
Mn	S	S	A $^{++}$	120	Non
Pb	A	A	Non détecté	1300	Non
Zn	A	A	A $^{+++}$	1100	Oui

Cependant, les éléments traces n'ont pas tous la même affinité pour la capsule. Les composants de la capsule permettent donc une fixation plus au moins spécifique selon les éléments et variable au cours du temps. **La capacité d'accumulation des** éléments traces **dans la capsule peut être expliquée par sa composition chimique** présentant des groupements favorables à la liaison des éléments métalliques. La mucine, riche en résidus cystéine, et abondamment présente dans la capsule des œufs de Sépiidés (Boletzky, 1983) est un bon candidat pour expliquer la fixation des métaux de classe B. D'autres glycoprotéines, riches en acides aminés à groupes carboxyliques sont susceptibles de fixer les éléments de classe A ou de transition.

Pendant le premier mois du développement, i.e. jusqu'à la fin de l'embryogenèse, la capsule joue donc un rôle de barrière contre la pénétration des éléments métalliques. Néanmoins, cette **capacité de protection de la capsule de l'œuf paraît limitée** (1) **selon les éléments** et (2), **dans le temps**, i.e. en fonction des stades de développement. Ce phénomène peut être discuté en termes de perturbation des sites de liaison des éléments traces au niveau de la capsule, mais aussi en fonction des processus biologiques liés à l'embryogenèse.

D'une part, l'^{241}Am, le Co, le Hg, le Pb et le Zn s'accumulent dans la capsule durant tout le développement embryonnaire. D'autre part, le Mn atteint une saturation à partir d'un mois de développement, saturation qui est maintenue jusqu'à l'éclosion, tandis que l'Ag et le Cd sont perdus à partir du début de la phase de croissance de l'œuf. Dans ce contexte, il est envisageable que plusieurs phénomènes participent à ces comportements différents. D'abord, (1) les sites de liaisons des métaux deviennent limités par la réaction chimique de polymérisation de la capsule durant la première semaine de développement; ensuite, (2) la quantité d'eau contenue dans la capsule, variable au cours du temps, peut modifier l'accessibilité à ces sites. De plus, (3) le gonflement de l'œuf peut augmenter la surface de fixation, i.e. la capacité d'adsorption des métaux ; enfin, (4) les sites de liaisons peuvent être physiquement perdus au cours du développement en raison de la délamination de la capsule. Chacune de ces hypothèses, ou une combinaison parmi ces quatre, est susceptible d'expliquer les différentes cinétiques d'accumulation, au niveau de la capsule, selon les éléments considérés. Les variations du nombre et de la nature des liaisons peuvent ainsi moduler les capacités de fixation et d'accumulation des éléments traces par la capsule de l'œuf.

D'autre part, la période de gonflement qui s'initie au début de la période de croissance de l'embryon, i.e. à la **fin d'organogenèse**, se révèle être une période particulièrement critique en ce qui concerne le comportement des éléments traces vis-à-vis de l'œuf. A ce stade l'espace péri-vitellin se forme pour laisser l'embryon grandir jusqu'à l'éclosion et s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité de la capsule aux gaz (Wolf et al., 1985) et à l'eau (Gomi et al., 1986). Cette étude a montré, donc, que ce changement de perméabilité de la capsule concernait aussi les éléments traces. **Ces derniers s'accumulent** ainsi avec une affinité variable **dans l'embryon** suivant cet ordre : Ag >> Zn > Hg > Mn > Co ≈ Cd > ^{134}Cs. En revanche, il est remarquable que l'^{241}Am et le Pb ne pénètrent pas du tout (i.e. ne sont pas détectés) dans les compartiments internes de l'œuf. D'une part, cette sélectivité est indépendante du caractère essentiel ou non essentiel des métaux : par exemple, l'Ag qui s'accumule le plus dans l'embryon n'a aucun rôle essentiel connu dans le métabolisme des céphalopodes. D'autre part, l'affinité des éléments traces pour les groupements riches en S ou O, i.e. en fonction de leur classification chimique, n'apparaît pas déterminante pour ce phénomène. En effet, l'embryon accumule aussi bien le Hg et le Zn, soit respectivement, un métal de classe B et un métal de Transition. De même, deux éléments chimiquement proches sur le tableau périodique comme le Hg et le Pb, ou le Cd et le Zn n'affichent pas les mêmes capacités à passer la barrière de la capsule.

Dans ce contexte, les processus biologiques affectant les propriétés de la capsule doivent jouer un rôle déterminant dans les mécanismes de pénétration et d'accumulation des éléments traces dans l'embryon. Ainsi, les éléments diffusent à travers les différentes couches des enveloppes polysaccharidiques. Or, la composition chimique des sécrétions nidamentaires diffère des mucosubstances d'origine oviductaire chez le calmar *Todarodes pacificus* (Kimura et al., 2004). Une sélectivité de la capsule peut donc s'exercer des couches externes vers les couches internes avant d'atteindre le chorion.

Cette dernière membrane dérive d'une matrice extracellulaire sécrétée par les cellules folliculaires lors de l'ovogenèse. Peu de données informent de la perméabilité de cette membrane au cours du développement. Lors de la fécondation, le chorion devient imperméable et « durcit » pour empêcher la polyspermie de l'ovocyte. Néanmoins, chez les poissons, il a été montré que certains ions comme H^+, Na^+, K^+ et Cl^- pouvaient passer librement du milieu extérieur au liquide péri-vitellin (Alderdice et al., 1979b). Le Na s'accumule rapidement dans le liquide péri-vitellin des œufs de la truite, *Oncorhynchus*

mykiss, dans les derniers stades de développement et semble diffuser passivement à travers le chorion (Barrett et al., 2001). Des molécules organiques des couches internes de la capsule pourraient aussi traverser le chorion et provoquer le gonflement de l'œuf par osmose, le chorion étant alors perméable à l'eau (Gomi et al., 1986, Ikeda et al., 1993). En revanche, de grandes molécules sécrétées par l'embryon à l'intérieur de l'œuf, e.g. des protéines « tranquillisantes », restent retenues dans le liquide péri-vitellin (Boletzky, 1983). Cependant, les capacités sélectives du chorion à laisser passer des composés organiques ou inorganiques, restent globalement mal connues chez les céphalopodes.

L'accumulation de l'Ag, du Cd, du Co, du ^{134}Cs, du Hg, du Mn et du Zn prouve un transport effectif de ces éléments de l'extérieur vers l'intérieur de l'œuf. Néanmoins, la dynamique inverse reste encore inconnue, exceptée pour le ^{134}**Cs** qui **suit précisément les mouvements de l'eau**. En **condition de décontamination**, **les embryons continuent d'accumuler** certains éléments traces initialement associés à la capsule (Tableau 1), ce qui est particulièrement vérifié dans le cas de **l'Ag**. En effet, une partie des éléments perdus par la capsule intègre l'embryon alors que l'autre partie est évacuée dans le milieu. Ce déplacement peut être déterminé par les capacités de diffusion des éléments à travers la capsule, et par l'existence de potentiels gradients en faveur d'une pénétration vers le liquide péri-vitellin. Une autre hypothèse possible est la prise en charge des éléments traces par des molécules organiques diffusant à travers la capsule et traversant le chorion avant de s'accumuler dans l'espace péri-vitellin, ce qui paraît plausible puisque la perméabilité de l'œuf aux éléments traces coïncide avec l'entrée d'eau dans le liquide péri-vitellin (cf. mécanisme de gonflement de l'œuf). Ainsi, la perte potentielle d'un élément trace par les tissus embryonnaires est complètement occultée par ce phénomène de translocation. Il apparaît donc que la pénétration des éléments traces est plus importante que la perte par les compartiments internes. La capsule apparaît alors comme un système tampon ou de réserve capable de fixer les éléments traces en début de développement, puis de les redistribuer vers l'embryon dès qu'elle devient perméable à leur pénétration. Cette propriété de la capsule peut se révéler déterminante lorsque les besoins en éléments traces essentiels de l'embryon dépassent les quantités d'éléments incorporés dans le vitellus lors de l'ovogenèse. Barrett et al. (2001) ont démontré que le Ca, par exemple, pouvait être accumulé de façon non systématique par l'embryon de truite, *Oncorhynchus mykiss*, en fin de développement. En revanche, la capsule comme réserve d'éléments traces pour l'embryon peut devenir un handicap dans le cas de la fixation de métaux non-essentiels comme l'Ag ou le Hg.

Cette discussion au sujet des propriétés sélectives de diffusion de la capsule considère les enveloppes de l'œuf comme étant des éléments inertes. Néanmoins, dans les multiples couches de la capsule, différentes populations bactériennes sont incorporées par la femelle au moment de la synthèse de la capsule (Bloodgood, 1977, Grigioni et al., 2000). Les femelles possèdent en effet une dense communauté bactérienne associée aux glandes nidamentaires suggérant un transfert maternel de ces symbiontes. Cependant, les bactéries associées à l'œuf ne sont pas encore caractérisées. Chez d'autres céphalopodes, elles semblent toutefois avoir des fonctions anti-microbiennes (Barbieri et al., 1997). Chez la seiche géante *Sepia apama,* la présence des bactéries est mise en évidence par une consommation d'oxygène constante au cours du développement (Cronin et Seymour, 2000). Leur activité métabolique peut donc influencer le comportement des éléments traces vis-à-vis de la capsule. Par exemple, l'association du Mn, dont la cinétique montre une saturation maintenue jusqu'à l'éclosion, pourrait ainsi être un élément régulé par les activités microbiennes.

La capsule, i.e. les enveloppes polysaccharidiques d'origine nidamentaire et oviductaire, ainsi que le chorion, joue un rôle fondamental dans le comportement des éléments traces vis-à-vis des œufs de seiche. En effet, elle lie ces éléments, les fixe, les bloque, puis les laisse passer de façon sélective, les relargue et cela en fonction du temps de développement. Néanmoins, pour mieux comprendre ses propriétés, et les mécanismes de pénétration des éléments traces dans l'œuf de seiche, d'autres études complémentaires peuvent être envisagées.

Premièrement, il serait intéressant d'identifier les composants de la capsule impliqués dans la fixation des différents éléments, justifiant ainsi les différentes capacités d'accumulation. De plus, la connaissance de l'évolution de la composition chimique des enveloppes, au cours du développement, suite aux phénomènes de polymérisation mais aussi d'étirement conséquent au gonflement de l'œuf, apporterait des arguments supplémentaires nécessaires à l'explication des cinétiques observées.

Ensuite, il serait envisageable d'étudier la perméabilité aux éléments traces d'une capsule isolée, i.e. l'ensemble des enveloppes d'origine oviductaire et nidamentaire. Parallèlement, afin d'apprécier les propriétés spécifiques au chorion, la bioaccumulation des éléments métalliques pourrait être étudiée sur des ovocytes mûrs, non fécondés et fécondés artificiellement.

Enfin, il serait intéressant d'étudier les cinétiques de bioaccumulation des éléments traces chez d'autres modèles comme les poulpes dont les œufs ont la particularité d'être dépourvus

d'enveloppes secondaires (Boletzky, 1986), n'étant entourés que d'un chorion riche en soufre (Villanueva, 1992). Dans ce contexte, les œufs de poulpe sont susceptibles d'accumuler les éléments traces ayant une affinité pour le soufre. Néanmoins, l'absence de sécrétions polysaccharidiques secondaires peut réduire ces capacités d'accumulation. En effet, il a été montré que les œufs de hareng, *Clupea harengus*, accumulaient le Cd plus efficacement que les œufs de flet *Platichtys flesus*, dont la capsule était beaucoup plus fine (Von Westernhagen et al., 1974, 1975). Ainsi, les enveloppes épaisses de l'œuf de seiche confèrent un potentiel d'accumulation supposé plus important que pour les œufs de poulpe.

2. Effets toxiques de l'Ag, du Cd et du Cu sur le développement de l'œuf de seiche et les activités enzymatiques digestives et immunitaires de l'embryon

L'accumulation observée des éléments traces dans les tissus embryonnaires pose la question de leur toxicité vis-à-vis de l'embryon en développement. Les études connues traitant cette question chez les œufs de céphalopodes se sont concentrées sur l'impact de quelques métaux suite à des expositions à des concentrations aiguës (de la centaine de $\mu g.l^{-1}$ au $mg.l^{-1}$) à travers l'observation de différents paramètres du développement comme la croissance de l'œuf, les malformations à l'éclosion, les taux d'éclosion, ou encore les temps de développement (e.g. Establier et Pascual, 1983, Paulij et al., 1990, Le Bihan et al., 2003, Sen et Sunlu, 2007). En revanche, il est remarquable que pour les concentrations d'Ag, de Cd et de Cu utilisées dans cette étude, la croissance des œufs ne semble pas affectée. De plus, les embryons ne présentent ni malformations, ni augmentation de la mortalité au cours du développement. Ces résultats suggèrent, d'une part, que **les embryons sont protégés de l'action toxique de ces métaux pendant la période d'organogenèse,** ce qui est en accord avec l'imperméabilité de la capsule déterminée pendant le premier mois du développement. D'autre part, en phase post-organogenèse, ces observations sont cohérentes avec la pénétration limitée du Cd, mais au contraire surprenantes, pour l'Ag, puisque celui-ci s'accumule fortement dans les tissus de l'embryon (Chap.I.1). Concernant le Cu, sa pénétration dans l'œuf au cours de l'embryogenèse reste controversée entre les études de Decleir et al. (1970) qui démontrent que la totalité du Cu mesuré dans l'embryon provient du vitellus et donc de la mère, et les travaux de Paulij et al. (1990) qui soupçonnent une accumulation du métal d'origine exogène dans le fluide péri-vitellin lors des derniers stades, causant alors des éclosions prématurées.

En fait, il est probable qu'à des concentrations supérieures à 200 $\mu g.l^{-1}$, le Cu perturbe les propriétés physico-chimiques de la capsule. Ce phénomène a été précédemment bien décrit pour les œufs des harengs *Clupea harengus* et *C. pallasi* exposés au Cd (Alderdice et al., 1979ac). Le Cd peut entrer en compétition avec le Ca, essentiel au phénomène de polymérisation de la capsule des œufs de poissons. La liaison du métal avec les polysaccharides de l'enveloppe entraîne une fragilisation de cette dernière, et une résistance moindre à l'étirement pendant la période de gonflement de l'œuf. Les capacités d'élasticité de la capsule étant ainsi réduites, l'œuf, plus fragile, est sujet à des éclosions précoces (Alderdice et al., 1979c). Dans le cas des œufs d'octopode, comme cela a été précédemment évoqué, une accumulation des métaux viendrait perturber directement le chorion qui n'est pas entouré par les enveloppes secondaires. Il serait donc intéressant de déterminer si les métaux ont un impact sur l'intégrité du chorion à des concentrations inférieures à celles observées chez les œufs de Sepiidés. Enfin, pour des concentrations supérieures à 400 $\mu g.l^{-1}$ de Cu, les mortalités observées aux premiers stades de développement sont attribuées à l'effet antiseptique du Cu sur les populations bactériennes symbiotes de la capsule de l'œuf (Establier et Pascual, 1983) et non à une action directe du métal sur l'embryon. Dans notre étude, pour des concentrations allant jusqu'à 250 $\mu g.l^{-1}$ de Cu, aucun effet sur le développement n'a été observé. Cependant, il faut rappeler qu'une bactériose s'est développée dans les bacs expérimentaux peu de temps avant l'éclosion, occultant ainsi un possible impact de la contamination au Cu sur le temps d'incubation.

En somme, pour des concentrations métalliques du même ordre de grandeur que celles relevées dans le milieu marin côtier, i.e. de l'ordre du $ng.l^{-1}$ pour l'Ag et le Cd (e.g. Smith et Flegal, 1993, Flegal et al., 1995, Miramand et al., 2001) et de l'ordre du $\mu g.l^{-1}$ pour le Cu (Van Geen et Luoma, 1993), aucun impact de ces trois éléments n'a été observé sur le développement des œufs de seiches. Néanmoins, à ce niveau de contamination, **ces métaux semblent interférer avec la mise en place des fonctions physiologiques digestives et immunitaires**. En effet, pour une exposition à 1 $\mu g.l^{-1}$ d'Ag, les activités enzymatiques des phosphatases acides et de la phénoloxydase sont inhibées. De même, le Cd (50 $ng.l^{-1}$) ralentit l'augmentation des activités phosphatases acides en fin de développement. En revanche, une concentration de 2,5 $\mu g.l^{-1}$ de Cu stimule ces activités enzymatiques. A 250 $\mu g.l^{-1}$, le Cu active puis inhibe l'activité phénoloxydase. L'impact de ces métaux sur ces activités enzymatiques confirme donc une pénétration et une accumulation des éléments dans les tissus embryonnaires, puisque ces derniers doivent entrer dans les cellules avant d'exercer leur

influence (Langston, 1990). De plus, ces modulations détectées à l'échelle des processus biochimiques suggèrent que les éléments sont métaboliquement disponibles dans l'embryon et qu'ils peuvent exercer une action bénéfique ou toxique sur les enzymes (Rainbow, 2002). Bien que les mécanismes d'action de ces trois métaux restent à déterminer, ces premiers résultats posent la question de la prise en charge des éléments traces accumulés par l'embryon en phase de maturation, i.e. en période post-organogenèse du développement, et donc de l'existence de possibles mécanismes de détoxication.

Chez les céphalopodes, il est reconnu que la glande digestive est le principal organe impliqué dans l'accumulation et la détoxication des métaux tels que l'Ag, du Cd, du Cu, du Hg, du Zn (Decleir et al., 1978, Finger et Smith, 1987, Miramand et Bentley, 1992, Bustamante et al., 2002a, 2006) alors que les cœurs branchiaux jouent un rôle majeur dans la détoxication de l'^{241}Am, du Co, du Fe, du V (Miramand et Guary, 1980, 1981). Dans la glande digestive de *Sepia officinalis,* la distribution subcellulaire des éléments traces montre que le Cd, le Co et le Cu sont principalement détectés dans la fraction soluble du cytosol, tandis que l'Ag, le Fe, le Mn, le Pb et le Zn sont trouvés associés aux organites cellulaires (Bustamante et al., 2006).

L'une des principales stratégies de détoxication des éléments traces chez les organismes marins implique, en effet, leur prise en charge par des protéines cytosoliques spécifiques, i.e. les métallothionéines (e.g. Cosson et al., 1991, Viarengo et Nott, 1993, Roesijadi, 1996, Amiard et al., 2005). Chez les céphalopodes, la détoxication par des protéines cytosoliques a été montré pour le Co et le Cu (Bustamante et al., 2006), bien que ce dernier soit également lié à l'hémocyanine dans les tissus de la seiche (Decleir et Richard, 1970, Decleir et al., 1978). Le Cu a aussi été mis en évidence dans des structures particulières de la glande digestive, appelées « sphérules », formées par des complexes de protéines de type métallothionéine (Martoja et Marcaillou, 1993). En revanche, le Cd est principalement lié à des protéines de hauts poids moléculaire (> 70 kDa) bien qu'une petite partie semble associée à des molécules de type métalloprotéine (3 kDa) (Tanaka et al., 1983, Finger et Smith, 1987, Bustamante et al., 2002a, 2006). Une seconde stratégie de détoxication fait intervenir les organites cellulaires, i.e. les lysosomes et les mitochondries, dans la liaison et le « piégeage » des métaux comme l'Ag (Bustamante et al., 2006). Les métaux sont ainsi séquestrés dans la glande digestive et sont retenus avec des demi-vies courtes (e.g. l'Ag) ou au contraire particulièrement longues, i.e. supérieures à l'espérance de vie de l'animal (e.g. Cd).

Dans le contexte du développement embryonnaire, la glande digestive ne présente pas un fonctionnement identique à celle de l'adulte, puisqu'elle ne devient fonctionnelle qu'à partir

du stade 25 (Lemaire et al., 1975) et reste immature pendant un mois suivant l'éclosion (Boucaud-Camou et Yim, 1980). D'où l'interrogation suivante : quelles stratégies de détoxication pourraient être envisageables dans l'œuf de seiche et les tissus de l'embryon ?

Le Cu est présent sous une forme insoluble dans les œufs de calmars (Craig et Overnell, 2003), en conséquence de son incorporation dans le vitellus lors de l'ovogenèse (Decleir et al. 1970). Par contre, dans le cas d'un apport exogène du métal au cours du développement embryonnaire, il est envisageable que le Cu soit pris en charge par des protéines solubles dans les cellules de l'embryon, par analogie avec la distribution déterminée dans la glande digestive des individus adultes. Les effets du Cu sur les activités enzymatiques se sont avérés bénéfiques puis toxiques selon la concentration d'exposition et le stade de développement, suggérant l'existence d'une concentration seuil du métal pour l'embryon, au delà de laquelle les effets stimulants de cet apport exogène du métal essentiel se transforment en action inhibitrice des réactions biochimiques.

L'existence de protéines de type métallothionéine a été montré chez les embryons de poisson (Riggio et al., 2003) ou de mollusques bivalves (Pavicic et al., 1994a, Geffard et al., 2003). Concernant leur induction, chez les poissons, *Pimephalus promelas* et *Oreochromis mossambicus*, une exposition des femelles aux éléments métalliques entraîne une augmentation de la tolérance des descendants impliquant un transfert maternel des ARN messagers des métallothionéines (MTs) (Lin et al., 2000, Peake et al., 2004). Chez le poisson zèbre, *Danio rerio*, la quantité des MTs n'est pas corrélée avec les quantités de Cu et Zn accumulés dans les tissus embryonnaires, suggérant que ces éléments n'induisent pas la synthèse des MTs (Riggio et al., 2003). En revanche, chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, ou l'huître creuse *Crassostrea gigas*, l'exposition des œufs aux métaux induit la synthèse des MTs (Pavicic et al., 1994b, Damiens et al., 2006). À notre connaissance, une seule étude a dosé les MTs dans des œufs de céphalopodes : Craig et Overnell (2003) ont montré dans les œufs du calmar *Loligo forbesi* qu'aucune MT n'était utilisée pour lier le Cu ou le Zn. En revanche, des protéines liant le Zn d'un poids moléculaire de 32 et 58 kDa ont été mises en évidence. Ainsi, de futures études devront démontrer si des protéines cytosoliques sont susceptibles de prendre en charge les différents métaux comme l'Ag, le Cd, le Cu ou encore le Zn dans l'embryon de seiche.

Au cours de l'embryogenèse, d'autres organites susceptibles de fixer les éléments traces se développent. En effet, à partir du stade 25 de développement, les premiers lysosomes apparaissent dans la glande digestive des embryons (Lemaire et al., 1975), préparant ainsi la

digestion intracellulaire du vitellus. En conséquence, il est envisageable que des métaux comme l'Ag puissent être accumulés et retenus dans ce système lysosomal naissant au fur et mesure de leur pénétration au travers de la capsule. Néanmoins, du fait du caractère immature de l'organe, les capacités de détoxication de l'embryon pourraient apparaître limitées lorsque la concentration d'exposition atteint un certain seuil. Cette hypothèse semble d'ailleurs soutenue par les effets inhibiteurs de l'Ag mesurés sur les activités phosphatases acides et cathepsines pour une concentration de 1 $\mu g.l^{-1}$.

Les effets toxiques de l'Ag, du Cd et du Cu sur les activités enzymatiques, impliquées dans les fonctions digestives et immunitaires de l'embryon, soulèvent la question des mécanismes de détoxication existants ou mis en place lors de l'embryogenèse. Afin de répondre à cette question, il est envisageable de suivre les quantités de MTs ou d'autres métalloprotéines au cours du développement et leur possible induction par une contamination par voie dissoute. Enfin, il serait intéressant d'étudier la distribution subcellulaire des métaux dans l'embryon aux derniers stades de développement.

3. Le transfert maternel comme voie d'exposition des embryons aux métaux

Comme cela a été évoqué précédemment, le transfert maternel des éléments métalliques peut constituer une autre voie d'accumulation des éléments traces dans les embryons de seiche, particulièrement en ce qui concerne les éléments essentiels comme le Cu ou le Zn (Decleir et al., 1970, Gerpe et al., 2000, Craig et Overnell, 2003). Dans cette étude, il a été montré que certains métaux (**Ag, Se et Zn**), assimilés par la voie trophique (seiche nourrie avec des crabes verts *Carcinus maenas* radiomarqués) pouvaient **être transférés de la femelle vers l'embryon** en étant **incorporés dans les réserves vitellines** de l'ovocyte lors de la vitellogenèse (Ag, Se et Zn) **et/ou dans les sécrétions polysaccharidiques de la capsule** (Ag). Il a été, de plus, montré que ce mécanisme était sélectif : certains éléments, comme le Cd ou le Mn n'ont pas été détectés dans l'œuf au moment de la ponte, suivant les conditions expérimentales de ce travail. Néanmoins, cette première étude n'a pas permis une appréciation quantitative et cinétique de ce transfert maternel.

Comme bon nombre de céphalopodes, les seiches sont connues pour accumuler efficacement les métaux au cours de leur vie (Martin et Flegal, 1975, Miramand et Bentley, 1992,

Bustamante, 1998) et atteindre de très hautes concentrations dans leurs tissus au moment de la reproduction. La maturation sexuelle s'accompagne, de plus, d'une augmentation des concentrations en métaux (e.g. Cd, Cu et Zn) dans les ovaires des femelles matures (Gerpe et al., 2000, Miramand et al., 2006). Dès lors que la maturation sexuelle est initiée, celle-ci s'étend sur plusieurs mois pendant lesquels les femelles sont susceptibles (1) d'accumuler ou de perdre les métaux de leurs tissus en raison de leurs migrations entre une zone côtière sujette à la contamination anthropique et le large, considéré comme plus faiblement contaminé (Miramand et al., 2006) et (2) d'être exposés aux métaux *via* la voie dissoute et/ou trophique.

Selon Richard (1971), la maturation sexuelle commence lors de la période hivernale lorsque les seiches sont au large, dans des zones peu soumises à la contamination métallique. Les fortes concentrations en Zn, relevées dans les ovaires des animaux matures, comparés aux immatures (Miramand et Bentley, 1992, Miramand et al. 2006) pourraient provenir d'une remobilisation du métal accumulé de la glande digestive vers l'ovaire. Néanmoins, ces travaux ont été réalisés sur des animaux revenus à la côte au moment de la reproduction. A ce stade de leur cycle de vie, ils sont donc soumis, à nouveau, à la contamination côtière alors que l'ovogenèse n'est pas achevée. En effet, la vitellogenèse, pendant laquelle le Zn est incorporé dans les ovocytes (Montorzi et al., 1995, Falchuk et Montorzi, 2001) constitue la phase la plus longue de la maturation sexuelle et se prolonge jusque quelques jours avant la ponte (Richard, 1971). Ces nouveaux apports en métaux en pleine période d'ovogenèse peuvent alors contribuer au transfert maternel des métaux. La détection, dans notre travail, du ^{65}Zn dans les œufs 10 jours après son assimilation par la mère après un repas de crabe radiomarqué, supporte cette hypothèse.

Ainsi, le cyle de vie migratoire de la seiche pose, dans ce contexte, la question de la mobilisation des éléments au moment de la maturation sexuelle. En d'autres termes, quelle est l'origine du Zn associé à la vitellogénine lors de la synthèse des ovocytes, i.e. le Zn accumulé dans la glande digestive au cours du cycle de vie, ou le Zn assimilé peu de temps avant la ponte ? Les métaux transférés sont-ils remobilisés de la glande digestive vers l'ovaire ou directement distribués dans l'ovaire puis les ovocytes ? Formulée selon un aspect plus physiologique, l'étude du métabolisme du Zn lors de la maturation sexuelle pose logiquement la question, en retour, du lieu de synthèse des précurseurs du vitellus auxquels sont associés ce métal.

Il existe un autre élément pour lequel la migration des seiches peut jouer un rôle dans son transfert maternel, i.e. l'Ag. En effet, l'Ag présente un « turn-over » rapide dans les tissus de la seiche. Cette dernière élimine au cours de son séjour hivernal dans les eaux du large l'Ag accumulé dans les eaux côtières au cours de l'été et de l'automne (Miramand et al., 2006). Lors de la migration printanière, l'Ag s'accumule de nouveau chez les animaux matures et peut donc être incorporé dans les ovocytes. Les résultats préliminaires de cette étude semblent montrer que l'Ag peut être rapidement transféré vers l'œuf après un repas radiomarqué, pour s'associer à la fois aux protéines du vitellus et à celles de la capsule lors de leurs synthèses respectives.

Enfin, en plus du changement de l'état d'exposition des géniteurs au cours du cycle de vie, l'incorportaion des métaux par les ovocytes peut aussi dépendre de la biodisponibilité des métaux dans les proies et dans l'eau. En effet, d'une part, les mécanismes de stockage et de détoxication chez les proies vont déterminer la biodisponibilité des métaux pour les seiches (Bustamante et al., 2002b). Le transfert maternel des métaux peut ainsi être influencé par le régime alimentaire des géniteurs dès que la maturation sexuelle est initiée. D'autre part, alors que, pour le Cd ou le Zn, l'alimentation est la principale voie de contamination, l'Ag s'accumule essentiellement par la voie dissoute (Bustamante et al., 2004).

Ainsi, l'influence du cycle migratoire entre zone contaminée et non contaminée soulève le problème de la mobilisation des métaux transférés de la mère à l'œuf. En effet, les mécanismes de distribution des métaux dans les ovocytes dépendent à la fois du métabolisme propre au métal, i.e. soit le métal est fortement accumulé tout au long de la vie de la seiche (e.g. Cd, Zn) soit, au contraire il est éliminé lors des périodes hivernales (e.g. Ag), et à la fois de l'état de contamination de l'environnement des géniteurs. Ces paramètres peuvent ainsi déterminer l'intensité du transfert maternel.

Dans le futur, les mécanismes du transfert maternel des métaux pourront être étudiés en exposant des femelles plus tôt dans leur maturation sexuelle aux radiotraceurs via la voie dissoute et via la voie trophique, avec différents types de proie. La sélectivité de cette voie d'exposition pourra, d'autre part, être confirmée en portant une attention particulière au Cd, hautement accumulé chez les seiches et connu pour être transféré de la mère à l'œuf chez les poissons (Sellin et Kolok, 2006b). Enfin, l'influence de la voie d'accumulation sur l'incorporation des éléments dans le vitellus et/ou la capsule pourra être étudiée.

Références bibliographiques

-A-

Adam, C., Baudin, J.P. and Garnier-Laplace, J., 2001. Kinetics of ^{110m}Ag, ^{60}Co, ^{137}Cs and ^{54}Mn bioaccumulation from water and depuration by the crustacean *Daphnia magna*. Water Air Soil Poll. 125, 171-188

Alderdice, D.F., Rao, T.R. and Rosenthal, H., 1979a. Osmotic responses of eggs and larvae of the Pacific herring to salinity and cadmium. Helgol. Mar. Res. 32, 508-538

Alderdice, D.F., Rosenthal, H. and Velsen, F.P.J., 1979b. Influence of salinity and cadmium on the volume of Pacific herring eggs. Helgol. Mar. Res. 32, 163-178

Alderdice, D.F., Rosenthal, H. and Velsen, F.P.J., 1979c. Influence of salinity and cadmium on capsule strength in Pacific herring eggs. Helgol. Mar. Res. 32, 149-162

Alves, C., Chichery, R., Boal, J.G. and Dickel, L., 2007. Orientation in the cuttlefish *Sepia officinalis* response *versus* place learning. Anim. Cogn. 10, 29-36

Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J. and Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquat. Toxicol., 76, 160-202

Anonymous, 2003 Working group on cephalopod fisheries and life history, ICES CM 2003/G:02, Tallin, 101 p

Arizza, V., Cammarata, M., Tomasino, M.C. and Parrinello, N., 1995. Phenoloxidase Characterization in Vacuolar Hemocytes from the Solitary Ascidian *Styela plicata*. J. Invertebr. Pathol. 66, 297-302

Asokan, R., Arumugam, M. and Mullainadhan, P., 1997. Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus. Dev. Comp. Immunol. 21, 1-12

-B-

Baden, S.P., Eriksson, S.P. and Gerhardt, L., 1999. Accumulation and elimination kinetics of manganese from different tissues of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* (L.). Aquat. Toxicol. 46, 127-137

Bado-Nilles, A. and Thomas-Guyon, H., 2003. Phenoloxydase activity in the haemolyph and haemocytes of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. Eur. J. Biochem. 3, 3-26

Bai, G., Brown, J.F., Watson, C. and Yoshino, T.P., 1997. Isolation and characterization of phenoloxydase from egg masses of the Gastropod Mollusc, *Biomphalaria glabatra*. Comp. Biochem. Physiol. 118B, 463-469

Barbieri, E., Barry, K., Child, A. and Wainwright, N., 1997. Antimicrobial activity in the microbial community of the accessory nidamental gland and egg cases of *Loligo pealei* (Cephalopoda: Loliginidae). Biol. Bull. 193, 275-276

Barceloux, D., 1999. Manganese. J. Toxicol. Clin. Toxicol. 37, 293-307

Barrett, K.J., McDonald, D.G. and O'Donnell, M.J., 2001. Changes in ion content and transport during development of embryonic rainbow trout. J. Fish Biol. 59, 1323-1335

Beattie, J.H. and Pascoe, D., 1978. Cadmium uptake by rainbow trout, *Salmo gairdneri* eggs and alevins. J. Fish Biol. 13, 631-637

Bell, J.G., Pirie, B.J.S., Adron, J.W. and Cowey, C.B., 1986. Some effects of selenium deficiency on glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) activity and tissue pathology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Br. J. Nutr. 55, 305-311

Bell, R.A. and Kramer, J.R., 1999. Structural chemistry and geochemistry of silver-sulfur compounds: critical review. Environ. Toxicol. Chem. 18, 9-22

Beuerlein, K., Schimmelpfennig, R., Westermann, B., Ruth, P. and Schipp, R., 1998. Cytobiological studies on hemocyanin metabolism in the branchial heart complex of the common cuttlefish *Sepia officinalis* (Cephalopoda, Dibranchiata). Cell Tissue Res. 292, 587-595

Bielmyer, G.K., Brix, K.V., Capo, T.R. and Grosell, M., 2005. The effects of metals on embryo-larval and adult life stages of the sea urchin, *Diadema antillarum*. Aquat. Toxicol. 74, 254-263

Bloodgood, R.A., 1977. The squid accessory nidamental gland: ultrastructure and association with bacteria. Tissue Cell 9, 197-208

Bodar, C.W.M., Zee, A.v.d., Voogt, P.A., Wynne, H. and Zandee, D.I., 1989. Toxicity of heavy metals to early life stages of *Daphnia magna*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 17, 333-338

Boletzky, S.V., 1975. A contribution to the study of yolk absorption in the Cepalopoda. Z. Morphol. Oekol. Tiere 80, 229-246

Boletzky, S.V., 1983. *Sepia officinalis*. In: P.R. Boyle (Eds), Cephalopod life cycle. Academic Press, London

Boletzky, S.V., 1986. Encapsulation of cephalopod embryos: a search for functional correlations. Am. Malacol. Bull. 4, 217-227

Boletzky, S.V., 1989. Recent studies on spawning, embryonic development, and hatching in the Cephalopoda. Adv. Mar. Biol. 25, 85-115

Boletzky, S.V., 1998. Cephalopod eggs and egg masses. Oceanography and Marine Biology: Annual Review 36, 341-371

Boletzky, S.V., 2002. Yolk sac morphology in Cephalopod embryos. Abh. Geol. B.-A. 57, 57-68

Boletzky, S.V., 2003. Biology of early life stages in cephalopod molluscs. Adv. Mar. Biol. 44, 143-203

Bonete, M.J., Manjon, A., Llorca, F. and Iborra, J.L., 1984. Acid proteinase activity in fish II. Purification and characterization of cathepsins B and D from *Mujil auratus* muscle. Comp. Biochem. Physiol. 78B, 207-213

Bonnier, P. and Baert, J.L., 1992. Identification of cathepsin L-Like proteinase and aminopeptidase in yolk granules of sand worm, *Nereis diversicolor*. Comp. Biochem. Physiol. 103B, 425-430

Boucaud-Camou, E. and Yim, M., 1980. Fine structure and function of the digestive cell of *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda). J. Zool. 191, 89-105

Boucaud-Camou, E., Yim, M. and Tresgot, A., 1985. Feeding and digestion of young *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda) during post-hatching development. Vie Milieu 35, 263-266

Boucaud-Camou, E. and Boismery, J., 1991. The migrations of the cuttlefish (*Sepia officinalis* L) in the English Channel. In: E. Boucaud-Camou (Eds), The Cuttlefish. Centre de publication de l'Université de Caen, Caen

Boucaud-Camou, E., Koueta, N., Boismery, J. and Medhioub, A., 1991. The sexual cycle of *Sepia officinalis* L. from the Bay of Seine. In: E. Boucaud-Camou (Eds), The Cuttlefish. Centre de publication de l'Université de Caen, Caen

Boucaud-Camou, E. and Roper, C.F.E., 1995. Digestives enzymes in paralarval cephalopods. Bull. Mar. Sci. 57, 313-327

Bouchaud, O. and Daguzan, J., 1989. Etude du developpement de l'oeuf de *Sepia officinalis* L. (Céphalopode, Sepiidae) en conditions expérimentales. Haliotis 19, 189-200

Boucher-Rodoni, R., Boucaud-Camou, E. and Mangold, K., 1987. Feeding and digestion. In: P.R. Boyle (Eds), Cephalopod Life Cycle, Vol 2. Academic Press, London

Boutier, B., Chiffoleau, J.F., Gonzales, J.L., Lazure, P., Auger, D. and Truquet, I., 2000. Influence of Gironde estuary outputs on cadmium concentrations in the coastal waters: consequences on the Marennes-Oléron bay (France). Oceanologica Acta 23, 745-757

Bryan, G.W., 1984. Pollution due to heavy metals and their compounds. Mar. Ecol. 5, 1290-1331

Bustamante, P. 1998. Bioaccumulation des éléments traces chez les mollusques céphalopodes et bivalves pectinidés. Implication de leur biodisponibilité pour le transfert vers les prédateurs. PhD Thesis, Université de La Rochelle

Bustamante, P., Caurant, F., Fowler, S.W. and Miramand, P., 1998a. Cephalopods as a vector for the transfer of cadmium to top marine predators in the north-east Atlantic Ocean. Sci. Total Environ. 220, 71-80

Bustamante, P., Cherel, Y., Caurant, F. and Miramand, P., 1998b. Cadmium, copper and zinc in octopuses from Kerguelen Islands, Southern Indian Ocean. Polar Biol. 19, 264-271

Bustamante, P., Grigiono, S., Boucher-Rodoni, R., Caurant, F. and Miramand, P., 2000. Bioaccumulation of 12 trace elements in the tissues of the nautilus *Nautilus macromphalus* from New Caledonia. Mar. Pollut. Bull. 8, 688-696

Bustamante, P., Cosson, R.P., Gallien, I., Caurant, F. and Miramand, P., 2002a. Cadmium detoxification processes in the digestive gland of cephalopods in relation to accumulated cadmium concentrations. Mar. Environ. Res. 53, 227-241

Bustamante, P., Teyssié, J.-L., Fowler, S.W., Cotret, O., Danis, B., Miramand, P. and Warnau, M., 2002b. Biokinetics of zinc and cadmium accumulation and depuration at differents stages in the life cycle of the cuttlefish *Sepia officinalis*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 231, 167-177

Bustamante, P., Teyssié, J.-L., Danis, B., Fowler, S.W., Miramand, P., Cotret, O. and 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. Mar. Ecol. Prog. Ser. 269, 185-195

Bustamante, P., Bertrand, M., Boucaud-Camou, E. and 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*. J. Shellfish Res. 25, 987-993

Bustamante, P., Lahaye, V., Durnez, C., Churlaud, C. and Caurant, F., 2006b. Total and organic Hg concentrations in cephalopods from the North Eastern Atlantic waters: Influence of geographical origin and feeding ecology. Sci. Total Environ. 368, 585-596

Bustamante, P., Teyssié, J.-L., Fowler, S.W. and Warnau, M., 2006c. Contrasting bioaccumulation and transport behaviour of two artificial radionuclides (^{241}Am and ^{134}Cs) in cuttlefish eggshell. Vie Milieu 56, 153-156

Bustamante, P., Teyssié, J.-L., Fowler, S.W. and Warnau, M., 2006d. 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. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 331, 198-207

-C-

Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C. and Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess impact of pollution in coastal environments of Iberian Peninsula: a practical approach. Sci. Total Environ. 247, 295-311

Calabrese, A., Collier, R.S., Nelson, D.A. and MacInnes, J.R., 1973. The toxicity of heavy metals to embryo of the american oyster *Crassostrea virginica*. Mar. Biol. 18, 162-166

Calabrese, A. and Nelson, D.A., 1974. Inhibition of embryonic development of the hard clam *Mercenaria mercenaria*, by heavy metals. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 11, 92-97

Carballal, M.J., Lopez, C., Azevedo, C. and Villalba, A., 1997. Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. J. Invertebr. Pathol. 70, 96-105

Carnevali, O., Carletta, R., Cambi, A., Vita, A. and Bromage, N., 1999. Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream *Sparus aurata*: Involvement of two lysosomal proteinases. Biol. Reprod. 60, 140-146

Carnevali, O., Mosconi, G., Cambi, A., Ridolfi, S., Zanuy, S. and Polzonetti-Magni, A.M., 2001. Changes of lysosomal enzyme activities in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) eggs and developing embryos. Aquaculture 202, 249-256

Challier, L. 2005. Variablité de la croissance des Céphalopodes juvéniles (*Sepia officinalis*, *Loligo forbesi*) et relation avec les fluctuations du recrutement, en Manche. Thesis, Université de Caen Basse-Normandie

Chiffoleau, J.-F., Cossa, D., Auger, D. and Truquet, I., 1994. Trace metal distribution, partition and fluxes in the Seine estuary (France) in low discharge regime. Mar. Chem. 47, 145-158

Clark, R.B., 2001. Marine Pollution. Fifth edition. Oxford University Press.

Clarke, M.R., 1996. Cephalopods as prey. III. Cetaceans. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 351, 1053-1065

Coles, J.A., Farley, S.R. and Pipe, R.K., 1994. Effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. Aquat. Toxicol. 30, 367-379

Coles, J.A. and Pipe, R.K., 1994. Phenoloxydase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. Fish Shellfish Immunol. 4, 337-352

Cossa, D., Elbaz-Poulichet, F., Gnassia-Barelli, M. and Romeo, M., 1993 Le plomb en milieu marin : biogéochimie et écotoxicologie. Report No. 3, IFREMER, Plouzane, France, 76

Cossa, D. and Ficht, A., 1999. La dynamique du mercure. IFREMER, Nantes.

Cosson, R.P., Amiard-Triquet, C. and Amiard, J.C., 1991. Metallothioneins and detoxification. Is the use of detoxication protein for MTs a language abuse? Water Air Soil Poll. 57-58, 555-567

Coulonval, M. 2005. Etude expérimentale des phosphatases acides au cours de la maturation des oeufs de seiche *Sepia officinalis*: effet de l'argent et du cadmium. Master Thesis, Université de Caen, Basse-Normandie

Craig, S. and Overnell, J., 2003. Metals in squid, *Loligo forbesi*, adults, eggs, and hatchlings. No evidence for a role for Cu- or Zn-metallothionein. Comp. Biochem. Physiol. 34C, 311-317

Cronin, E.R. and Seymour, R.S., 2000. Respiration of the eggs of the giant cuttlefish *Sepia apama*. Mar. Biol. 136, 863-870

Croxall, J.P. and Prince, P.A., 1996. Cephalopods as prey. I. Seabirds. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 351, 1023-1043

-D-

D'Aniello, A., Pischetola, M., Vanacore, F., De Nicola, M. and Denuce, M., 1990. Effect of mercury, cadmium and copper on the development and viability of *Loligo vulgaris* and *Sepia officinalis* embryos. Ital. J. Biochem. 32, 130A-132A

Damiens, G., Mounetrac, C., Quiniou, F., His, E., Gnassia-Barelli, M. and Roméo, M., 2006. Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of *Crassostrea gigas*. Environ. Pollut. 140, 492-499

De Wachter, B., Wolf, G., Richard, A. and Decleir, W., 1988. Regulation of respiration during the juvenile development of *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda). Mar. Biol. 97, 365-371

Decker, H. and Jaenicke, E., 2004. Recent findings on phenoloxydase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. Dev. Comp. Immunol. 28, 673-687

Decleir, W., Lemaire, J. and Richard, A., 1970. Determination of copper in embryos and very young specimens of *Sepia officinalis* L. Mar. Biol. 5, 256-258

Decleir, W. and Richard, A., 1970. A study of the blood proteins in *Sepia officinalis* L. with special reference to embryonic hemocyanin. Comp. Biochem. Physiol. 34, 203-211

Decleir, W., Lemaire, J. and Richard, A., 1971. The differentiation of blood proteins during ontogeny in *Sepia officinalis*. Comp. Biochem. Physiol. 40B, 923-928

Decleir, W., Vlaeminck, A., Geladi, P. and Van Grieken, R., 1978. Determination of protein-bound copper and zinc in some organs of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. Comp. Biochem. Physiol. 60B, 347-350

Denis, V. and Robin, J.P., 2001. Present status of the French Atlantic fishery for cuttlefish (*Sepia officinalis*). Fish. Res. 52, 11-22

Dhainaut, A. and Richard, A., 1976. Vitellogenesis in Decapod Cephalopods: evolution of oocytes and follicular cells during genital maturation. Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp. 65, 183-208

Dickel, L., Chichery, M.P. and Chichery, R., 1998. Time differences in the emergence of short- and long-term memory during post-embryonic development in the cuttlefish, *Sepia*. Behav. Process. 44, 81-86

Dyrynda, E.A., Pipe, R.K. and Ratcliffe, N.A., 1995. Host defence mechanisms in marine invertebrate larvae. Fish Shellfish Immunol. 5, 569-580

-E-

Establier, R. and Pascual, E., 1983. Effecto del cadmio y el cobre sobre el desarollo de los huevos de *Sepia officinalis* Linneo. Investigacion Pesquera 47, 143-150

-F-

Fagotto, F., 1990. Yolk degradation in tick eggs: II. Evidence that cathepsin L-like proteinase is stored as a latent, acid-activable proenzyme. Arch. Insect Biochem. Physiol. 14, 237-252

Fagotto, F. and Maxfield, F.R., 1994a. Changes in yolk platelet pH during *Xenopus laevis* development correlate with yolk utilization: A quantitative confocal microscopy study. J. Cell Sci. 107, 3325-3337

Fagotto, F. and Maxfield, F.R., 1994b. Yolk platelets in Xenopus oocytes maintain an acidic internal pH which may be essential for sodium accumulation. J. Cell Biol. 125, 1047-1056

Fagotto, F., 1995. Regulation of yolk degradation, or how to make sleepy lysosomes. J. Cell Sci. 108, 3645-3647

Falchuk, K.H. and Montorzi, M., 2001. Zinc physiology and biochemistry in oocytes and embryos. Biometals 14, 385-395

Fausto, A.M., Mazzini, M., Cecchettini, A. and Giorgi, F., 1997. The yolk sac in late embryonic development of the stick insect *Carausius morosus* (Br.). Tissue Cell 29, 257-266

Fialho, E., Masuda, H. and Silva-Neto, M.A.C., 1999. Protein phosphorylation during *Rhodnius prolixus* embryogenesis: protein kinase casein kinase II activity. Insect Biochem. Mol. Biol. 29, 215-223

Fialho, E., Silveira, A.B., Masuda, H. and Silva-Neto, M.A.C., 2002. Oocyte fertilization triggers acid phosphatase activity during *Rhodnius prolixus* embryogenesis. Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 871-880

Fialho, E., Nakamura, A., Juliano, L., Masuda, H. and Silva-Neto, M.A.C., 2005. Cathepsin D-mediated yolk protein degradation is blocked by acid phosphatase inhibitors. Arch. Biochem. Biophys. 436, 246-253

Finger, J.M. and Smith, J.D., 1987. Molecular association of Cu, Zn, Cd and ^{210}Po in the digestive gland of the squid *Nototodarus gouldi*. Mar. Biol. 95, 87-91

Fisher, N.S., Burns, K.A., Cherry, R.D. and Heyraud, M., 1983. Accumulation and cellular distribution of ^{241}Am, ^{210}Po, and ^{210}Pb in two marine algae. Mar. Ecol. Prog. Ser. 11, 233-237

Fisher, N.S., Teyssié, J.-L., Krishnaswani, S. and Baskaran, M., 1987. Accumulation of Th, Pb, U, and Ra in marine phytoplankton and its geochemical significance. Limnol. Oceanogr. 32, 131-142

Flegal, A.R., Sanudo-Wilhelmy, S.A. and Scelfo, G.M., 1995. Silver in the eastern Atlantic Ocean Mar. Chem. 49, 315-320

Forsythe, J.W., de Rusha, R.H. and Hanlon, R.T., 1994. Growth, reproduction and life-span of *Sepia officinalis* (Cephalopoda: Mollusca) cultured through seven consecutive generations. J. Zool. 233, 175-192

-G-

Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H. and Renault, T., 2004. In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. Fish Shellfish Immunol. 16, 501-512

Geffard, O., Geffard, A., His, E. and Budzinski, H., 2003. Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. Mar. Pollut. Bull. 46, 481-490

Gélabert, A., Pokrovsky, O.S., Schott, J., Boudou, A. and Feurtet-Mazel, A., 2007. Cadmium and lead interaction with diatom surfaces: a combined thermodynamic and kinetic approach. Geochim. Cosmochim. Acta 71, 3698-3716

Gerhartz, B., Auerswald, E.A., Mentele, R., Fritz, H., Machleidt, W., Kolb, H.J. and Wittmann, J., 1997. Proteolytic enzymes in yolk-sac membrane of quail egg. Purification and enzymatic characterisation. Comp. Biochem. Physiol. 118B, 159-166

Gerpe, M.S., de Moreno, J.E.A., Moreno, V.J. and Patat, M.L., 2000. Cadmium, zinc and copper accumulation in the squid *Illex argentinus* from the Southwest Atlantic Ocean. Mar. Biol. 136, 1039-1044

Gillespie, R.B. and Baumann, P.C., 1986. Effects of high tissue concentrations of selenium on growth and reproduction by bluegills. Trans. Am. Fish. Soc. 115, 208-213

Goldberg, E.D., 1995. Emerging problems in the coastal zone for the twenty-first centuty. Mar. Pollut. Bull. 31, 152-158

Gomi, F., Yamamoto, M. and Nakazawa, T., 1986. Swelling of egg during development of the cuttlefish, *Sepiella japonica*. Zool. Sci. 3, 641-645

Gonzalez-Doncel, M., Larrea, M., Sanchez-Fortun, S. and Hinton, D.E., 2003. Influence of water hardening of the chorion on cadmium accumulation in medaka (*Oryzias latipes*) eggs. Chemosphere 52, 75-83

Grigioni, S., Boucher-Rodoni, R., Demarta, A., Tonolla, M. and Peduzzi, R., 2000. Phylogenetic characterisation of bacterial symbionts in the accessory nidamentals glands of the sepioid *Sepia officinalis* (Cephalopoda: Decapoda). Mar. Biol. 136, 217-222

Guadagnolo, C.M., Brauner, C.J. and Wood, C.M., 2001. Chronic effects of silver exposure on ion levels, survival, and silver distribution within developing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos. Environ. Toxicol. Chem. 20, 553-560

Guerra, A. and Castro, B.G., 1994. Reproductive-somatic relationships in *Loligo gahi* (Cephalopoda: Loliginidae) from the Falkland Islands. Antarct. Sci. 6, 175-178

Guerra, A., 2006. Ecology of *Sepia officinalis*. Vie Milieu 56, 97-107

-H-

Hanlon, R.T. and Messenger, J., 1996. Cephalopod Behavior. University Press, Cambridge.

Hellio, C., Bourgougnon, N. and Le Gal, Y., 2000. Phenoloxidase (E.C. 1.14.18.1) from the byssus gland of *Mytilus edulis*: Purification, partial characterization and application for screening products with potential antifouling activities. Biofouling 16, 235-244

Hellio, C., Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Renault, T. and Thomas-Guyon, H., 2007. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in vitro. Fish Shellfish Immunol. 22, 433-440

Hernandez-Lopez, J., Gollas-Galvan, T. and Vargas-Albores, F., 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comp. Biochem. Physiol. 113C, 61-66

Hernandez-Lopez, J., Gollas-Galvan, T., Gomez-Jimenez, S., Portillo-Clark, G. and Vargas-Albores, F., 2003. In the spiny lobster (*Panulirus interruptus*) the prophenoloxydase is located in plasma not in hemocytes. Fish Shellfish Immunol. 14, 105-114

Hernroth, B., Baden, S.P., Holm, K., André, T. and Söderhäll, I., 2004. Manganese induced immune suppression of the lobster *Nephrops norvegicus*. Aquat. Toxicol. 70, 223-231

-I-

Ikeda, Y., Sakurai, Y. and Shimazaki, K., 1993. Fertilizing capacity of squid (*Todarodes pacificus*) spermatozoa collected from various storage sites, with special reference to the role of gelatinous substance from the oviductal gland in fertilization and embryonic development. Invertebr. Reprod. Dev. 23, 39-44

Ikeda, Y. and Shimazaki, K., 1995. Does nidamental gland jelly induce the formation of perivitelline space at fertilization on the squid *Todarodes pacificus*. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 75, 495-497

-J-

Jecklin, L., 1934. Beitrag zur kenntnis der laichgallertern und der biologie der embryonen decapoder cephalopoden. Rev. Suisse Zool. 41, 593-673

Jeffree, R.A., Warnau, M., Oberhänsli, F. and Teyssié, J.-L., 2006a. Bioaccumulation of heavy metals and radionuclides from seawater by encased embryos of the spotted dogfish *Scyliorhinus canicula*. Mar. Pollut. Bull. 52, 1278-1286

Jeffree, R.A., Warnau, M., Teyssie, J.-L. and Markich, S.J., 2006b. Comparison of the bioaccumulation from seawater and depuration of heavy metals and radionuclides in the spotted dogfish *Scyliorhinus canicula* (Chondrichthys) and the turbot *Psetta maxima* (Actinopterygii: Teleostei). Sci. Total Environ. 368, 839-852

Jeffree, R.A., Oberhänsli, F. and Teyssié, J.-L., 2007. Accumulation and transport behaviour of ^{241}americium, ^{60}cobalt and ^{134}cesium by eggs of the spotted dogfish *Scyliorhinus canicula*. Mar. Pollut. Bull. 54, 912-920

Jing, G., Li, Y., Xie, L. and Zhang, R., 2006. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. Comp. Biochem. Physiol. 144C, 184-190

Johansson, M.W. and Söderhall, K., 1989. Cellular immunity in Crustaceans and the proPO system. Parasitol. Today 5, 171-176

-K-

Ke, C., Yu, K.N., Lam, P.K.S. and Wang, W.-X., 2000. Uptake and depuration of cesium in the green mussel *Perna viridis*. Mar. Biol. 137, 567-575

Kestemont, P., Cooremans, J., Abi-Ayed, A. and Mélard, C., 1999. Cathepsin L in eggs and larvae of perch *Perca fluviatilis*: variations with the developmental stage and spawning period. Fish Physiol. Biochem. 21, 59-64

Kimura, S., Higuchi, Y., Aminaka, M., Bower, J.R. and Sakurai, Y., 2004. Chemical properties of egg-mucin complexes of the ommastrephid squid *Todarodes pacificus*. J. Molluscan Stud. 70, 117-121

Klages, N.T.W., 1996. Cephalopods as prey. II. Seals. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 351, 1045-1052

Komazaki, S. and Hiruma, T., 1999. Degradation of yolk platelets in the early amphibian embryo is regulated by fusion with the late endosomes. Dev. Growth Differ. 41, 173-181

Koueta, N. and Boucaud-Camou, E., 1999. Food intake and growth in reared early juvenile cuttlefish *Sepia offcinalis* L. (Mollusca Cephalopoda). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 240, 93-109

Kroll, K.J. and Doroshov, S.I., 1991. Vitellogenin: Potential vehicle for selenium bioaccumualtion in oocytes of the white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). In: P. Williot (Eds), *Acipenser*. Cemagref Publishers, Antony, France

-L-

Lam, I.K.S. and Wang, W.-X., 2006. Transgenerational retention and maternal transfer of selenium in *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem. 25, 2519-2525

Langston, W.J., 1990. Toxic effects of metals and the incidence of metal pollution in marine ecosystems. In: R.W. Furness and P.S. Rainbow (Eds), Heavy Metals in the Marine Environment. CRC Press

Lankester, E.R., 1875. Contributions to the developmental history of the Mollusca. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 165, 1-48

Lavolpe, M., Lopez Greco, L., Kesselman, D. and Rodriguez, E., 2004. Differential toxicity of copper, zinc, and lead during the embryonic development of *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura, Varunidae). Environ. Toxicol. Chem. 23, 960-967

Le Bihan, E., Pacary, A., Perrin, A. and Koueta, N., 2003. Impact of pollutants on growth weigh of cuttlefish eggs. III^{ème} Congrès International des Sociétés Européennes de Malacologie, La Rochelle.

Le Bihan, E., Perrin, A. and 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 enzymes activities and cell viability. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 309, 47-66

Le Goff, R. and Daguzan, J., 1991. Growth and life cycles of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda) in south Brittany (France). Bull. Mar. Sci. 49, 341-348

Lemaire, J., 1970. Table de développement embryonnaire de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). Bull. Soc. Zool. Fr. 95, 773-782

Lemaire, J. and Richard, A., 1970. Evolution embryonnaire de l'appareil génital : differenciation du sexe chez *Sepia officinalis* L. Bull. Soc. Zool. Fr. 95, 475-478

Lemaire, J., Richard, A. and Decleir, W., 1975. Le foie embryonnaire de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Cephalopode). I. Organogenèse. Haliotis 6, 287-296

Lemanski, L.F. and Aldoroty, R., 1974. Role of acid phosphatase in the breakdown of yolk in developing amphibian embryos. J. Morphol. 153, 419-426

Lin, H.C., Hsu, S.C. and Hwang, P.P., 2000. Maternal transfer of cadmium tolerance in larval *Oreochromis mossambicus*. J. Fish Biol. 57, 239-249

Locci, M.T., Masetti, M., Cecchettini, A. and Giorgi, F., 1998. Cells released *in vitro* from the embryonic yolk sac of the stick insect *Carausius morosus* (Br.) (Phasmatodea: Heteronemiidae) may include embryonic hemocytes. Int. J. Insect Morphol. Embryol. 27, 325-331

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. J. Biochem. 193, 265-275

Luna-Gonzalez, A., Maeda-Martinez, A.N., Vargas-Albores, F., Ascencio-Valle, F. and Robles-Mungaray, M., 2003. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. Fish Shellfish Immunol. 15, 275-282

Luoma, S.N., Ho, Y.B. and Bryan, G.W., 1995. Fate, Bioavailability and Toxicity of Silver in Estuarine Environments. Mar. Pollut. Bull. 31, 44-54

-M-

Mallya, S.K., Parint, J.S., Valdizan, M.C. and Lennarz, W.J., 1992. Proteolysis of the major yolk glycoproteins is regulated by acidification of the yolk platelets in sea urchin embryos. J. Cell Biol. 117, 1211-1221

Mangold, K., 1989. Reproduction, croissance et durée de vie. In: Masson (Eds), Traité de Zoologie : Céphalopodes, Vol Tome V. Grassé, Pierre-P., Paris

Mangold-Wirz, K., 1963. Biologie des Céphalopodes benthiques et nectoniques de la mer catalane. Vie Milieu 13, 1-285

Marigomez, I., Orbea, A., Olabarrieta, I., Etxeberria, M. and Cajaraville, M.P., 1996. Structural changes in the digestive lysosomal system of sentinel mussels as biomarkers of environmental stress in mussel-watch programmes. Comp. Biochem. Physiol. 113C, 291-297

Martin, J.H. and Flegal, A.R., 1975. High copper concentrations in squid livers in association with elevated levels of silver, cadmium, and zinc. Mar. Biol. 30, 51-55

Martin, M., Osborn, K.E., Billig, P. and Glickstein, N., 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. Mar. Pollut. Bull. 12, 305-308

Martinez, I., Moyano, F.J., Fernandez-Diaz, C. and Yufera, M., 1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). Fish Physiol. Biochem. 21, 317-323

Martoja, M. and Marcaillou, C., 1993. Localisation cytologique du cuivre et de quelques autres métaux dans la glande digestive de la seiche, *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 50, 542-550

Mazorra, M.T., Rubio, J.A. and Blasco, J., 2002. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: kinetic characteristics and effects of heavy metals. Comp. Biochem. Physiol. 131B, 241-249

Medhioub, A. 1986. Etude de la croissance et du cycle sexuel de la seiche (*Sepia officinalis* L.) des côtes normandes. Thesis, Université de Caen

Michibata, H. and Hori, R., 1979. The accumulation of manganese from the environmental medium by the egg of *Oryzias latipes*. J. Cell. Physiol. 98, 241-243

Michibata, H., 1981. Uptake and distribution of cadmium in the egg of the teleost, *Oryzias latipes*. J. Fish Biol. 19, 691-696

Michibata, H., Nojima, Y. and Kojima, M.K., 1987. Stage sensitivity of eggs of the teleost *Oryzias latipes* to cadmium exposure. Environ. Res. 42, 321-327

Miramand, P. and Guary, J.-C., 1980. High concentrations of some heavy metals in tissues of mediterranean octopus. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 24, 783-788

Miramand, P. and Guary, J.-C., 1981. Association of Americium-241 with adenochromes in the branchial hearts of the cephalopod *Octopus vulgaris*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 4, 127-129

Miramand, P., Germain, P. and Trilles, J.P., 1989. Histo-autoradiographic localisation of americium (^{241}Am) in tissues of European lobster *Homarus gammarus* and edible crab *Cancer pagurus* after uptake from labelled sea water. Mar. Ecol. Prog. Ser. 52, 217-225

Miramand, P. and 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. Mar. Biol. 114, 407-414

Miramand, P., Guyot, T., Rybarczyk, H., Elkaim, B., Mouny, P., Dauvin, J.C. and Bessineton, C., 2001. Contamination of the biological compartment in the Seine Estuary by Cd, Cu, Pb, and Zn. Estuaries 24, 1056-1065

Miramand, P., Bustamante, P., Bentley, D. and 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*. Sci. Total Environ. 361, 132-143

Montorzi, M., Falchuk, K.H. and Vallee, B.L., 1995. Vitellogenin and lipovitellin: zinc proteins of *Xenopus laevis* oocytes. Biochemistry 34, 10851-10858

Moyano, F.J., Diaz, M., Alarcon, F.J. and Sarasquete, M.C., 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Fish Physiol. Biochem. 15, 121-130

-N-

Naef, A., 1928. Die Cephalopoden, Embryologie. Fauna e Flora del Golfo di Napoli, 357 pp.

Nagai, T. and Kawabata, S.-i., 2000. A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in Arthropod host defense. J. Biol. Chem. 275, 29264-29267

Nakahara, M., Koyanagi, T., Ueda, T. and Shimizu, C., 1979. Peculiar accumulation of cobalt-60 by the branchial hearts of Octopus. Bull. Jpn. Soc. Fish. Oceanogr. 45, 539

Nieboer, E. and Richardson, D.H.S., 1980. The replacement of the nondescript term 'heavy metal' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. Environ. Pollut. 1, 3:26

Nisbet, E.G. and Fowler, C.M.R., 1995. Is metal disposal toxic to deep oceans. Nature (Lond.) 375, 715

Nixon, M. and Mangold, K., 1998. The early stage of *Sepia officinalis*, and the contrast with that of *Octopus vulgaris* (Cephalopoda). J. Zool. 245, 407-421

-P-

Passow, U., 2002. Transparent exopolymer particles (TEP) in aquatic environments. Prog. Oceanogr. 55, 287-333

Paulij, W.P., Zurburg, W., Denuce, J.M. and Van Hannen, E.J., 1990. The effect of copper on the embryonic development and hatching of *Sepia officinalis* L. . Arch. Environ. Contam. Toxicol. 19, 797-801

Pavicic, J., Skreblin, M., Kregar, I., Tusek-Znidaric, M. and Stegnar, P., 1994a. Embryo-larval tolerance of *Mytilus galloprovincialis*, exposed to the elevated sea water metal concentrations - I. Toxic effects of Cd, Zn and Hg in relation to the metallothionein level. Comp. Biochem. Physiol. 107C, 249-257

Pavicic, J., Smodis, B., Skreblin, M., Kregar, I. and Stegnar, P., 1994b. Embryo-larval tolerance of *Mytilus galloprovincialis*, exposed to elevated seawater metal concentrations - II. Stage-specific fluctuations in sensitivity toward Zn and Cd and their bioaccumulation into veliger larvae. Comp. Biochem. Physiol. 109C, 37-46

Peake, E.B., Locke, J.C., Tierney, L.L. and Kolok, A.S., 2004. Copper tolerance in fathead minnows : II. Maternal transfer. Environ. Toxicol. Chem. 23, 208-211

Pérez-Losada, M., Nolte, M.J., Crandall, K.A. and Shaw, P.W., 2007. Testing hypotheses of population structuring in the Northeast Atlantic Ocean and Mediterranean Sea using the common cuttlefish *Sepia officinalis*. Mol. Ecol. 16, 2667-2679

Pierce, G.J. and Guerra, A., 1994. Stock assessment methods used for cephalopod fisheries. Fish. Res. 21, 255-285

Pierce, G.J., Bailey, N., Stratoudakis, Y. and Newton, A., 1998. Distribution and abundance of the fished population of *Loligo forbesi* in Scottish waters: analysis of research cruise data. ICES J. Mar. Sci. 55, 14-33

Pipe, R.K., Coles, J.A., Carissan, F.M.M. and Ramanathan, K., 1999. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. Aquat. Toxicol. 46, 43-54

Purcell, T.W. and Peters, J.J., 1998. Sources of silver in the environment. Environ. Toxicol. Chem. 17, 539-546

-R-

Radenac, G., Fichet, D. and Miramand, P., 2001. Bioaccumulation and toxicity of four dissolved metals in *Paracentrotus lividus* sea-urchin embryo. Mar. Environ. Res. 51, 151-166

Rainbow, P.S., 1990. Heavy metal levels in marine invertebrates. In: R.W. Furness and P.S. Rainbow (Eds), Heavy Metals in the Marine Environment. CRC Press

Rainbow, P.S., 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? Environ. Pollut. 120, 497-507

Rainbow, P.S., 2007. Trace metal bioaccumulation: Models, metabolic availability and toxicity. Environ. Int. 33, 576-582

Ranzi, S., 1926. La circulazione del liquido perivitelino nell'uovo dei Cefalopodi durante lo sviluppo embrionale. Boll. Soc. Nat. Napoli 38, 99-107

Ribolla, P.E.M., Bijovsky, A.T. and Bianchi, A.G., 2001. Procathepsin and acid phosphatase are stored in *Musca domestica* yolk spheres. J. Insect Physiol. 47, 225-232

Richard, A. 1971. Contribution à l'étude expérimentale de la croissance et de la maturation sexuelle de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). Thesis, Université de Lille

Richard, A., 1975. L'élevage de seiche (*Sepia officinalis* L., Mollusque, Céphalopode). 10th European Symposium of Marine Biology, Ostend, Belgium.

Riggio, M., Foilosa, S., Parisi, E. and Scudiero, R., 2003. Changes in zinc, copper and metallothionein contens during oocyte growth and early development of the teleost *Danio rerio* (zebrafish). Comp. Biochem. Physiol. 135C,

Roesijadi, G. and Robinson, W.E., 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. In: D.C. Malins and G.K. Ostranders (Eds), Aquatic Toxicology: Molecular, biochemical and cellular perspectives. Lewis Publishers, Chelsea, USA

Roesijadi, G., 1996. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. Comp. Biochem. Physiol. 113C, 117-123

Rombough, P.J., 1985. The influence of the zona radiata on the toxicities of zinc, lead, mercury, copper and silver ions to embryos of steelhead trout *Salmo gairdneri*. Comp. Biochem. Physiol. 82C, 115-117

Roper, C.F.E., Sweeney, M. and Nauen, C., 1984. Cephalopods of the world an annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries. FAO Species Catalogue 3, 277 pp

Rosenthal, H. and Sperling, K.R., 1974. Effects of cadmium on development and survival of herring eggs. In: J.H.S. Blaxter (Eds), The Early Life History of Fish. Springer Verlag, Berlin

Royer, J., Périès, P. and Robin, J.P., 2002. Stock assessments of English Channel loliginid squids: updated depletion method and new analytical methods. ICES J. Mar. Sci. 59, 445-457

Royer, J., Pierce, G.J., Foucher, E. and Robin, J.P., 2006. The English Channel stock of *Sepia officinalis*: Modelling variability in abundance and impact of the fishery. Fish. Res. 78, 96-106

-S-

Salvato, B., Santamaria, M., Beltramini, M., Alzuet, G. and Casella, L., 1998. The enzymatic properties of *Octopus vulgaris* hemocyanin : *o*-diphenol oxidase activity. Biochemistry 37, 14065-14077

Sanchez, M.V., Cahansky, A.V., Lopez Greco, L.S. and Rodriguez, E.M., 2005. Toxicity of mercury during embryonic development of *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura, Varunidae). Environ. Res. 99, 72-78

Schuel, H., Wilson, W.L., Wilson, J.R. and Bressler, R.S., 1975. Heterogeneous distribution of "lysosomal" hydrolases in yolk platelets isolated from unfertilized sea urchin eggs by zonal centrifugation. Dev. Biol. 46, 404-412

Sellin, M.K. and Kolok, A.S., 2006a. Cadmium exposures during early development: Do they lead to reproductive impairment in fathead minnows? Environ. Toxicol. Chem. 25, 2957-2963

Sellin, M.K. and Kolok, A.S., 2006b. Cd exposures in fathead minnows: Effects on adult spawning success and reproductive physiology. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51, 594-599

Sen, H. and Sunlu, U., 2007. Effects of Cadmium ($CdCl_2$) on development and hatching of eggs in European squid (*Loligo vulgaris* Lamarck, 1798) (Cephalopoda: Loliginidae). Environ. Monit. Assess. 133, 371-378

Siddiqui, N.L., Akosung, R.F. and Gielens, C., 2006. Location of intrinsic and inducible phenoloxydase activity in molluscan hemocyanin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 348, 1138-1144

Sire, M.F., Babin, P.J. and Vernier, J.M., 1994. Involvement of the lysosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embryonic development in trout. J. Exp. Zool. 269, 69-83

Smale, M.J., 1996. Cephalopods as prey. IV. Fishes. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 351, 1067-1081

Smith, G.J. and Flegal, A.R., 1993. Silver in San Francisco Bay estuarine waters. Estuaries 16, 547-558

Smith, V.J. and Söderhäll, K., 1991. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. Dev. Comp. Immunol. 15, 251-261

Smith, V.J. and Johnston, P.A., 1992. Differential haemotoxic effect of PCB congeners in the common shrimp, *Crangon crangon*. Comp. Biochem. Physiol. 101C, 641-649

Söderhall, K. and Smith, V.J., 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. Dev. Comp. Immunol. 7, 229-239

Söderhäll, K. and Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxydase-activating system in invertebrate immunity. Curr. Opin. Immunol. 10, 23-28

Sokal, R. and Rohlf, F., 1981. Biometry. San Francisco, 859 pp.

Stouthart, A.J.H.X., Spanings, F.A.T., Lock, R.A.C. and Wendelaar Bonga, S.E., 1994. Effects of low water pH on lead toxicity to early life stages of the common carp (*Cyprinus carpio*). Aquat. Toxicol. 30, 137-151

Sugiyama, H., Murata, K., Iuchi, I. and Yamagami, K., 1996. Evaluation of solubilizing methods of the egg envelope of the fish, *Oryzias latipes*, and partial determination of amino acid sequence of its subunit protein, ZI-3. Comp. Biochem. Physiol. 114B, 27-33

-T-

Tanaka, T., Hayashi, Y. and 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

Thomas-Guyon, H., Gagnaire, B., Bado-Nilles, A., Bouilly, K., Lapègue, S. and Renault, T., *submitted*. Detection of phenoloxydase activity in early stages of the Pacific oyster, *Crassostra gigas* (Thunberg).

Todd, W.L. and Morel, F.M.M., 2000. A biological function for cadmium in marine diatoms. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 4627-4631

-U-

Unrine, J.M., Jackson, B.P., Hopkins, W.A. and Romanek, C., 2006. Isolation and partial characterization of proteins involved in maternal transfer of selenium in the western fence lizard (*Sceloporus occidentalis*). Environ. Toxicol. Chem. 25, 1864–1867

-V-

Vallee, B.L. and Auld, D.S., 1990. Zinc coordination, function and strucuture of zinc enzymes and other proteins. Biochemistry 29, 5647-5659

Van Geen, A. and Luoma, S.N., 1993. Trace metals (Cd, Cu, Ni and Zn) and nutrients in coastal waters adjacent to San Francisco Bay, California. Estuaries 16, 559-566

Van Leeuwen, C.J., Griffioen, P.S., Vergouw, W.H.A. and Maas-Diepeveen, J.L., 1985. Differences in susceptibility of early life stages of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to environmental pollutants. Aquat. Toxicol. 7, 59-78

Viarengo, A. and Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 104C, 355-372

Villanueva, R., 1992. Continuous spawning in the cirrate octopods *Opisthoteuthis agassizii* and *O. vossi*: features of sexual maturation defining a reproductive strategy in cephalopods. Mar. Biol. 114, 265-275

Villanueva, R. and 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, 225-240

Von Westernhagen, H., Rosenthal, H. and Sperling, K.R., 1974. Combined effects of cadmium and salinity on development and survival of herring eggs. Helgol. Wiss. Meeresunters. 26, 416-433

Von Westernhagen, H., Dethlefsen, V. and Rosenthal, H., 1975. Combined effects of cadmium and salinity on development and survival of garpike eggs. Helgol. Mar. Res. 27, 268-282

-W-

Wang, W.-X., Fisher, N.S. and Luoma, S.N., 1996. Kinetic determination of trace element bioaccumulation in the mussel *Mytilus edulis*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 140, 91-113

Wang, X. and Zauke, G.-P., 2004. Size-dependent bioaccumulation of metals in the amphipod *Gammarus zaddachi* (Sexton 1912) from the River Hunte (Germany) and its relationship to the permeable body surface area. Hydrobiologia 151, 11-28

Warnau, M., Iaccarino, M., De Biase, A. and Temara, A., 1996a. Spermiotoxicity and embryotoxicity of heavy metals in the echinoid *Paracentrotus lividus*. Environ. Toxicol. Chem. 15, 1931-1936

Warnau, M., Teyssié, J.-L. and Fowler, S.W., 1996b. Biokinetics of selected heavy metals and radionuclides in the common Mediterranean echinoid *Paracentrotus lividus*: sea water and food exposures. Mar. Ecol. Prog. Ser. 141, 83-94

Warnau, M., Fowler, S.W. and Teyssie, J.-L., 1999. Biokinetics of radiocobalt in the asteroid *Asterias rubens* (Echinodermata): sea water and food exposures. Mar. Pollut. Bull. 39, 159-164

Wedemeyer, G., 1968. Uptake and distribution of Zn^{65} in the coho salmon egg (*Oncorhynchus kisutch*). Comp. Biochem. Physiol. 26, 271-279

Whicker, F.W. and Schultz, V., 1982. Radioecology : nuclear energy and the environment. CRC Press, Boca Raton, FL.

Wolf, G., Verheyen, E., Vlaeminck, A., Lemaire, J. and Decleir, W., 1985. Respiration of *Sepia officinalis* during the embryonic and early juvenile life. Mar. Biol. 90, 35-39

-Y-

Yim, M. and Boucaud-Camou, E., 1980. Cytological study of the post-embryonic development of the digestive gland of *Sepia officinalis* L. Mollusca: Cephalopoda. Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp. 69, 59-79

Yoshizaki, N. and Yonezawa, S., 1994. Cathepsin D activity in the vitellogenesis of *Xenopus laevis*. Dev. Growth Differ. 36, 299-306

Yoshizaki, N. and Yonezawa, S., 1998. Cysteine proteinase plays a key role for the initiation of yolk digestion during development of *Xenopus laevis*. Dev. Growth Differ. 40, 659-667

-Z-

Zatylny, C. 2000. Etude du contrôle de la ponte chez la seiche *Sepia officinalis* L.: Applications à la conservation des stocks et au repeuplement dans l'Ouest Cotentin. Thesis, Université de Caen Basse-Normandie

Zatylny, C., Gagnon, J., Boucaud-Camou, E. and Henry, J., 2000. ILME: a waterborne pheromonal peptide released by the eggs of *Sepia officinalis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 275, 217-222

Zatylny, C., Marvin, L., Gagnon, J. and Henry, J., 2002. Fertilization in *Sepia officinalis*: the first mollusk sperm-attracting peptide. Biochem. Biophys. Res. Commun. 296, 1186-1193

Résumé : Au printemps, la seiche commune *Sepia officinalis* effectue des migrations du large vers la côte pour se reproduire et mourir. La ponte a lieu en zone côtière, sujette à la contamination métallique d'origine anthropique, ce qui pose la question de la toxicité des éléments traces sur le développement embryonnaire. Dans ce travail, l'exposition à neuf radiotraceurs (^{110m}Ag, ^{241}Am, ^{109}Cd, ^{57}Co, ^{134}Cs, ^{203}Hg, ^{54}Mn, ^{210}Pb et ^{65}Zn) durant toute la durée du développement révèle que l'œuf de seiche possède de grandes capacités de bioaccumulation des éléments traces. Dans ce contexte, la capsule glycoprotéique de l'œuf joue un rôle majeur en fixant la plus grande proportion de ces éléments. La distribution des radiotraceurs dans l'œuf montre que cette capsule constitue une barrière protectrice contre la pénétration des métaux depuis la ponte jusqu'à la fin de l'organogenèse. Cependant, lorsque la phase de croissance de l'embryon et de l'œuf commence, la capsule montre progressivement une perméabilité sélective aux éléments traces jusqu'à l'éclosion. La disposition des composants de la capsule à les laisser diffuser à travers les différentes enveloppes qui la composent semble dépendante des propriétés chimiques des éléments traces mais aussi des processus biologiques liés à l'embryogenèse. Ainsi, certains éléments pénètrent dans l'œuf et s'accumulent dans l'embryon avec une affinité variable (i.e. Ag >> Zn > Hg > Mn > Co ≈ Cd > ^{134}Cs ≠ ^{241}Am, Pb).
Des expositions sur le long terme à l'Ag, au Cd et au Cu dissous (1, 0,5 et 250 µg.l^{-1}, respectivement) en condition expérimentale, n'ont aucun effet sur la croissance de l'œuf et n'induisent ni malformation, ni mortalité des embryons, confirmant l'effet protecteur de la capsule pendant les stades sensibles de l'embryogenèse. Néanmoins, pendant la période de croissance de l'embryon, l'Ag et le Cd semblent ralentir l'augmentation de l'activité des phosphatases acides, impliquée dans les processus digestifs alors que le Cu révèle un effet stimulateur. De même, l'activité de type phénoloxydase, impliquée dans les fonctions immunitaires des Invertébrés, décrite pour la première fois dans l'embryon de seiche, est modulée par l'Ag et le Cu, lors de la phase post-organogenèse.
Malgré le rôle protecteur de la capsule durant l'organogenèse, les éléments traces peuvent s'accumuler dans les embryons dès les premiers stades de développement du fait de leur apport par transfert maternel. Dans ce contexte, l'utilisation des radiotraceurs montre que le transfert de la mère à l'œuf est sélectif, 1) seuls l'Ag, le Se et le Zn étant transférés suite à une exposition de la mère par de la nourriture marquée au ^{110m}Ag,à l'^{241}Am, au ^{109}Cd, au ^{60}Co, au ^{134}Cs, au ^{54}Mn, au ^{75}Se et au ^{65}Zn et 2) le Se et du Zn étant stockés dans le vitellus de l'œuf alors que l'Ag se retrouve à la fois dans le vitellus et la capsule.

Abstract: The common cuttlefish *Sepia officinalis* makes large reproductive migrations in spring to mate and spawn in coastal waters. The eggs are laid in shallow waters and are therefore likely subjected to the anthropogenic contaminations leading to potential toxicity effects of metals during the embryonic development. In this study, cuttlefish eggs revealed efficient accumulation capacities following exposure to 9 dissolved radiotracers (^{110m}Ag, ^{241}Am, ^{109}Cd, ^{57}Co, ^{134}Cs, ^{203}Hg, ^{54}Mn, ^{210}Pb and ^{65}Zn) all along the development time. In this context, the eggshell played a key role in the accumulation process, as the greatest fraction of most of these elements remained associated with its glycoproteic components. The radiotracers distribution showed that the eggshell acts as an efficient shield against trace element penetration during organogenesis, i.e. during the first month of development. A selective permeability of the eggshell appeared during the last stages of the development, i.e when the embryo growth began until hatching. The trace element capacities to diffuse through the eggshell seemed to be dependent of their chemical properties and of the biological processes of the embryogenesis. Thus, metals could be accumulated in the embryo with various affinities (i.e. Ag >> Zn > Hg > Mn > Co ≈ Cd > ^{134}Cs ≠ ^{241}Am, Pb).
All along the development time, the exposure of the eggs to Ag, Cd and Cu (1, 0.5 and 250 µg.l^{-1}, respectively) in experimental conditions showed no effect on the egg growth and did not induce abnormalities or mortality in embryos, confirming the protective role of the eggshell during organogenesis. However, during the last developmental stages, Ag and Cd reduced the acid phosphatase activities, which are involved in the digestive processes, whereas Cu acted as an activator. Moreover, phenoloxidase-like activity, which is here reported in the embryo for the first time, was modulated during the post-organogenesis phase, following exposure to dissolved Ag and Cu.
Despite the protective role of the eggshell during the organogenesis, trace elements would be accumulated in the embryo during the first developmental stages following their maternal transfer in the egg. In this context, radiotracers technique highlighted that the maternal transfer was a selective way, 1) with only Ag, Se and Zn being transferred following a dietary exposure of the female to ^{110m}Ag, ^{241}Am, ^{109}Cd, ^{60}Co, ^{134}Cs, ^{54}Mn, ^{75}Se and ^{65}Zn, and 2) Se and Zn being incorporated in the vitellus whereas Ag was found in similar proportions in the vitellus and in the eggshell.