





# Université de Caen Basse-Normandie

U.F.R. : Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée Ecole doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

THESE DE DOCTORAT

présentée par

**Mr Georges Safi** 

et soutenue

Le 13 mai 2013

en vue de l'obtention du

# Doctorat de l'Université de Caen Basse-Normandie

Spécialité : Physiologie, Biologie des organismes, Populations, Interactions (Arrêté du 07 août 2006)

# Etude de la variabilité spatio-temporelle des caractéristiques physiologiques des jeunes stades de vie de la seiche *Sepia officinalis* L. en Manche.

Directeur de thèse : Noussithé Koueta

## MEMBRES DU JURY

Mr. Pedro Andrade Mr. Graham Pierce Mme Cécile Bellanger Mme Estelle Le Bihan Mr. Jean-Paul Robin Mr. Noussithé Koueta Professeur, Université de Faro Professeur, Université d'Aberdeen Maître de Conférences HDR, Université de Caen Docteur, Directrice société IVAMER Professeur, Université de Caen Maître de Conférences HDR, Université de Caen Rapporteur Rapporteur Examinateur Examinateur Examinateur Directeur de thèse

# Titre : Etude de la variabilité spatio-temporelle des caractéristiques physiologiques des jeunes stades de vie de la seiche *Sepia officinalis* L. en Manche.

## Résumé :

La seiche commune Sepia officinalis, est une des principales ressources marines exploitées en Manche. Elle présente de fortes variations saisonnières et interannuelles au recrutement. Les mécanismes affectant le renouvellement du stock par l'arrivée des nouvelles « recrues » et leur effectif doivent être mieux élucidés. Ainsi l'étude de la variabilité spatio-temporelle des caractéristiques physiologiques des stades « pré-recrues » a été menée dans quatre sites de ponte en Manche [i.e. Agon Coutainville (FR), Baie de Seine (FR), Selsey (UK) et Torbay (UK)]. Les paramètres étudiés étaient la qualité des œufs et des taux d'éclosion puis, les performances digestives et immunitaires des juvéniles, en relation avec les conditions environnementales locales. Les œufs des sites anglais ont des éclosions plus tardives et un taux d'éclosion supérieur comparé à ceux des sites français. La température et la salinité, sont importantes dans la compréhension de ces différences. Les performances digestives des animaux à l'éclosion varient en fonction des sites. L'étude des activités enzymatiques immunitaires a montré des vulnérabilités locales des jeunes stades qui induisent des épisodes de forte mortalité. Ces mortalités sont corrélées à des œufs montrant un faible contenu protéique et ayant de faibles activités immunitaires. Ces résultats indiquent des variabilités spatio-temporelles dans les caractéristiques des jeunes stades de la seiche qui influencent la contribution des différents sites au stock de S. officinalis en Manche.

# Title: Spatial and temporal variability of cuttlefish *Sepia officinalis* L. physiological characteristics in its early life stages in the English Channel

#### Abstract :

The common cuttlefish *Sepia officinalis*, is a major exploited marine resource in the English Channel. It has strong seasonal and interannual variations in recruitment. Mechanisms affecting the renewal of the stock by the arrival of new "recruits" and their number need to be better understood. Thus the study of the spatial and temporal variability of "pre-recruits" physiological characteristics was conducted in four spawning sites of the Channel [*i.e.* Agon Coutainville (FR), Baie de Seine (FR), Selsey (UK) and Torbay (UK)]. The studied parameters were the eggs quality and hatching rate then, the digestive and immune performance of juveniles in relation to local environmental conditions. English eggs have a delayed hatching time and higher hatching rate when compared to the French ones. Temperature and salinity are important in understanding these differences. The digestive performance of hatchlings varied according to the site. The study of immune enzyme activities showed local vulnerabilities of early stages which corresponded to episodes of high mortality. These mortalities are correlated with low protein content and low immune activities in eggs. These results underline how variability in the spatio-temporal characteristics of the early life stages of cuttlefish can influence the contribution of spawning sites to *S. officinalis* stock in the English Channel.

**Mots-clés :** Seiche, recrutement (biologie),œufs--incubation, enzymes digestives, protéases, lysozyme, écophysiologie, Manche (mer).

**Key-Words :** Cuttelfish, recruitment (Population biology), eggs--incubation, digestive enzymes, proteinase, lysozyme, ecophysiology, English Channel.

Disciplines: physiologie, biologie des organismes, populations, interactions.

CNRS INEE – FRE3484 BioMEA Biologie des Mollusques marins et des Ecosystèmes Associés – IBFA – Université de Caen Basse-Normandie – 14032 Caen Cedex

# **Avant-propos**

Ce travail de recherche a été réalisé au sein de l'Ecole doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EDNBISE 497) dans le laboratoire de Biologie des Mollusques marins et des Ecosystèmes Associés (CNRS INEE – FRE3484 BioMEA) à l'Université de Caen, et au Centre de Recherche en Environnement Côtier (CREC) à Luc sur mer.



Cette thèse, effectuée sous la direction de Monsieur Noussithé Koueta (Maître de conférences, HDR à l'Université de Caen), s'inscrit dans le cadre du projet INTERREG IV A - CRESH (Cephalopod Recruitment from the English Channel Spawning Habitats). Elle a été cofinancée par les Fonds Européens de Développement Régional (FEDER) et par le Conseil Régional de Basse-Normandie.



Les travaux du projet CRESH ont été accompli sous le leadership de l'Université de Caen (Leader du projet : Professeur Jean-Paul Robin) et ont regroupé sept partenaires Anglais et Français (University of Plymouth, Royal Holloway University of London, Devon and Severn, CEFAS, Université de Caen, IFREMER et le Comité Régional des Pêches Maritimes Basse-Normandie).



# Remerciements

J'adresse mes premiers remerciements à mon directeur de thèse, Monsieur Noussithé Koueta, Maître de conférences, HDR à l'Université de Caen pour m'avoir fait confiance en me proposant cette thèse, il y a de cela un peu plus de trois ans et demi. Ses conseils tout au long de ces années ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je suis reconnaissant aux professeurs Michel Mathieu, ancien directeur du laboratoire, et Pascal Sourdaine, Directeur actuel du laboratoire, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Biologie des Mollusques marins et des Ecosystèmes Associés (CNRS INEE – FRE3484 BioMEA) dont ils ont assurés successivement la direction.

Je souhaite témoigner ma reconnaissance à monsieur Pedro Andrade, professeur à l'Université de Faro (Portugal), et à monsieur Graham Pierce, professeur à l'Université d'Aberdeen (Ecosse) d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Leur expertise scientifique sur ce travail et leur participation au Jury de thèse sont un honneur pour moi.

Je voudrais remercier madame Cécile Bellanger, Maître de conférences, HDR à l'Université de Caen pour avoir accepté de juger ce travail et de participer au jury de thèse.

Que le Professeur Jean-Paul Robin, passionné des céphalopodes et de leur modélisation, trouve ici une grande reconnaissance de ma part pour les heures consacrées à m'expliquer les lois de la statistique et de m'avoir aidé à convertir mes incertitudes scientifiques en inférences valides. Je tiens également à le remercier d'avoir accepté d'être membre de mon Jury de thèse.

Je désire exprimer ma sincère reconnaissance au docteur Estelle Le Bihan, directrice de la Société IVAMER, pour m'avoir fait découvrir le « phénomène seiche » en juin 2004, au cours d'un stage non obligatoire effectué avec elle sous la direction de Mr. Koueta. Depuis, les années ont passé mais son soutien est toujours la. C'est une grande joie pour moi de l'avoir aujourd'hui en tant que membre du Jury de thèse.

Je tiens à remercier le professeur Jean-Marc Lebel pour son aide qui m'a permis de commencer ma thèse dans les temps. Je le remercie aussi pour ses divers conseils au cours de mes années de thèse.

I would like to thank Doctor Isobel Bloor and Doctor Emma Jackson, from the Marine Biological Association of Plymouth, for their help in sample collection from the English sites and the transportation logistics of the biological material to France. Furthermore, I would like to thank Isobel for her good humor. We spent a lot of time together and I have very fond memories. Je souhaite remercier Mesdames, Karine Grangeré et Anne-Sophie Martinez, toutes les deux maîtres de conférences à l'Université de Caen, pour leur aide et leurs nombreux conseils et suggestions. Je souhaite aussi les remercier pour tous les moments « hors professionnel » passés ensemble.

Que Messieurs Charles Le Pabic et Michael Gras trouvent ici l'expression de mon amitié pour ces années partagées ensemble sur l'étude des céphalopodes avec notre petite seiche normande. Michael est devenu mon mentor de la « matrix » et m'a contaminé avec son excellent programme « R ». Quant à Charles, c'est mon compagnon des dosages biochimiques et surtout des élevages des petites seiches.

Je remercie Nawal el Boustani, Rémi Pain et Cécile Gozlan pour leur gestion successive des aspects administratifs du projet CRESH et surtout pour leur grande sympathie.

Merci à Madame Mathieu pour sa gestion des aspects administratifs des projets région ainsi que pour sa disponibilité.

Un grand merci à Madame Béatrice Adeline, technicienne du laboratoire BioMEA. Sans elle, l'histologie serait restée une simple idée sur un papier.

Merci à toutes les personnes du laboratoire, Professeurs, Maîtres de conférences, post-doc, techniciens et contractuels avec qui j'ai pu avoir des échanges scientifiques ou non scientifique. Je pense à Pascal Claquin (pour les nombreuses fois ou tu m'as conseillé et aidé), Francis Orvain (pour les moments passés ensemble à préparer les TP à l'IUT), Antoine Serpentini et Katherine Costil (pour le nombre de fois ou vous m'avez conseillé sur divers aspects scientifiques), Céline Zatylny-Gaudin (pour les techniques en bactério), Christophe Roger (pour ton aide technique et ta bonne humeur communicative), Marie-Pierre, Sandra...

Je remercie Benoît Bernay, Ingénieur de Recherche à la plateforme PROTEOGEN, et toutes les personnes de la plateforme de m'avoir donné accès aux appareils et conseillé sur leurs utilisation.

*Je tiens à remercier l'ensemble du personnel technique du Centre de Recherche en Environnement Côtier de Luc sur mer pour les multiples interventions que nécessitent les élevages et leur mise en place.* 

Un spécial grand merci à Jehane Lepoittevin, amie et ancienne technicienne du projet CRESH, qui m'a apporté une grande aide dans la mise en place et le suivi des élevages de seiche.

Je remercie Mademoiselle Dalal Khouatria, étudiante en master 2 AquaCaen, pour son travail au cours de son stage de master 2 au laboratoire BioMEA. Ses résultats ont servi en partie aux résultats du chapitre 4 de cette thèse. Je lui suis très reconnaissant.

Je remercie vivement tous les étudiants, Mesdemoiselles Maelle Nexer, Marie Vrard, Hélène Desmares, Mégane Capel, Laura Varin, Marion Lavenier, Marjorie, Vanessa Dacleu et Messieurs Allyre Loyer, Clément Anfray, Remy Legigan, Maxime Leforestier, Fan Qin, Hugo Lebredonchel, Antoine Bonnieux et Julien Besnard que j'ai reçu en stage pour l'immense aide qu'ils m'ont apporté au laboratoire comme sur le terrain.

Je n'oublie pas aussi tous mes collègues avec qui j'ai passé toutes ces années au laboratoire. Ils ont tous contribué au plaisir de travailler dans une ambiance agréable. Alban, Alex, Antoine (ma blondinette), Aude, Cécile, Céline, Christelle, Déborah, Elham (ma petite iranie), Elmina, Jeronimo (monsieur UV), Laeticia, La Napoléon (Bajo...asse), Margaux, Marie, Martinou, Maxine, Nadège, Rached, Valérie, Sami, Stéphanie, Thomas (tu ne le sais pas encore mais...tu l'es !), Toinou...

Un grand merci à ma Pauline, collègue et amie, pour avoir partagé avec moi de très nombreux moments, dans le meilleur et dans le pire, et d'avoir toujours été là pour moi.

Une pensée particulière à Hélène et Aline, amies de très longue date maintenant, et soutien indéfectible depuis tant d'années. Aujourd'hui encore, vous m'avez été d'une aide extrêmement précieuse et vous avez répondu à mes besoins sans aucune hésitation. Merci à toutes les deux pour l'aide que vous m'avez apporté pour corriger ce travail de thèse.

Je tiens à remercier aussi Lilie, Laurette, Anthony, Célia, Antoine, Virginie, Benoit, Pascal, Mel, Marine et tous mes amis Caennais. Je n'oublie, bien évidemment pas mes très proches amis libanais, Jihane, Andy et Joe...Yallah wasil a beyrouth !!

Je ne terminerai pas sans adresser un immense merci à ma famille, à mes parents, à mon frère, à mes deux sœurs, à ma tâtâ, à mes grands parents adoptifs français (Gigi et Paulo) et à Bruno et Anne-sophie. Vous avez toujours été un soutien pour moi durant ces années « thèse » et m'avez beaucoup encouragé.

Enfin, à Boris, une énorme reconnaissance pour ton soutien à tous les niveaux. C'est en grande partie grâce à toi que je suis là aujourd'hui.

# <u>Sommaire</u>

INTRODUCTION GENERALE
I. CONTEXTE SCIENTIFIQUE
II. DESCRIPTION DE L'ESPECE ETUDIEE : SEPIA OFFICINALIS (LINNE, 1758)
A. Généralités et classification5
B. Aire de distribution dans le monde6
C. Cycle de vie et reproduction8
1. Cycle de vie8
2. Maturation sexuelle, reproduction et ponte9
D. Les stades de pré-recrues11
1. Le développement embryonnaire11
2. Croissance des juvéniles sur la côte jusqu'au début du recrutement
III. EXPLOITATION DES SEICHES ET AUTRES CEPHALOPODES EN MANCHE
A. Pêcherie des céphalopodes13
B. Exploitation de la seiche en Manche15
1. Principaux engins de pêche et saisonnalité15
2. Pays exploitants et proportionnalités15
C. Variabilités interannuelles dans le stock16
IV. OBJECTIFS DE LA THESE
CHAPITRE 1 : Caractéristiques spatio-temporelles des œufs et des pré-recrues de
seiche Sepia officinalis
I. INTRODUCTION23
A. Adaptation des céphalopodes aux interactions environnementales23
1. Ecophysiologie et adaptation23
2. Les contraintes du développement, l'hétérochronie et les stratégies adaptatives23

3	8.	Les interactions environnementales	26
4	ŀ.	Formation de sous-populations d'une espèce donnée : cas de la seiche Sepia officinalis.	26
5	5.	La population de seiche en Manche	27
В.	Bi	io-écologie du développement des jeunes stades de vie de Sepia officinalis	27
1	L.	Caractéristiques bioécologiques étudiées	27
2	2.	Influence de différents facteurs abiotiques et anthropiques sur le développement	t
e	emt	pryonnaire et la croissance des juvéniles de seiche	28
3	8.	Influence des facteurs biotiques sur la croissance des juvéniles	32
C.	С	roissance des seiches aux premiers stades de vie	36
D.	С	ontexte et but de ce chapitre	37
II. V	/AR	ATIONS SPATIO-TEMPORELLES DANS LES CARACTERISTIQUES DES SEICHES AU COURS	5
DE LE	UR	JEUNES STADES DE DEVELOPPEMENT EN MANCHE	39
Α.	In	troduction	43
В.	Μ	laterial and methods	45
1	L.	Study spawning sites	45
2	2.	Eggs collection and handling	46
3	8.	Experimental design	47
4	ŀ.	Data modeling and statistical analysis	49
C.	Re	esults	50
1	L.	Hatching and juveniles survival rates	50
2	2.	Experimental growth survey	53
3	8.	Hatchlings and environmental parameters	55
D.	D	iscussion	57
1	L.	Coastal spawning sites and hatching rate	57
2	2.	Impact of environmental factors on eggs incubation and hatchlings weight	61
3	8.	Hatchlings growth and survival	62

E. Conclusion	64
II. EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LA CROISSANCE DES PRE-RECRUES A. Introduction	67 67
B. Matériel et méthodes	67
1. Matériel biologique	67
2. Conditions d'élevage et expérimentation	68
3. Paramètres de croissance	69
4. Données de température	70
5. Analyses statistiques	70
C. Résultats	71
1. Caractéristiques des pré-recrues récoltées	71
2. Effet d'un degré de température sur la croissance des juvéniles	72
D. Discussion	74
E. Conclusion	77
IV. CONCLUSION	79
CHAPITRE 2 : Etude du système digestif et sa maturation chez Sepia officinalis	83
I. INTRODUCTION	85
A. Les organes digestifs chez Sepia officinalis	85
1. Anatomie de l'appareil digestif de la seiche	85
2. Les étapes de la digestion	86
3. La glande digestive: organe clé du système digestif	86
B. Les enzymes digestives chez la seiche	88
1. Nature et action des enzymes digestives	88
2. Localisation de ces enzymes dans les principaux organes digestifs	90
C. Maturation de la glande digestive chez les juvéniles de seiche au premier mois pos	st-
éclosion	91

D. But de l'étude94
II. ETUDE DE LA MATURATION DE LA GLANDE DIGESTIVE DE JUVENILES DE SEICHE, SEPIA
OFFICINALIS, PROVENANT DE DIFFERENTS SITES DE PONTE AVEC DES OUTILS BIOCHIMIQUES ET
HISTOLOGIQUE
A. Introduction
B. Material and methods102
1. Egg sampling and experimental juvenile growth survey102
2. Enzymes extraction and assays103
a) Enzyme extraction103
b) Total protein concentration103
c) Enzyme assays103
d) Enzymes ratio104
3. Histology104
4. Statistical analysis105
C. Results105
1. Growth survey105
2. Digestive enzyme activities and ratios107
3. Histological features of the maturing digestive gland110
4. Correlations at hatching (0 DAH) between digestive gland characteristics and digestive
enzymes116
5. Correlations between enzyme ratios, juvenile weight and the digestive gland histological
features117
D. Discussion
1. Embryonic to post-embryonic digestion transition119
2. Post-embryonic to juvenile-adult digestion transition122
3. Biochemical and histological tools to assess the digestive gland maturation in early life
history of cuttlefish125

E.	Conclusion	126
III.	ETUDE COMPARATIVE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES DIGESTIVES DES ŒUF	S ET DES PRE-
REC	CRUES DE SEICHE	131
A	A. Introduction	131
B	B. Matériel et méthodes	132
	1. Matériel biologique	132
	2. Extraction et essais enzymatiques	132
	3. Résultats et analyses statistiques	133
C	C. Résultats	133
	1. Activités enzymatiques digestives dans les œufs de seiche	133
	2. Activités et ratios enzymatiques dans la glande digestive des pré-recrues	de seiche135
	3. Corrélations entre les activités enzymatiques digestives et le poids et la	taille des pré-
	recrues	137
۵	D. Discussion	139
E	Conclusion	143
IV.	CONCLUSION	145
СН	APITRE 3 : Etude du système immunitaire chez Sepia officinalis	151
I.	INTRODUCTION	153
A	A. Immunité et système immunitaire	153
	1. Immunité innée	153
	2. Immunité acquise	153
E	<ol> <li>Les principaux paramètres du système immunitaire inné</li> </ol>	153
	1. Les paramètres physiques	154
	2. Les cellules du système immunitaire inné	154
	3. Les paramètres humoraux	155
C	C. Immunobiologie de la seiche et des céphalopodes	157

D.	Infections, parasitisme et pollution	159
E.	But de l'étude	159
П.	ACTIVITES ANTIPROTEASE, LYSOZYME ET PHENOLOXIDASE DANS LES PRINC	CIPAUX TISSUES
DE L	A SEICHE SEPIA OFFICINALIS L	161
A. Int	troduction	165
B. M	laterial and methods	167
1.	Animals and tissue samples	167
2.	Enzyme extraction and measurements	168
3.	Data analysis	170
C. Re	esults	171
1.	Antiprotease assay	171
2.	Phenoloxidase assay	172
3.	Lysozyme assay	173
D. Di	iscussion	174
1.	Antiprotease activity	175
2.	Phenoloxidase activity and ProPO activation	176
3.	Lysozyme-like activity	178
4.	Lysozyme, antiprotease and prophenoloxidase distribution	181
III. ET	TUDE DE L'ACTIVITE LYSOZYME DANS LES ŒUFS, LES JUVENILES D'ELEVAG	GE ET LES PRE-
RECRU	JES DE SEICHE	
Α.	Introduction	183
В.	Matériel et méthodes	183
1.	Matériel biologique	183
2.	Extraction et essai enzymatique	
3.	Analyses statistiques	184
C.	Résultats	

	1.	Les œufs et les juvéniles d'élevage	.185
	2.	Les pré-recrues de seiche	.187
D	). C	Discussion	.189
	1.	Activité lysozyme dans les œufs de seiche et évolution de cette activité chez	les
	juv	éniles au premier mois post-éclosion	.189
	2.	Variabilité spatio-temporelle de l'activité lysozyme chez les pré-recrues de seiche	.191
E	. c	Conclusion	.193
VI.	coi	NCLUSION	.195
СН	API	TRE 4 : Etude de la composition des œufs, des juvéniles, des pré-recrues	et
de	s pro	oies de <i>Sepia officinalis</i>	.199
I.	INT	RODUCTION	.201
II.	MA	ATERIEL ET METHODES	.203
А	. N	Vatériel biologique	.203
	1.	Les œufs de seiche	.203
	2.	Les juvéniles d'élevage	.203
	3.	Les pré-recrues	.203
	4.	Les seiches et proies du milieu	.203
В	. P	Préparation des échantillons	.205
С	. C	Dosages biochimiques	.206
	1.	Les protéines (P)	.206
	2.	Les glucides (G)	.206
	3.	Les lipides (L)	.207
	4.	Le contenu en eau	.207
	5.	Les acides gras	.208
D	). L	es analyses statistiques	.208
III.	RES	SULTATS	.209

	1.	Les proies collectées dans les sites français2	09	
	2.	Composition GPL des œufs de seiche2	10	
	3.	Composition GPL des juvéniles à l'éclosion2	10	
	4.	Composition GPL des juvéniles d'élevage (7 à 35 jours post-éclosion)2	13	
	5.	Composition GPL des manteaux de pré-recrues2	16	
	6.	Composition en acides gras des œufs, des juvéniles à l'éclosion, des manteaux de pré	!-	
	rec	crues et des proies du milieu2	18	
IV.	DIS	SCUSSION2	24	
	1.	Composition des œufs et des juvéniles de seiche en milieu expérimental issus de	s	
	dif	férents sites étudiés2	24	
	2.	Composition du manteau des pré-recrues et des proies récoltées dans différents site	S	
	de	ponte2	28	
V.	CO	NCLUSION2	30	
со	NC	LUSION GENERALE ET PERSPECTIVES2	33	
I.	ſ	Principaux résultats obtenus au cours de ce travail2	35	
II	. I	ntégration des résultats dans le projet CRESH2	40	
II	I. I	Perspectives2	42	
BIE	BLIC	OGRAPHIE2	45	
PR	PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES			

# **Abréviations :**

## Sites étudiés

AC: Agon Coutainville (France) BS: Bay of Seine (France) SE: Selsey (UK) TB: Torbay (UK)

## Chapitre 1

CR: Conversion rate EDD: Experimental day-degrees IGR: Instantaneous growth rate IR: Ingested rate NDD: Natural day-degrees TC : Taux de conversion TCI: Taux de croissance instantané TI : Taux d'ingestion

#### Chapitre 2

ACP: Acid Phosphatases ALP: Alkaline Phosphatases CL: Cell length DAH: Days after hatching DGD: Digestive gland development IYS: Internal yolk surface NBC: Number of "boules" per cell

#### Chapitre 3

APO: activated phenoloxidase BH: branchial hearts BHA: branchial heart appendages DG: digestive gland DGA: digestive gland appendages DML: dorsal mantle length HEW: hen egg white L-DOPA: 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine OL: optic lobes PO: phenoloxidase proPO: prophenoloxidase PSG: posterior salivary glands SH: systemic heart Stc: stomach WB: white body

# Chapitre 4

AA : Acides arachidoniques (C20 :4n-6)

AG : Acides gras

AGI : Acides gras insaturés

AGMI : Acides gras mono-insaturés

AGPI: Acides gras poly-insaturés

DHA: Acides docosahexaénoique (C22 :6n-3)

EPA: Acides eicosapentaénoique (C20 :5n-3)

GPL: Glucides, lipides et protéines

n-3 : Oméga 3

n-6 : Oméga 6

n-9 : Oméga 9

# **INDEX DES FIGURES**

#### INTRODUCTION GENERALE

Figure 1: Vue latérale interne d'une seiche: anatomie générale6
Figure 2: Répartition géographique de l'espèce Sepia officinalis dans le monde7
Figure 3 : Cycles de migrations et zones de pontes de la seiche Sepia officinalis en Manche8
Figure 4 : Photos de différents supports de fixation des œufs de seiche Sepia officinalis10
Figure 5 : Schéma récapitulatif des principaux stades de développement embryonnaire chez la
seiche, Sepia officinalis L12
Figure 6: Saisonnalité des apports bas-normands de seiches Sepia officinalis en pourcentage
annuel
Figure 7 : Total des débarquements annuels de seiches (tonnes) par pays exploitant dans les
divisions du CIEM17
CHAPITRE 1
Figure 8: Figure représentant la distribution de Sepia officinalis dans le monde et différentes
sous-populations en mer méditerranée et en Atlantique Nord-Est
Figure 9: Effet de la densité de seiches en culture par m <sup>2</sup> sur leur croissance et leur survie35
Figure 10: Schéma récapitulatif des influences environnementales (biotiques et abiotiques) et
des activités humaines sur la croissance embryonnaire et post-éclosion de Sepia officinalis.38
Figure 11: Study spawning sites distribution of Sepia officinalis in the English Channel. The
monitored spawning sites are: BS (Bay of Seine-FR), AC (Agon Coutainville-FR), TB (Torbay-
UK) and SE (Selsey-UK)45
Figure 12: Linear transformation of the exponential growth models fitted to Sepia officinalis early
juvenile experimental growth from different spawning sites of the English Channel over
four years54
Figure 13: Schéma du système d'élevage utilisé pour avoir deux bacs avec les mêmes conditions
abiotiques avec, comme seul facteur différent, la température de l'eau
Figure 14: Suivi quotidien des températures de l'eau des bacs d'élevage70
Figure 15 : Poids (g) des pré-recrues de seiche collectées dans différents sites de ponte en 2010
et en 201171
Figure 16: Suivi des paramètres de croissance de juvéniles de seiche provenant de deux sites
différents (BS : Baie de Seine et AC : Agon Coutainville) et élevés à 1°C de différence
pendant 35 jours d'élevage73
Figure 17: Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus sur les variations spatio-
temporelles des caractéristiques des œufs et des juvéniles de seiche en Manche80
CHAPIIKE 2

Figure 18: Anatomie de l'appareil digestif de la seiche, Sepia officinalis L	85
Figure 19: Types morphologiques de la cellule digestive de Sepia officinalis.	87
Figure 20: Les différentes phases de digestion ou étapes physiologiques des cellules à « boule	s »
de la glande digestive de Sepia officinalis L.	89

Figure 21: Coupe longitudinale de la glande digestive de Sepia officinalis L. à l'éclosion......92 Figure 22: Croissance, alimentation et maturation du système digestif chez les jeunes seiches, Figure 23: Study spawning sites distribution of Sepia officinalis in the English Channel. The monitored spawning sites are: BS (Bay of Seine-FR), AC (Agon Coutainville-FR), TB (Torbay-UK) and SE (Selsey-UK)......102 Figure 24 : Growth of cuttlefish Sepia officinalis juvenile hatched from eggs collected at different spawning locations, and two different years followed in their early post-hatching days. ....106 Figure 25: Cathepsin and trypsin activities and enzyme ratios in cuttlefish Sepia officinalis L. hatched from eggs collected at different spawning locations, in their early post-hatching Figure 26: Acid and alkaline phosphatases activities and enzyme ratios in cuttlefish Sepia officinalis L. hatched from eggs collected at different spawning locations, in their early Figure 28 : Cuttlefish digestive cells length (CL, barplot A) and mean number of « boules » per cell (NBC, barplot B) evolution in early post hatching days (35 DAH) of juveniles hatched from Figure29: Sepia officinalis. Longitudinal sections of the digestive gland stained with Prenant-Gabe trichrome. Individuals at (A) 0 DAH and (B) 7 DAH .....113 Figure 30: Sepia officinalis. Longitudinal sections of the digestive gland stained with Prenant-Gabe trichrome. Individuals at (A) 14 DAH and (B) 21 DAH .....114 Figure 31: Sepia officinalis. Longitudinal sections of the digestive gland stained with Prenant-Gabe trichrome. Individuals at (A) 28 DAH and (B) 35 DAH .....115 Figure 32: Correlations between different digestive gland characteristics in cuttlefish, Sepia Figure 33: Correlations between digestive gland characteristics at hatching day (0 DAH) with enzyme activities (Linear regressions A and B) and enzyme ratio (Linear regressions C and D) in cuttlefish, Sepia officinalis L., hatchlings. .....117 Figure 34: Correlations between enzyme ratios (ALP/ACP and Trypsin/Cathepsin) and fitted growth linear model (Linear regressions A and B), NBC (Linear regressions C and D) and CL Figure 35: Trypsine (A), cathepsine (C), alkaline (ALP) (B) and acide (ACP) (D) phosphatases activities and trypsine/cathepsine (E) and ALP/ACP (F) ratios in cuttlefish Sepia officinalis L. hatched from eggs collected at different spawning locations, in their early post-hatching Figure 36 : Activités de la trypsine et de la cathepsine ainsi que le ratio trypsine/cathepsine dans la glande digestive de pré-recrues de seiche Sepia officinalis récoltées dans trois sites de ponte en Manche en 2010 (graphes A, C et E) et 2011 (graphes B, D et F) ......134

#### **CHAPITRE 3**

Figure 42 : Schéma représentant les deux systèmes immunitaires ainsi que les différentes
barrières contre les infections microbiennes154
Figure 43 : Schéma représentant les activités des cellules immunitaires d'invertébrés à la suite de
l'entrée d'agents pathogènes dans le corps155
Figure 44 : Haemocytes de juvéniles de seiche Sepia officinalis (< 30 jours post-éclosion)
observées en microscopie optique (objectif x 100). (Photos personnelles)157
Figure 45 : Schéma proposé par Claes (1996) des différentes étapes de la maturation des
haemocytes de seiche Sepia officinalis158
Figure 46 : Internal anatomy of cuttlefish Sepia officinalis L., with studied tissues167
Figure 47 : Antiprotease activity (Trypsin Inhibition % µg prot <sup>-1</sup> ) in studied tissues of cuttlefish
<i>Sepia officinalis</i> L. (n = 10)171
Figure 48: PO-like and APO-like activities (U mg prot <sup>-1</sup> ) in studied tissues of cuttlefish Sepia
<i>officinalis</i> L. (n = 10)172
Figure 49 : Lysozyme-like activity (µg HEW Lysozyme eq. mg prot <sup>-1</sup> ) in studied tissues of cuttlefish
<i>Sepia officinalis</i> L. (n = 10)174
Figure 50: Principal component analysis of antiprotease, lysozyme-like and proPO induce
activities in studied tissues of cuttlefish Sepia officinalis L
Figure 51 : Activité lysozymale (Eq. HEWL/mg prot <sup>-1</sup> : équivalent lysozyme de blanc d'œufs de
poule/mg de protéine) dans les œufs de seiches (Graphes A, C et E) et les juvéniles dans
leurs premiers stades de développement post-éclosion (35 jours, Graphes B, D et F) et en
fonction de différents sites de ponte en Manche186
Figure 52 : Activité lysozymale chez les pré-recrues de seiche provenant de différents sites de
ponte en Manche en 2010 (Graphe A) et 2011 (Graphe B)

igure 53 : Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus sur les variations spatiales de	
l'activité lysozyme des œufs, des juvéniles et des pré-recrues de seiche Sepia officinalis en	
Manche19	6

#### **CHAPITRE 4**

Figure 54 : Etapes de préparation et de pose des pièges dans les sites pour la collecte de proies et
de juvéniles de seiche <i>Sepia officinalis</i> 204
Figure 55 : Liste des familles d'espèces collectées dans les deux sites français en juillet et en août
2010
Figure 56 : Contenu en protéines, lipides et glucides totaux (% poids sec) des œufs de seiche
(vitellus + embryon) provenant de 4 sites de ponte en Manche en 2010 (Graphes A, C et E)
et 2011 (Graphes B, D et F)211
Figure 57 : Contenu en protéines, lipides et glucides totaux (% poids sec) des juvéniles à
l'éclosion provenant de 4 sites de ponte en Manche en 2010 (Graphes A, C et E) et 2011
(Graphes B, D et F)212
Figure 58 : Profils généraux de l'évolution des protéines, des lipides et des glucides chez les
juvéniles de seiche Sepia officinalis au premier mois post-éclosion
Figure 59 : Dosage des contenu en protéines, lipides et glucides totaux (% poids sec) des
manteaux de pré-recrues provenant de 3 sites de ponte en Manche en 2010 (Graphes A, C
et E) et 2011 (Graphes B, D et F)217
Figure 60 : Analyse en composantes principales de la composition en acides gras des œufs de
seiche Sepia officinalis issus de quatre sites de ponte anglo-normands et de trois années
d'étude (2009, 2010 et 2011)226
Figure 61 : Analyse en composante principales de la composition en acides gras des manteaux de
seiche Sepia officinalis (A) et des proies récoltées dans les sites côtiers (B) sur deux ans de
suivi (2010 et 2011)

#### CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Figure 62 : Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus sur les variations spatiales et temporelles des caractéristiques des juvéniles de seiche *Sepia officinalis* en Manche.......237

# **INDEX DES TABLEAUX**

#### **INTRODUCTION GENERALE**

Tableau 1 : Position systématique de Sepia officinalis Linnaeus, 1758	5
Tableau 2 : Croissance et maturation sexuelle des seiches Sepia officinalis en Manche	9

## **CHAPITRE 1**

Tableau 3 : Recueil littéraire du concept de contraintes développementales décrites par
différents auteurs24
Tableau 4 : Recueil littéraire du concept d'hétérochronie décrit par différents auteurs25
Tableau 5 : Recueil littéraire du concept stratégie adaptative décrit par Steams (1992)25
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des influences de la température, de la salinité et de la
photopériode sur différents paramètres biologiques des premiers stades de vie de la seiche
Sepia officinalis
Tableau 7 : Effets de la qualité nutritionnelle de proies (différentes espèces ou différents état
physiologique) sur la croissance (TCI: Taux de croissance instantanée (% poids seiche/jour)),
le taux d'ingestion (TI, % poids seiche/jour) et la survie des seiches (TS, %)
Tableau 8: Size classes, based on brown shrimps (Crangon crangon) total length and their
subsequent mean weight, used to feed Sepia officinalis hatchlings48
Tableau 9: Hatching and hatchling survival (35 days of rearing) rates obtained for cuttlefish eggs
collected from different spawning sites over several seasons
Tableau 10: Comparison of mean weight (± s.e.), mean ingested rate (IR %) (± s.e.), mean
instantaneous growth rate (IGR %) ( $\pm$ s.e.), and mean conversion rate (CR %) ( $\pm$ s.e.) for all
monitored sites over 35 days of rearing and for 4 seasons
Tableau 11: Coastal water temperature (°C) and salinity (PSU) (mean and SD) for Agon
Coutainville, Bay of Seine and Torbay sites between April and July from 2008 till 201155
Tableau 12 : Cullefish Sepia officinalis L. eggs characteristics collected from different spawning
sites over several seasons
Tableau 13: Regression coefficients of linear model between hatchlings weight (g) and
environmental parameters (temperature and salinity)
Tableau 14: Summary of results on hatching rate, growth and survival of cuttlefish Sepia
officinalis L. in its early life stages in different spawning sites of the English Channel65
Tableau 15: Température moyenne de l'eau côtière (°C) entre le 15 juillet et la date de collecte
des pré-recrues en 2010 et en 2011. Les sites étudiés sont : BS : Baie de Seine et AC : Agon
Coutainville

# **CHAPITRE 2**

Tableau 16 : Localisation des activités de la trypsine, chymotrypsine, protéases totales acides etphosphatases acides dans les différents organes du système digestif de la seiche90

#### **CHAPITRE 3**

Tableau 19 : PO-like, APO-like and proPO-induced activities (mean $\pm$ SE, IU.mg prot <sup>-1</sup> , n=10) in	
organs of Sepia officinalis which showed significantly differences (i.e. DGA: digestive gland	
appendages, OL: optic lobes, WB: white body, SH: systemic heart, BH: branchial hearts,	
BHA: branchial heart appendages, Gills)17	3
Tableau 20: Etude des significativités sur l'évolution des activités des lysozymes (équivalent de	
blanc d'œuf de poule/mg de protéine) chez les juvéniles de seiche en fonction de l'âge et	

du site......185

#### **CHAPITRE 4**

Tableau 22 : Dosage des protéines totales (% du poids sec) des juvéniles de seiche Sepia
officinalis entre 7 et 35 jours post-éclosion de quatre sites de ponte différents et sur deux
années différentes (2010 et 2011)213
Tableau 23: Dosage des lipides totaux (% du poids sec) des juvéniles de seiche Sepia officinalis
entre 7 et 35 jours post-éclosion de quatre sites de ponte différents et sur deux années
différentes (2010 et 2011)214
Tableau 24: Dosage des glucides totaux (% du poids sec) des juvéniles de seiche Sepia officinalis
entre 7 et 35 jours post-éclosion de quatre sites de ponte différents et sur deux années
différentes (2010 et 2011)214
Tableau 25: Comparaison des pentes d'évolution des protéines, lipides et glucides chez les
juvéniles de seiche Sepia officinalis au premier mois post-éclosion entre les sites étudiés .216
Tableau 26 : Composition en acides gras (%) des œufs (vitellus et embryon en formation) de
seiche prélevés entre 2009 et 2011 sur différents sites de ponte anglo-normands219
Tableau 27: Composition en acides gras (%) des juvéniles de seiche à l'éclosion issus d'œufs
prélevés en 2010 et 2011 sur différents sites de ponte anglo-normands
Tableau 28 : Composition en acides gras (%) des manteaux de pré-recrues de seiche prélevées en
2010 et 2011 dans différents sites de ponte anglo-normands
Tableau 29 : Composition en acides gras (%) des proies prélevées en 2010 sur deux sites de ponte
français

Tableau 30 : Tableau récapitulatif des réserves vitellines (vitellus interne) et du contenuprotéique (% poids sec) des juvéniles de seiche Sepia officinalis à l'éclosion.231

# **INTRODUCTION GENERALE**

# **INTRODUCTION GENERALE**

# I. CONTEXTE SCIENTIFIQUE

La production mondiale des pêches représente en 2011 près de 154 millions de tonnes dont 90 millions de tonnes pour les captures des pêches et 64 millions de tonnes de production aquacole (FAO, 2012). En 2010, la part des céphalopodes (encornets, seiches et poulpes) dans le commerce mondial du poisson est de 4%. Cette production, variable entre les années, est essentiellement destinée aux pays asiatiques et méditerranéens qui sont les premiers consommateurs dans le monde (FAO, 2012). L'abondance et la distribution des stocks commerciaux des céphalopodes dans le monde présentent de larges fluctuations annuelles, généralement attribuées au cycle de vie court de ces espèces et à l'influence des variations des conditions environnementales sur le succès de la ponte et du recrutement (pour revue : Pierce *et al.*, 2008 ; Guerra *et al.*, 2010). Ces variations affectent les paramètres biologiques des animaux tels que le taux de mortalité (Hernandez-Miranda et Ojeda, 2006), la durée et le cycle de vie (Boucaud-Camou *et al.*, 1991), la fécondité (Kjesbu *et al.*, 1998), la maturité et la croissance (Witbaard, 1996 ; Norbis *et al.*, 2009).

En Manche, les principales espèces de céphalopodes exploitées sont les Loliginidae (i.e. *Loligo vulgaris* et *Loligo forbesii*) et la seiche *Sepia officinalis* Linnaeus 1758. Depuis les années 90, plusieurs études menées ont montré l'influence de différentes variables (*e.g.* température de surface de l'eau, pression atmosphérique, bathymétrie, saisons) sur l'abondance et le recrutement de ces céphalopodes (Robin et Denis, 1999 ; Denis *et al.*, 2002 ; Challier *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2003 ; Royer *et al.*, 2006). De plus, des études ont montré que les stades de pré-recrues pouvaient également influencer la variabilité spatio-temporelle d'abondance (Challier *et al.*, 2005 ; Challier *et al.*, 2006).

Le projet INTERREG IV-A CRESH (*Cephalopod Recruitment from English Channel Spawning Habitats*), lancé en 2009 et financé par l'Union Européenne, a eu pour but de développer les connaissances sur la biologie et le recrutement des pré-recrues de céphalopodes, et plus particulièrement les pré-recrues de seiche, dans les sites de ponte côtiers. Ce projet avait plusieurs objectifs parmi lesquels :

3

- Améliorer la connaissance des habitats favorables à la reproduction des seiches.
- Estimer la contribution de différentes aires de ponte sur le recrutement du stock global.
- Etudier l'effet des facteurs environnementaux sur la croissance et la survie des premiers stades.
- Combiner statistiques de pêche et indices indépendants pour mettre à jour et affiner les estimations de stock et celles du recrutement.
- Proposer de nouvelles recommandations aux professionnels de la pêche et à leurs partenaires (*e.g.* industriels) pour une meilleure exploitation de ces ressources en Manche.

# II. DESCRIPTION DE L'ESPECE ETUDIEE: SEPIA OFFICINALIS (LINNE, 1758)

# A. Généralités et classification

Les Mollusques Céphalopodes sont présents dans tous les océans et les mers du monde, de la surface jusqu'aux profondeurs de plus de 7000 mètres, de la province néritique du littoral au domaine pélagique hauturier (Mangold and Boletzky, 1989). La classe des Céphalopodes comprend aujourd'hui plus de 700 espèces ayant colonisé la plupart des biotopes marins, ceci témoigne du succès évolutif de ce groupe. Ce dernier est subdivisé en deux sous-classes : les *Nautiloidea*, qui possèdent une coquille externe et deux paires de branchies et les *Coleoidea*, qui diffèrent de par une coquille interne et une seule paire de branchies (Jereb & Roper, 2006). Les deux principaux groupes de *Coleoidea* sont, d'une part, les octopodes (e.g. *Octopus vulgaris*) qui possèdent huit bras et d'autre part, les décapodes (e.g. *Loligo forbesii*) qui possèdent huit bras et deux longs tentacules dits « préhenseurs ». Au sein des *Coleoidea* décapodes, nous retrouvons la seiche commune *Sepia officinalis* L. (**Tableau 1**).

	La seiche commur	ne, Sepia officinalis L.
Embranchement:	Mollusca	
Classe:	Cephalopoda	
Sous-classe:	Coleoidea	MARY SECTOR SAL
Ordre:	Sepiida	
Famille:	Sepiidae	Real Real
Genre:	Sepia	
Espèce:	officinalis	© Mer et littoraf

Tableau 1 : Position systématique de *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758. Illustration : www.mer-littoral.org. Chez les céphalopodes, le corps est constitué de deux régions principales : le céphalopodium et le complexe palléoviscéral. Chez la seiche, le céphalopodium se compose de la tête, des bras et de l'entonnoir, alors que le complexe palléoviscéral comprend la masse des viscères, le coelome, le manteau, la coquille, les nageoires, et les organes de la cavité palléale (**Figure 1**). Les branchies sont positionnées latéralement et symétriquement dans la cavité cœlomique du manteau.



# Figure 1: Vue latérale interne d'une seiche *Sepia officinalis*: anatomie générale (Boyle and Rodhouse, 2005)

Au cours de l'évolution, la coquille des *Coleoidea* s'est réduite, ce qui a permis le développement d'un appareil locomoteur unique dans le règne animal, constitué du manteau et de l'entonnoir, propulsant l'animal par réaction. Ils ont pu ainsi conquérir de vastes biotopes et capturer des proies mobiles.

# B. Aire de distribution dans le monde

Les espèces de sépioïdés sont toutes nectobenthiques à quelques exceptions près (e.g. *Spirula* ou *Heteroteuthis*). Leur distribution dans le monde est la suivante :

- 26% des espèces sont atlantiques,
- 61% des espèces se trouvent dans l'Indopacifique dont 15% sont limitées aux eaux australiennes,
- 13% des espèces sont endémiques d'Afrique du Sud,
- et les espèces circum-tropicales comptent pour moins d'1%.

Dans la famille des *Sepiidae*, dont plus de 100 espèces appartiennent au genre *Sepia*, habitant le plateau et le talus continental et descendant rarement en dessous de 500 m, la plupart se trouvent dans les eaux côtières (Mangold and Boletzky, 1989). En Atlantique, il existe 5 espèces du genre *Sepia*, dont *Sepia officinalis*. La répartition géographique de cette dernière est étendue dans

l'Est de l'Atlantique, dans la mer Baltique, au Nord de l'Europe, à la limite de la Mauritanie et du Sénégal, au Nord de l'Afrique, ainsi que tout le bassin méditerranéen et la zone des Açores (Boletzky, 1983 ; Dunn, 1999 ; Guerra, 2006) (**Figure 2**). Cette espèce est retrouvée principalement sur des fonds sableux et vaseux de la zone côtière (2-3 m de profondeur) et jusqu'à 200 m de profondeur, avec une forte abondance dans les premiers 100 m (Guerra, 2006).



# Figure 2: Répartition géographique de l'espèce *Sepia officinalis* dans le monde (Site de la FAO, section Aquatic Species Map Viewer).

Si certaines espèces de céphalopodes mènent une vie plus ou moins « sédentaire », habitant toute l'année un même biotope, d'autres entreprennent des migrations, soit saisonnières, soit diurnes ou encore, mais plus rarement, les deux. *Sepia officinalis* est une espèce migratrice sur toute son aire de répartition. En Atlantique, il s'agit à la fois de déplacements horizontaux et verticaux de faible envergure, comme chez les loliginidés, alors qu'en Méditerranée, la migration est essentiellement verticale.

# C. Cycle de vie et reproduction

# 1. Cycle de vie

La seiche a un cycle de vie d'un an dans sa zone de répartition sud et de deux ans dans les zones du nord. Au cours de son cycle de vie, *Sepia officinalis* effectuera des migrations entre les eaux profondes du large pour hiverner et les eaux côtières pour s'accoupler et pondre. Espèce dite sémelpare, les géniteurs meurent après la période de reproduction et très peu d'individus survivent plus de deux ans. En Manche, les populations de seiches ont un cycle de vie de deux ans durant lequel elles effectuent d'importantes migrations qui les éloignent des côtes en hiver (**Figure 3**). Ces déplacements, qui débutent en automne vers les eaux profondes à l'ouest de la Manche, sont déclenchés par le refroidissement des eaux côtières ainsi que par le raccourcissement des journées et la diminution de l'intensité lumineuse (Boletzky, 1983 ; Boucaud-Camou *et al.*, 1991). La profondeur de la fosse centrale constitue une zone d'hivernage, qui semble commune à toutes les seiches de Manche. A l'inverse, les migrations printanières débutent avec le réchauffement des eaux côtières et le retour des géniteurs vers la côte pour la reproduction. Les seiches resteront sur ces côtes d'avril à octobre.



Figure 3 : Cycles de migrations et zones de pontes de la seiche *Sepia officinalis* en Manche. (Boucaud-Camou et Boismery, 1991 ; Dunn, 1999 ; Challier, 2005)

Différentes aires de ponte sont décrites en Manche et sont réparties entre les zones côtières françaises et anglaises (**Figure 3**). En France, les principaux sites de ponte sont localisés dans l'ouest Cotentin, en Baie de Seine et autour de la Baie de Somme. Au Royaume Uni, les principaux sites se trouvent en Baie de Lyme, à l'Ouest ; sur les côtes du Sussex et du Kent, dans l'Est (Boucaud et Boismery, 1991 ; Dunn, 1999 ; Challier, 2005).

#### 2. Maturation sexuelle, reproduction et ponte

La reproduction et les pontes diffèrent selon la zone de distribution de la seiche. Dans sa répartition sud, la maturation sexuelle se fait plus rapidement que dans la répartition nord puisque la reproduction et les dépôts d'œufs sont observés au bout d'un an. De plus, la période de ponte est plus étendue dans les régions du sud avec des dépôts d'œufs qui sont relevés toute l'année mais avec une plus forte concentration entre février et la fin de l'été (Guerra et Castro, 1988). En Manche, les pontes se produisent entre avril et septembre mais les plus nombreuses sont surtout d'avril à juin (Boucaud et Boismery, 1991). Le cycle de vie de deux ans débute après la ponte. Les œufs incubent en moyenne 2 à 3 mois avant d'éclore et les pics d'éclosions sont observés en juillet-août (Challier, 2005). Après l'éclosion, les juvéniles vont rester sur la côte jusqu'à l'automne avant d'effectuer leur première migration vers le large. Leur croissance, débutant dans les zones côtières, se poursuit pendant l'hiver dans la zone centrale et au printemps, les mâles entament leur maturation sexuelle avant celle des femelles (Tableau 2). A la fin de leur première année de vie, très peu d'individus sont sexuellement matures (Dunn, 1999). Après leur séjour à la côte, les individus repartent vers le large pour leur deuxième hiver où ils vont continuer leur maturation sexuelle. Au printemps de leur deuxième année, les seiches sont donc matures, elles pourront s'accoupler et pondre.

Ages (mois)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
Saison	Printemps		Eté		Automne Hiver Printemps							nps		Eté Automne Hiver						r	Printemps					
Mâle	Œufs			Croissance des juvéniles										Maturation sexuelle									Reproduction des adultes			
Femelle	Œufs			Croissance des juvéniles										Maturation sexuelle								lle	Reproduction des adultes			
Zones		Côt	ières Centre Manche									Côtières Centre Manche						è	Côtières							

Tableau 2 : Croissance et maturation sexuelle des seiches Sepia officinalis en Manche (Dunn, 1999).

Les premiers accouplements se produisent au large dans la zone d'hivernage. Le Goff (1991) observe le début des accouplements, dans le secteur du Golf du Morbihan, dès le mois de janvier et par 60 m de fond. A cette date, 8% des femelles possèdent des spermatophores fixés dans les replis de la bourse copulatrice, puis leur proportion augmente pour atteindre 44% à leurs arrivées dans les zones de ponte côtières. Les accouplements se poursuivent après l'arrivée des géniteurs dans les habitats côtiers où les femelles déposent leurs œufs. Celles-ci ne vont rarement à plus de 30 à 40 mètres de profondeur. Les œufs sont attachés à différents substrats tels que les pieds d'algues, les animaux sessiles (les vers tubicoles) ou encore des structures mortes (des branches noyées, des câbles ou des casiers) (**Figure 4**) (Boletzky, 1983).



Figure 4 : Photos de différents supports de fixation des œufs de seiche *Sepia officinalis*. (Photos personnelles prises entre 2008 et 2011 dans les sites français).

La période de ponte d'une femelle dure environ deux mois (Bouchaud, 1991). Le dépôt des œufs ne se déroule pas de façon continue mais apparaît à intervalles de temps plus ou moins prolongés variant de 1 à 6 jours. Entre temps, des périodes d'inactivité reproductrice de 1 à 25 jours se succèdent, au cours desquelles les animaux se nourrissent mais ne déposent pas leurs œufs. Ces phases correspondent à des étapes de vitellogenèse plus ou moins prolongées. Par ailleurs, la quantité de vitellus dans les œufs évolue au cours de ces deux mois. Plus la période de ponte avance, plus la quantité de vitellus dans l'œuf est réduite. Cette perte de volume de l'œuf correspond à un état d'épuisement physiologique des femelles. Leur métabolisme ralenti ne leur permettrait plus de fournir, par l'intermédiaire des cellules folliculaires, la même quantité de vitellus qu'au début de la période de ponte (Bouchaud, 1991). De ce fait, la qualité des œufs pondus du printemps jusqu'en début d'été est meilleure que celle retrouvée dans les pontes tardives.

#### D. Les stades de pré-recrues

Les stades de pré-recrues désignent l'ensemble des stades précédents l'entrée de la nouvelle génération dite « recrues » dans le stock exploité. Chez la seiche, le recrutement commence à la fin de l'été en zone côtière avec les chalutiers côtiers et se poursuit jusqu'à l'arrivée de cette espèce dans l'Ouest de la Manche au niveau de la zone d'hivernage. Le recrutement de la nouvelle génération commence donc au début de l'automne après les stades de développement embryonnaire et de croissance des juvéniles sur la côte.

#### 1. Le développement embryonnaire

Le développement de *Sepia officinalis* est un développement direct qui ne comporte pas de stade larvaire. A sa sortie de l'œuf, le juvénile est quasiment identique à l'adulte et commence à se nourrir quelques jours après l'éclosion (Perrin, 2004). Lemaire (1970) a étudié le développement embryonnaire de *Sepia officinalis* L. pour en déterminer les différents stades. Il divise alors le développement embryonnaire de la seiche en trois grandes périodes : la segmentation, la gastrulation et l'organogenèse. Ces trois périodes sont sous-divisées en 30 stades. Pour la segmentation, il détermine 9 stades de l'œuf fécondé (stade 1) au stade blastula (stade 9). La gastrulation débute au stade 10 et se traduit par l'apparition de l'anneau entomésodermique à la périphérie du blastoderme et se termine au stade 17 où les ébauches des organes commencent à s'accentuer (**Figure 5**). La dernière période, l'organogenèse (stade 18 – stade 30), voit la mise en

place des organes et le développement du juvénile. Celui-ci sera autonome après l'éclosion et ressemblera à une seiche adulte en miniature. Les derniers stades (25 à 30) forment une période de croissance et de maturation dans le développement où la longueur dorsale du manteau (LDM) de l'embryon augmente jusqu' à 7 ± 1mm. Au stade 30, l'embryon est complètement développé et atteint le stade d'éclosion.



Figure 5 : Schéma récapitulatif des principaux stades de développement embryonnaire chez la seiche, *Sepia officinalis* L. (Lemaire, 1970).
Pendant la phase de développement, l'embryon utilise le vitellus comme source d'énergie et de composants structuraux. La quantité de vitellus et sa qualité sont donc d'une importance majeure pour le succès du développement embryonnaire et la survie post-embryonnaire des juvéniles (Sykes *et al.*, 2008).

#### 2. Croissance des juvéniles sur la côte jusqu'au début du recrutement

La croissance des juvéniles de seiche dans les eaux côtières peu profondes est rapide. Ceci est dû aux conditions estivales favorables et particulièrement aux augmentations de températures de l'eau (Boletzky, 1983). Ces zones côtières sont aussi des nourriceries pour beaucoup d'autres espèces d'où leur richesse en proies pour la croissance des petites seiches (Cartron, 2012). Cette croissance côtière est une phase importante dans l'étude du stock recruté. En effet, les chalutiers ayant une taille minimale de capture des seiches, le recrutement à la pêche est donc largement tributaire de la taille des individus. Au cours de leur cycle de vie, le taux de croissance de ces animaux varie en fonction de leur localisation. La croissance est susceptible d'être similaire pour l'ensemble des animaux, quant ils sont regroupés dans le stock central pendant la période hivernale. En été, dans les zones côtières, le taux de croissance des juvéniles diffère significativement d'un site à l'autre (Challier *et al.*, 2005). Les différences des taux de croissance rapide entreront plus tôt dans le stock recruté.

#### III. EXPLOITATION DES SEICHES ET AUTRES CEPHALOPODES EN MANCHE

#### A. Pêcherie des céphalopodes

La pêche en Manche est caractérisée par la très grande diversité des espèces exploitées (au nombre de 80 environ), la multitude des activités pratiquées et le très grand nombre de navires exploitants. Cette diversité est liée à la structure géographique et hydrodynamique de cette zone maritime ouverte sur l'extérieur (Royer, 2002). Les pêcheries sont essentiellement artisanales avec une grande importance de la pêcherie côtière puisque la plupart des navires (73%) travaillent dans les zones territoriales des 12 milles (Leblond *et al.*, 2009). Les poissons sont une ressource importante mais les invertébrés (crustacés, mollusques) occupent également une grande place dans l'exploitation des ressources marines.

La France et le Royaume Uni sont les principaux pays exploitants les ressources maritimes en Manche. La côte anglaise présente cinq districts (Cornwall, Devon, Dorset, Hampshire et Sussex) et la côte française est divisée en treize quartiers maritimes (Douarnenez-Camaret, Brest, Morlaix, Paimpol, Saint-Brieuc, Saint-Malo, Cherbourg, Caen, Le Havre, Fécamp, Dieppe, Boulogne et Dunkerque). A ces districts et quartiers sont associés des ports avec criées et points de débarquements. La majorité des débarquements réalisés dans ces points proviennent de la Manche, surtout pour les quartiers centraux, étant donné que les navires travaillent principalement à proximité de leur port d'attache (Denis et Robin, 2001). Ces ports sont d'une grande importance puisqu'ils produisent en moyenne 40% de la production nationale française depuis des années (Royer, 2002; www.franceagrimer.fr) et 11% de la production nationale anglaise (Site FAO section « Fisheries and Aquaculture » : www.fao.org/fishery/countrysector).

Depuis les années 1960, une progression nette de la production mondiale de céphalopodes a été constatée parallèlement au déclin des stocks de poissons démersaux. Cette augmentation est liée à deux phénomènes : un intérêt accru pour cette ressource et un fort accroissement de son abondance souvent expliqué par la diminution de la plupart des espèces de poissons exploitées (Le Bihan, 2006). En Manche, l'intérêt pour les céphalopodes et l'intensification de leur exploitation sont apparus dans les années 1980. Ce phénomène fut surtout spectaculaire pour la seiche dont la production s'est élevée très rapidement de façon exponentielle. En effet, il a été constaté au début de cette période une très forte augmentation de l'abondance des seiches. A partir de 1985, en réponse à cette abondance croissante, au déclin des productions de poissons et à l'apparition d'une forte demande extérieure, la pêche de la seiche est encouragée par une valorisation de ce produit. Pour les calmars, le phénomène fut moins marqué mais l'origine de l'exploitation est semblable (Royer, 2002).

L'origine de l'exploitation des céphalopodes en Manche est donc la résultante de deux phénomènes : la baisse de production des poissons démersaux dans cette zone et l'accroissement significatif de l'abondance des céphalopodes exploitables et de leur marché vers l'extérieur.

#### B. Exploitation de la seiche en Manche

#### 1. Principaux engins de pêche et saisonnalité

L'exploitation de la seiche, aussi bien britannique que française, présente un schéma saisonnier très marqué (**Figure 6**), lié aux phénomènes de migrations de l'espèce et à la saisonnalité de l'abondance (Denis et Robin, 2001). A la fin de l'été, les juvéniles (mesurant 6-8 centimètres) et les sub-adultes (âgés d'un an et plus) sont capturés dans les zones côtières majoritairement par les chalutiers de fond. En automne, la seiche est exploitée intensément par les chalutiers de fond et les chalutiers à perche pendant leur migration vers les zones hauturières d'hivernage. En hiver, les captures sont peu nombreuses et exclusivement réalisées par les chalutiers de fond et à perche hauturiers. Enfin, au printemps, cette espèce est de nouveau pêchée par les chalutiers de fond près des côtes, les adultes en particulier sont ciblés par les caseyeurs.



Figure 6: Saisonnalité des apports bas-normands de seiches *Sepia officinalis* en pourcentage annuel (source : www.ifremer.fr/envlit/region/basse-normandie).

#### 2. Pays exploitants et proportionnalités

L'espace Manche rentre dans le cadre des divisions règlementaires du Conseil International pour l'Exploration de la Mer (CIEM) de la région Nord-est Atlantique. L'exploitation de la seiche dans l'ensemble de ces divisions représente en moyenne 20 500 tonnes par an dont plus de 11 000 tonnes sont pêchés par les bateaux français et 3 500 tonnes par les bateaux du Royaume Uni (Figure 7-A). Dans les divisions VIId et VIIe du Canal de la Manche, les principaux pays exploitants la seiche sont la France, la Grande Bretagne, la Belgique, l'Ecosse et les Pays Bas (Figure 7-B) ; la France et la Grande Bretagne étant les deux principaux pays exploitants. La production française de seiches en Manche est de l'ordre de 8 500 tonnes (soit prêt de 77% de la production française sur l'ensemble des divisions CIEM) et celle de la Grande Bretagne de l'ordre de 3 200 tonnes (soit prêt de 93% de sa production dans les divisions CIEM). L'exploitation de la seiche dans l'espace Manche est donc primordiale pour ces deux pays. Cette exploitation peut représenter jusqu'à 35% du chiffre d'affaire des chalutiers côtiers au printemps (Le Bihan, 2006).

#### C. Variabilité interannuelle dans le stock

L'importante production de seiches en Manche par les flottilles françaises et anglaises est soumise néanmoins à une forte variation interannuelle (**Figure 7-B**). Selon les données du CIEM, entre 2000 et 2011 (années 2009 et 2010 exclues du fait de données manquantes des débarquements français), l'exploitation de la seiche varie entre 8 000 et 18 000 tonnes pêchés par an. Ces variations sont aussi observées sur l'ensemble des divisions CIEM où la production varie entre 15 000 et 30 000 tonnes (**Figure 7-A**).



Figure 7 : Total des débarquements annuels de seiches *Sepia officinalis* (tonnes) par pays exploitants. A-Débarquements dans toutes les divisions du CIEM ; B- Débarquements en Manche : divisions VIId et VIIe du CIEM (D'après le rapport du CIEM « ICES WGCEPH Report 2012 »)

#### *IV.* OBJECTIFS DE LA THESE

La compréhension des fluctuations d'abondance des populations marines implique la recherche des mécanismes affectant le renouvellement des classes exploitées par l'entrée dans la pêcherie des juvéniles appelés recrues. Le recrutement au sens halieutique désigne à la fois le phénomène de l'arrivée des juvéniles dans le stock et l'effectif des recrues (Laurec et Leguen, 1981). Comprendre le déterminisme des fluctuations du recrutement est donc une étape clé pour l'étude de tels stocks et leur gestion à long terme. Espèces à croissance rapide et à durée de vie courte, les céphalopodes sont hautement sensibles aux conditions environnementales et aux changements à l'échelle spatio-temporelle. Ils répondent aux variations environnementales en migrant vers des zones aux conditions plus favorables d'une part pour s'alimenter et se reproduire ; et d'autre part, pour la survie et la croissance qui varient en fonction des conditions rencontrées (Pierce *et al.*, 2008). Les variations observées, dans les pêcheries de seiches en Manche, ne sont donc pas un cas isolé. Au vu de leurs particularités biologiques, l'état du stock et son exploitation reposent directement sur le succès du recrutement.

Les effets de l'environnement sur les jeunes stades de développement pourraient affecter la distribution et l'abondance du stock exploité (Pierce et al., 2008). La température de l'eau, la salinité, l'oxygénation, la photopériode font parties d'une multitude de facteurs environnementaux pouvant influencer des paramètres biologiques tels que la durée de la croissance embryonnaire et post-embryonnaire mais aussi le taux d'éclosion et de survie des juvéniles (Lemaire, 1970, Bouchaud, 1991; Blanc, 1998; Koueta et Boucaud-Camou, 2003; Boletzky, 2006). De plus, des facteurs biotiques tels que la biodisponibilité des proies et leur qualité vont jouer sur la croissance et la survie des juvéniles (Domingues et al., 2001 ; Correia et al., 2008). Jusqu'à présent, l'étude de la relation entre les variations du recrutement et les premiers stades de développement des seiches dans les frayères côtières a été peu abordée. En Manche, l'âge au recrutement est de 3 à 4 mois post-éclosion (Challier et al., 2005) et un pic d'abondance de ces nouvelles recrues est relevé en automne lors de la migration des seiches vers le large (Royer et al., 2006). Une variabilité spatio-temporelle a été observée dans la croissance des pré-recrues due aux facteurs environnementaux locaux (Challier et al., 2005). Cependant, très peu de données existent sur la variabilité spatio-temporelle des taux d'éclosion et de survie des nouveau-nés. De même, la relation entre les conditions d'incubation dans une zone géographique donnée et les caractéristiques des juvéniles ainsi que leur performance à l'éclosion sont rares.

Dans le cadre du projet CRESH, notre travail s'est concentré sur les premiers stades de développement de la seiche (*i.e.* œufs et juvéniles) dans les zones côtières. Dans un premier temps, nos recherches se sont focalisées sur les variabilités spatiale et interannuelle des conditions environnementales au cours de la période d'incubation des œufs et son influence sur les caractéristiques biologiques des juvéniles (*e.g.* taux d'éclosion, taux de croissance). Puis, dans un second temps, nous avons étudié les performances physiologiques (*e.g.* maturation du système digestif) des juvéniles issus de ces œufs.

De la ponte au mois d'avril jusqu'à la migration automnale des nouvelles recrues, l'incubation des œufs ainsi que la croissance des juvéniles vont être sous l'influence directe des conditions rencontrées dans les zones côtières anglaises et françaises. C'est pourquoi il est essentiel de bien connaître ces habitats ainsi que les caractéristiques des œufs et des juvéniles issus de ces sites afin de mieux comprendre leur contribution respective au stock de seiches recrutées en Manche.

Les résultats présentés dans cette thèse ont permis non seulement de mieux comprendre le rôle de l'environnement au cours des premiers stades de vie des seiches mais aussi d'établir des fiches descriptives des caractéristiques des œufs et des juvéniles en fonction de leur site de provenance. Ce travail a également permis de développer de nouveaux outils permettant une meilleure approche des performances physiologiques des juvéniles. Ces données sont prises en compte dans l'étude de la contribution de ces sites de ponte au stock de seiches recrutées et permettent de comprendre le rôle joué par ces différentes frayères. Ce manuscrit s'articule autour de 4 axes différents qui font l'objet de 4 chapitres.

- Dans le premier chapitre, nous avons étudié les taux d'éclosion des œufs, les taux de survie des juvéniles et leur performance de croissance en fonction des sites de provenance. Deux approches ont été développées : une expérimentale où la croissance des juvéniles est étudiée en milieu contrôlé, et l'autre en milieu naturel avec la collecte de pré-recrues.
- Dans le deuxième chapitre, nous nous sommes intéressés à la maturation du système digestif des juvéniles en fonction de leur site de provenance. Ce travail explore la mise en place des enzymes digestives au cours du premier mois post-éclosion, ainsi que le développement de la glande digestive par la résorption du vitellus interne, et la multiplication des cellules digestives qui forme la glande digestive mature.

- Dans le troisième chapitre, nous avons adapté les techniques de dosage de trois enzymes immunitaires (les antiprotéases, les lysozymes-like et le complexe *phénoloxydase* – prophénoloxydase) chez les juvéniles de seiche. Ensuite, nous avons utilisé ces techniques pour étudier le système immunitaire des juvéniles en fonction des sites de ponte et des années de suivi.
- La dernière partie a porté sur la qualité des œufs et des juvéniles en fonction des sites de ponte. Ceci nous a permis d'intégrer : le rôle du transfert maternel sur la qualité du vitellus, le rôle des facteurs environnementaux sur la qualité des juvéniles à l'éclosion, ainsi que la relation qualité proies/qualité pré-recrues du milieu naturel.

# CHAPITRE 1 :

# Caractéristiques spatiotemporelles des œufs et des pré-recrues de seiche

#### I. INTRODUCTION

#### A. Adaptation des céphalopodes aux contraintes environnementales

#### 1. Ecophysiologie et adaptation

L'écophysiologie est la science qui étudie l'adaptation physiologique des organismes à leur environnement. Les organismes se caractérisent par leur environnement d'autant qu'ils y sont adaptés. La forme, la taille, le mode alimentaire, la défense contre les prédateurs, les caractéristiques de reproduction et du développement reflètent tous le succès des anciennes étapes de « l'adaptation » (Boletzky, 1997). Les répartitions géographiques actuelles des céphalopodes ne peuvent être expliquées qu'à partir des rapports entre les organismes et un environnement donné (biogéographie écologique), rapports considérés ensuite à la lumière d'une biogéographie historique qui intègre la phylogénie des taxons concernés avec l'histoire géologique de leur aire de répartition (Boletzky, 1999). De la somme totale des traits observés chez une population, des traits acquis au cours de l'ontogenèse, résulte le phénotype de cette population ou de cette espèce sous des conditions environnementales données. Si ces conditions varient, des phénotypes différents peuvent être exprimés pour un même génotype. Néanmoins, les variations de phénotype restent limitées par ce génotype transmis par les générations précédentes. Ainsi, l'adaptation semble fonctionner avec un jeu limité de phénotypes possibles, dont chacun est la combinaison de l'expression génotypique et du contrôle épigénétique par des facteurs physicochimiques (Boletzky, 1997).

#### 2. Les contraintes du développement, l'hétérochronie et les stratégies adaptatives

Boletzky (1997) propose dans sa revue une discussion sur les tailles des juvéniles chez les céphalopodes. L'auteur se base sur des connaissances, des observations personnelles et sur des citations d'auteurs spécialisés dans la biologie du développement. Les tailles des juvéniles des mollusques céphalopodes vont de 1 mm à plus de 30 mm selon l'espèce. Le nombre de petits par femelle est de 10<sup>2</sup> à 10<sup>6</sup>. Pour donner une explication potentielle à ces variations acquises au cours de l'évolution, Boletzky (1997) revient sur des concepts fondamentaux. Le premier concept se rapporte aux contraintes de développement qui révèlent les limitations de l'évolution. Ces limitations, selon les différents auteurs, peuvent être aussi bien au niveau moléculaire, au niveau cellulaire qu'au niveau de l'organisme entier (**Tableau 3**).

	Auteurs	Années	Citations	Schématisations
	Antonovics et van Tienderen	1991	La sélection naturelle nécessite la présence de variations phénotypiques. L'évolution est possible si les variations ont une composante héritable.	
	Stearns	1992	Les traits observés sont un mixe d'adaptation et de contraintes.	Organisme Milieu 1 Milieu 2
	Oster et alberch	1982	Les gènes agissent via les protéines qui modulent les propriétés de la cellule. Les cellules étant la clé du développement, la substitution d'un simple gène ne modifie pas les interactions cellulaires. Ces interactions sont légèrement modifiées mais pas fondamentalement changées. Seule une petite proportion, dans l'espace phénotypique, est disponible pour les substitutions génétiques.	Cellulaire/moléculaire Transcription Traduction
es	Bonner	1982	La sélection est limitée, dans les changements qu'elle peut effectuer à un stade de développement, par les évènements qui ont eu lieu dans des stades antérieurs.	
traint	Gerhart et al.	1982	La matrice extracellulaire (MEC), dans les	CI MEE C2
Con	Edelman	1983	interactions cellulaires (C1 à C5), joue un rôle très	
	Ekblom	1995		
	Horn et al.	1982	Bien que des contraintes liées au développement semblent limiter le nombre de cheminements morphogénétiques possibles, un modèle de développement particulier peut fournir des occasions uniques pour les adaptations qui ne sont pas ouvertes à d'autres groupes avec une autre structure corporelle.	Milieu 1 Milieu 2 Milieu 2+n
	Alberch	1982	Les occasions dans l'évolution fournie par ces mêmes contraintes ouvrent des nouveaux royaumes adaptatifs. Le développement peut canaliser l'évolution du système le long de certains sentiers.	Milieu 1 Milieu 2 Milieu 3 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T
	Wagner	1988	Des contraintes liées au développement facilitent l'évolution de phénotypes fonctionnellement intégrés	Trop gros

## Tableau 3 : Recueil littéraire du concept des contraintes développementales décrites par différentsauteurs. (Tableau récapitulatif selon Boletzky, 1997).

Les céphalopodes sont marqués par des contraintes physiologiques sévères. Si certaines espèces peuvent survivre, par exemple, à des faibles niveaux de salinité, même les plus tolérantes ont des limites de capacité d'osmorégulation, ce qui les empêchent de coloniser des sites avec des salinités inférieures à 16 psu (pratical salinity unit) (Boletzky, 2003). Le deuxième concept concerne l'hétérochronie (**Tableau 4**). Ce terme désigne les variations dans les vitesses de

développement pouvant donner lieu à de nouveaux phénotypes avec une significativité adaptative et donc une évolution dans l'espèce.

Tableau	4:	Recueil	littéraire	du	concept	d'hétérochronie	décrit	par	différents	auteurs.	(Tableau
récapitul	atif	selon Bo	letzky, 199	97).							

	Auteurs	Années	Citations	Schématisations
	McNamara	1986	Des variations chez les embryons dérivés par hétérochronie peuvent donner lieu à de nouveaux phénotypes ayant une significativité adaptative et donc une évolution dans l'espèce.	4.0.0.00
ronie	Hall	1984	Ceci amène à la définition généralement adoptée de l'hétérochronie comme un changement dans les vitesses de développement entre les ancêtres et les descendants durant la	
Hétéroch	Gould	1977	Changement dans le temps relatif à l'apparition et du taux de développement de caractères déjà présent chez les ancêtres.	
	Haeckel		Les changements se sont faits tous dans la même direction: une accélération universelle du développement, poussant les formes adultes ancestrales aux stades des descendants juvéniles. "La juvénilisation" soit l'apparition de traits juvéniles ancestraux chez les descendants adultes	

La forme la plus simple d'hétérochronie apparaît lors du développement d'un organe chez deux embryons d'une même portée, qui sont rarement exactement identiques. De telles variations dans la vitesse de croissance des organes peuvent laisser ou non des traces aux stades plus avancés du développement. Ils reflètent la flexibilité des interactions, entre les cellules embryonnaires et les complexes cellulaires, qui sont essentiellement de nature épigénétique. Le troisième concept sur les stratégies d'adaptation (**Tableau 5**) présente l'adaptation des complexes à leur environnement.

Tableau	5:	Recueil	littéraire	du	concept	stratégie	adaptative	décrit	par	Steams	(1992).	(Tableau
récapitu	latif	selon Bo	letzky, 199	97).								

	Auteur	Année	Citations	Schématisation
			Le mot "stratégie" signifie simplement "l'adaptation d'un complexe". Il fait référence à l'évolution coordonnée de l'ensemble des traits de l'histoire.	
stratégie	Stearns	1992	La relation entre l'énergie stockée par les parents et les limites, sous les contraintes physiologiques, du nombre de petits qu'ils puissent produire. Il est évident que la taille des jeunes individus va être inversement proportionnelle au nombre de jeune produits pour une quantité donnée d'énergie investie.	ENERGIE ENERGIE COLORIZA
			Chez les poïkilothermes, terrestres et marins, la taille de la portée semble être inversement proportionnelle à la latitude.	

#### 3. Les interactions environnementales

Les céphalopodes sont très sensibles aux conditions environnementales et aux changements spatio-temporels. Ils répondent aux variations environnementales de manière « active » (par les migrations vers des sites avec des conditions plus favorables pour la reproduction et la ponte) et « passive » (migrations passives générées par les courants dominants). Les effets environnementaux exercés sur les premiers stades de développement peuvent affecter les caractéristiques de toute une vie (taux de croissance et de maturation) ainsi que la distribution et l'abondance (Pierce *et al.* 2008). Les processus, tant à grande échelle, tels que les processus atmosphériques et océaniques, qu'à échelle locale, tels que les variations environnementales, semblent jouer un rôle important dans les interactions environnement-espèce (Pierce *et al.* 2008). Les courants marins ainsi que les processus atmosphériques sont nombreux dans les zones mondiales de répartition des céphalopodes (les moussons indiennes, le Gulf-Stream, les courants internes en mer Méditerranée). Ces processus à grande échelle sont couplés à des processus à échelle locale tels que la température de l'eau, la salinité ou encore la disponibilité de l'alimentation qui définissent des variations dans des populations d'une même espèce, reflétant leur adaptation au milieu.

# 4. Formation de sous-populations d'une espèce donnée : cas de la seiche Sepia officinalis

La formation de sous-populations ou la structuration de la population d'une espèce donnée a souvent été expliqué par deux facteurs majeurs qui sont les barrières physiques de dispersion et/ou l'isolation par la distance (Pérez-Losada *et al.*, 2007). Les changements du niveau de la mer et du climat durant les glaciations Pléistocènes, causèrent des isolations physiques de certaines zones marines. De même les barrières hydrographiques actuelles, pour l'expansion des flux génétiques, ont souvent été proposées comme agents majeurs soulignant la structuration des populations d'espèces données (Pérez-Losada *et al.*, 2007). Ces structurations touchent l'ensemble des classes d'animaux marins y compris les céphalopodes tels que la seiche. *Sepia officinalis* a une large distribution allant de la mer Baltique au Nord, jusqu'à la limite de la Mauritanie-Sénégal au Sud et dans toute la mer méditerranée (Guerra, 2006). Une fragmentation génétique de cette espèce est observée à faible échelle (*e.g.* entre la population fuertation du Canal de La Manche et la population mauritanienne-ENCH/MAUR) (Pérez-Losada *et al.*, 2007).



Figure 8 : Figure représentant la distribution de *Sepia officinalis* dans le monde et différentes souspopulations en mer Méditerranée et en Atlantique Nord-Est. AEIO : Mers Egée et Ionienne, EMED : Est Méditerranée, ENCH : La Manche, MAUR : Mauritanie, VENI : Venise, WMED : Ouest Méditerranée. Les traits pointillés en noir représentent d'anciennes barrières physiques. (Sous populations d'après Pérez-Losada *et al.*, 2007, Image prise du site de la FAO, section Aquatic Species Map Viewer).

#### 5. La population de seiche en Manche

La population de seiche en Manche « ENCH » (**Figure 8**) appartient à une même sous-population génétique (Morritt et Shaw, 2012) qui varie peu des populations de l'Atlantique Nord (Pérez-Losada *et al.*, 2007). Les différences présentes dans ces populations nécessitent donc de se pencher sur les facteurs environnementaux pour comprendre leur impact sur les populations locales.

#### B. Bio-écologie du développement des jeunes stades de vie de Sepia officinalis

#### 1. Caractéristiques bioécologiques étudiées

Les facteurs écologiques se subdivisent en deux groupes : les facteurs hydrologiques (la température, la salinité, l'oxygénation de l'eau) et les facteurs édaphiques (la profondeur, la granulométrie, l'hydrodynamisme du milieu) (Blanc, 1998). Les facteurs environnementaux varient selon le lieu étudié et selon les espèces étudiées. Pour les espèces mobiles pélagiques, les

conditions océanographiques ont un impact significatif dans les interactions espècesenvironnement, alors que les espèces démersales et benthiques sont plus dépendantes des caractéristiques physiques de leur habitat (le substrat, la bathymétrie etc.). Cependant, pour certaines espèces migratrices, et selon le stade de leur cycle de vie, la combinaison de ces facteurs peut évoluer.

Les facteurs abiotiques, connus pour avoir des effets sur la croissance des céphalopodes, sont la température, la salinité, l'oxygène et la lumière ou photopériode (Forsythe et al., 2002). L'amplitude des écarts de salinité peut être assez variable d'un site à l'autre et d'une année à l'autre (Blanc, 1998). Le débit des rivières (volume d'eau déversé dans la mer), la pluviométrie et les courants marins jouent sur le degré de salinité. Des variations de température dans une même région géographique peuvent aussi être observées. Ces variations influencent les populations locales telles que les céphalopodes qui sont des organismes poïkilothermes. Ils réagissent instantanément à des hausses de température en augmentant leurs activités métaboliques ainsi que leurs performances, y compris les taux d'ingestion et de croissance (Domingues et al., 2001). La température est donc un facteur primordial dans la croissance des juvéniles mais joue aussi un rôle dans la durée d'incubation des œufs (Lemaire, 1970) comme la salinité qui peut influencer la durée d'incubation (Blanc, 1998). La turbidité et la lumière vont interagir étant donné que le degré de turbidité de l'eau va modifier la luminosité disponible pour les organismes marins. Cette luminosité contribue au développement, à la maturation et au cycle de vie de plusieurs espèces marines. Tous ces facteurs abiotiques vont agir sur la faune et la flore qui constituent les principaux facteurs biotiques définissant une niche écologique.

#### 2. Influence de différents facteurs abiotiques et anthropiques sur le développement embryonnaire et la croissance des juvéniles de seiche

#### Température

La durée d'incubation des œufs de seiche est très sensible aux variations de température de l'eau de mer dans laquelle les pontes sont maintenues (Lemaire, 1970, Boletzky., 1983). Le développement embryonnaire devient de plus en plus rapide avec l'augmentation des températures, avec pratiquement 150 jours d'incubation à 12°C contre 52 jours à 17°C. Le pourcentage d'éclosion ainsi que la durée de la phase d'éclosion diminuent avec l'augmentation de la température (Bouchaud, 1991; Blanc 1998) (**Tableau 6**). La longueur du manteau dorsal

(LDM) et le poids des nouveau-nés sont affectés par la vitesse de développement. A 20°C, la LDM est de 7,6 mm et le poids est de 0,19 g alors qu'à 16°C la LDM est de 8,2 mm et le poids de 0,24 g (**Tableau 6**) (Blanc, 1998). L'augmentation de la température d'incubation va aussi jouer sur la consommation du vitellus au cours du développement embryonnaire. A 15°C, les embryons consomment 78% de leur vitellus alors qu'à 24°C, seul 26% du vitellus est consommé (Bouchaud et Galois, 1990). Aux limites inférieures et supérieures de température, l'incidence des malformations augmente substantiellement (Boletzky, 2003). En effet, le pourcentage d'éclosion est optimale jusqu'à 20°C mais au-delà, le taux d'éclosion chute drastiquement. De même, aucune éclosion n'est observée à 10°C (Bouchaud, 1991). Finalement, la température d'incubation des œufs joue sur le développement embryonnaire et sur la maturation post-embryonnaire des juvéniles de seiches (Dickel *et al.*, 1997).

Différents auteurs ont travaillé sur l'effet de la température sur la croissance des seiches aux premiers stades post-éclosion (Forsythe *et al.,* 2002 ; Grigoriou *et al.,* 2004). La hausse des températures de l'eau s'accompagne d'une augmentation de la croissance des juvéniles avec une augmentation du taux d'ingestion, du taux de conversion et du taux de croissance instantané, due à l'augmentation de leur niveau métabolique (**Tableau 6**). Ces auteurs ont aussi montré une influence positive de l'augmentation de la température de l'eau sur la survie des jeunes seiches.

#### Salinité

Blanc (1998) a testé l'effet de différentes salinités sur le développement des œufs ainsi que sur les caractéristiques des nouveau-nés de seiche. Cet auteur a remarqué que plus les taux de salinité sont élevés, dans la gamme de 30 à 36 psu, plus la durée d'incubation des œufs était réduite, avec un pourcentage d'éclosion plus élevé (**Tableau 6**). Palmegiano et d'Apote (1983) ont aussi noté un effet inhibiteur de la salinité qui est inversement proportionnel au pourcentage d'éclosion ne se produisait à 23 psu, 4.5 % d'éclosion à 25 psu et 96.5 % d'éclosion à 33 psu. Blanc (1998) a noté que la salinité a aussi un effet sur la durée de la période d'éclosion qui est réduite aux fortes salinités. De plus, cet auteur a relevé que la taille et le poids des nouveau-nés sont inversement proportionnels au pourcentage de salinité. Blanc (1998), a aussi testé deux salinités (30 et 35 psu) sur le taux de survie des juvéniles et a observé une plus importante survie à la plus forte salinité.

Stade influencé influencé  Sens et échelle  Augmentation entre 12 et 25 °C  Augmentation entre 30 et 35 psu  Augmentation entre 8h L/ 16h O et 16h L/ 8h O    Paramètres biologiques  I = t = t = t = t = t = t = t = t = t =		Facteurs abiotiques étudiés	TEMPERATURE	SALINITE	PHOTOPERIODE
Paramètres biologiques    Durée d'incubation    Œufs  Durée d'incubation    Durée de la phase d'éclosion  L    Durée de la phase d'éclosion  L    Juvéniles à  Poids    Juvéniles à  Taux de croissance des juvéniles    Taux de croissance des juvéniles  L    Juvéniles à ux  Taux de croissance des juvéniles    Juvéniles  Taux de croissance des juvéniles	Stade influencé	Sens et échelle	Augmentation entre 12 et 25 °C	Augmentation entre 30 et 35 psu	Augmentation entre 8h L/ 16h O et 16h L/ 8h O
Burée d'incubation  Durée d'incubation    Eufs  Pourcentage d'éclosion    Juvéniles à    Juvéniles à    Poise    Taille    Juvéniles    Juvéniles    Taux de croissance des juvéniles    Juvéniles    Taux d'ingestion des juvéniles    Juvéniles    Taux de croissance des juvéniles    Juvéniles    Taux de croissance des juvéniles    Juvéniles    Taux de conversion des aliments    Mois de vie    Taux de survie des juvéniles		Paramètres biologiques			
Gufs  Pourcentage d'éclosion  Image    Durée de la phase d'éclosion  Image    Juvéniles à  Poids    Juvéniles à  Poids    Juvéniles à  Poids    Juvéniles à  Poids    Juvéniles à  Taux de croissance des juvéniles    Juvéniles aux  Poids    Juvéniles  Po		Durée d'incubation	7	7	J
Durée de la phase d'éclosion  L  L    Juvéniles à l'éclosion  Poids  L  L    Juvéniles à l'éclosion  Taille  L  L    Juvéniles  Taux de croissance des juvéniles  L  L    Juvéniles  Taux de croissance des juvéniles  L  L    Juvéniles  Taux d'ingestion des juvéniles  L  L    Juvéniles  Taux de conversion des aliments  Z  L    Taux de survie des juvéniles  Z  L  Z	Œufs	Pourcentage d'éclosion	7	K	I
Juvéniles à l'éclosion  Poids  Poids    l'éclosion  Taux de croissance des juvéniles  V    Juvéniles  Taux d'ingestion des juvéniles  V    Juvéniles  Y  -    Aux  Taux de survie des juvéniles  Y		Durée de la phase d'éclosion	7	7	I
l'éclosion  Taille  Taille    Juvéniles  Taux de croissance des juvéniles  7    Juvéniles  7  -    Juvéniles  7    Juvéniles  7    Juvéniles  7    Juvéniles  7    Juvéniles  7    Juvéniles  7    aux  7    premiers  7    Taux de conversion des aliments  7    Mois de vie  7    Taux de survie des juvéniles  7	Juvéniles à	Poids	7	7	I
Taux de croissance des juvéniles    7     7      Juvéniles    Taux d'ingestion des juvéniles    7     7      aux    Taux d'ingestion des juvéniles    7     7      premiers    Taux de conversion des aliments    7     7      Taux de survie des juvéniles    7     7	l'éclosion	Taille	7	7	I
Juvéniles  Taux d'ingestion des juvéniles  A    aux  Taux d'ingestion des juvéniles  A    premiers  Taux de conversion des aliments  A    Taux de survie des juvéniles  A		Taux de croissance des juvéniles	K	1	K
premiers mois de vie Taux de survie des juvéniles	Juvéniles aux	Taux d'ingestion des juvéniles	K	Ι	K
Taux de survie des juvéniles	premiers mois de vie	Taux de conversion des aliments	R	1	R
		Taux de survie des juvéniles	K	K	K

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des influences de la température, de la salinité et de la photopériode sur différents paramètres biologiques des premiers stades de vie de la seiche *Sepia officinalis*. Les flèches indiquent l'augmentation ou la diminution du paramètre biologique. Le trait indique une absence de donnée ou d'effet (Références : Lemaire, 1970 ; Bouchaud, 1991 ; Blanc, 1998 ; Forsythe *et al.*, 2002 ; Koueta *et al.*, 2003 ; Grigoriou et al, 2004 ; Basuyaux, 2010).

#### Photopériode

La photopériode ne semble pas avoir d'impact sur le développement embryonnaire ni sur les caractéristiques des juvéniles à l'éclosion (Boucaud, 1991). Cependant, Koueta *et al.* (2003) ont travaillé sur l'effet de la lumière sur la survie et la croissance des juvéniles. Ces auteurs ont montré que les juvéniles de seiche élevés à faible luminosité (8h par jour) présentent un taux de survie et de croissance plus bas, ainsi qu'un faible gain relatif de poids par rapport à ceux élevés avec 12 ou 16h de lumière par jour (**Tableau 6**). La photopériode joue donc un rôle important dans la survie et la croissance des juvéniles.

#### L'oxygénation de l'eau

L'oxygène est un facteur déterminant chez les céphalopodes, autant au niveau du développement embryonnaire qu'au niveau du métabolisme de croissance aux stades post-éclosion. Les céphalopodes présentent les plus forts taux de métabolisme aérobie des invertébrés marins (Boyle and Rodhouse, 2005) et ce facteur permet d'expliquer, en partie, la distribution géographique et bathymétrique des espèces. Les estimations comparatives du métabolisme des céphalopodes, vivant dans les profondeurs, montrent une baisse des taux métaboliques, résultant de la diminution de la disponibilité d'oxygène et de la baisse de la demande de comportement énergétique (Boyle and Rodhouse, 2005). La consommation d'oxygène varie selon les groupes. Elle est de l'ordre de 100 à 500 ml O<sub>2</sub>.Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> chez les calmars et de 10 à 100 ml O<sub>2</sub>.Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> chez les poulpes (O'Dor et Wells, 1987 ; Wells et Clarke, 1996). Chez la seiche, les valeurs minimales relevées sont de l'ordre de celles décrites pour les poulpes (Boyle and Rodhouse, 2005). Quant au développement embryonnaire, l'embryon se développe normalement quand la concentration en oxygène de l'eau est proche de la saturation (Boletzky, 2006). De plus, ce paramètre est considéré comme facteur clé conduisant à l'éclosion des œufs (Gutowska *et al.,* 2009) quand les concentrations du liquide périvitellin chutent dans la dernière phase de croissance embryonnaire.

#### Facteurs anthropiques : cas des métaux lourds

Les éléments traces, dits métaux lourds, sont pour la plupart d'entre eux nécessaires à la vie à faible dose, classés comme étant essentiels, puisqu'ils rentrent dans la structure de certaines molécules. Tel est le cas pour le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le cobalt (Co), le cuivre (Cu) et le sélénium (Se). Ils peuvent cependant se révéler très nocifs en quantités importantes. D'autres ne

sont pas essentiels mais toxiques comme le cadmium (Cd) et le mercure (Hg). La présence de ces éléments dans le milieu marin est due aux rejets de diverses activités industrielles (e.g. industrie nautique) et peuvent avoir une incidence directe sur les organismes marins, tels que sur les œufs de seiche, principalement dans les zones côtières. Chez Sepia officinalis, l'enveloppe de l'œuf protège l'embryon pendant le premier mois du développement mais cette protection se réduit puisque la perméabilité de l'enveloppe augmente. Une accumulation de Hg, Cs, Zn, Mn ou de Co à partir du 30<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire est observée chez la seiche. Ces métaux sont accumulés dans l'embryon jusqu'à l'éclosion (Lacoue-Labarthe, 2008a, 2009, 2010a). De plus, certains métaux peuvent aussi être transférés de la mère à l'œuf. L'Ag, le Se et le Zn sont transférés dans le vitellus des œufs puis se retrouvent progressivement dans l'embryon qui se développe (Lacoue-Labarthe et al., 2008b). Les effets de ces métaux peuvent être divers parfois même antagonistes en fonction des concentrations. Plusieurs d'entre eux semblent avoir des effets perturbateurs sur le métabolisme, notamment au niveau des activités enzymatiques digestives. Le Cd inhibe l'activité des cathepsines au cours du développement embryonnaire (Lacoue-Labarthe, 2010b), de même que le Zn (en grande quantité) et l'Ag au niveau des activités enzymatiques (i.e. trypsine et cathepsines) des cellules de la glande digestive de seiche adulte en condition *in vitro* (Le Bihan *et al.*, 2004).

#### 3. Influence des facteurs biotiques sur la croissance des juvéniles

Les facteurs biotiques représentent l'ensemble des interactions du vivant dans un écosystème. Il s'agit des ressources alimentaires et des relations trophiques mais aussi des phénomènes de compétition et de parasitisme. Parmi ces facteurs, le régime alimentaire et la compétition sont des paramètres importants, pouvant affecter la croissance des juvéniles de seiche. Pinczon du sel *et al.* (2000) ont étudié le contenu stomacal de la population de seiche, pendant son cycle de vie, au Nord de la Baie de Gascogne. Ces auteurs ont montré que le régime alimentaire des seiches se compose de poissons, de crustacés et de céphalopodes avec une présence d'algues. Les pourcentages de ces différentes espèces dans l'alimentation varient en fonction de l'âge des seiches, de leur localisation et suivant la période de l'année. Les seiches ayant des cycles annuels de migrations, ont une disponibilité des espèces « proies » qui varient selon leur localisation. Cette approche permet de comprendre la nutrition de l'espèce dans son environnement naturel. D'autres auteurs ont travaillé sur les effets spécifiques de certaines proies sur le métabolisme de

croissance et de survie des seiches. Domingues et al. (2001) ont étudié les effets de deux espèces de crustacés : Artemia sp. et Paramysis nouvelli sur la croissance et la survie des juvéniles de seiches (Tableau 7). Ces auteurs ont utilisé ces proies comme base alimentaire pendant les 20 premiers jours post-éclosion puis ont changé afin d'obtenir une base alimentaire unique constituée de crevettes (Paleomonetes varians), pour les deux lots jusqu'à la fin de l'expérience. Après 20 jours, la moyenne des poids des deux lots de juvéniles présentait une différence très significative. Les seiches nourries avec des Artemia sp. avaient un poids moyen de 0,48 ± 0,15 g alors que celles nourries avec Paramysis nouvelli avaient un poids significativement supérieur  $(1,47 \pm 0,12 \text{ g})$ . Cette différence a subsisté jusqu'à la fin de l'expérience, à 120 jours d'élevage, même en ayant changé pour un aliment unique. Ces auteurs ont conclu que la croissance des seiches est hautement affectée par la base alimentaire des juvéniles, pendant la phase exponentielle de croissance, et que les différences de croissance durant cette phase affecte la croissance durant tout le cycle de vie des seiches. Le taux de survie des juvéniles est plus important chez ceux ayant une bonne croissance dans la première phase de vie post-éclosion. Donc la disponibilité de certaines proies dans un milieu affecte la croissance de la population locale de seiche.

Tableau 7 : Effets de la qualité nutritionnelle de proies (différentes espèces ou différents états physiologiques) sur la croissance (TCI: Taux de croissance instantanée (% poids seiche/jour)), le taux d'ingestion (TI, % poids seiche/jour) et la survie (TS, %) des seiches *Sepia officinalis* L. n= le nombre de seiches étudiées, Pg = le poids en gramme des seiches au jour 20 de prélèvement (J20) et au jour 120 (J120). N : *Paleomonetes* naturelle, J : *Paleomonetes* ayant jeûné, E : *Paleomonetes* enrichie (D'après Domingues *et al.*, 2001 et Correia *et al.*, 2008)

Auteurs	n	Aliment	Pg (J20)	Pg (J120)	TCI (%)	TI (%)	TS (%)
Domingues et	30	Artemia sp.	0,48 ± 0,15	74 ± 14	2.7	-	67
al. (2001)	30	Paramysis nouvelli	1,47 ± 0,12	126 ± 23	7.6	-	90
	90	Paleomonetes varians (J.)	-	-	2,8 ± 1	9 ± 1,6	99
Correia et al. (2008)	90	Paleomonetes varians (N.)	-	-	3,3 ± 1,1	9,3 ± 2,4	100
	90	Paleomonetes varians (E.)	-	-	4,9 ± 0,5	15,5 ± 0,9	98

Cependant, l'état du milieu jouerait aussi un rôle. Pour une même espèce de proie, selon son état physiologique, celle-ci peut affecter la croissance de la seiche. Correia *et al.* (2008) ont étudié l'effet de la qualité nutritionnelle d'un crustacé (*Paleomonetes varians*) sur la croissance des juvéniles. Ces proies étaient divisées en trois lots. Avant d'être donnés aux juvéniles, un premier lot (N) était directement prélevé du milieu naturel, un deuxième lot (J) était mis à jeun pendant 5 jours et un dernier lot (E) était enrichi. Ces auteurs ont observé que la croissance des juvéniles était significativement affectée par l'état physiologique des proies. Les taux de croissance instantané (TCI) ainsi que les taux d'ingestion (TI) des proies N et E chez les juvéniles étaient supérieurs à ceux des proies J (**Tableau 7**).

La compétition entre individus est le deuxième facteur biotique étudié. Les seiches ne sont ni solitaires ni très sociales (Forsythe *et al.*, 2002). Les juvéniles vivent dans la nature sur des substrats très hétérogènes. On trouve des substrats de pierre, de débris de carapaces, de sable et différents mélanges. La composition du substrat est importante puisque les seiches en général s'y enfouissent pendant la journée et chassent les proies dans la colonne d'eau durant la nuit (Sykes *et al.*, 2003). Mais mise à part la nature du substrat, la densité de populations des seiches d'un milieu donné est primordiale. Cette densité joue sur la compétition entre les individus. Les interactions sociales peuvent influencer la croissance et les conditions de vie, entre la biodisponibilité des proies et la compétition entre les juvéniles, amenant à des mortalités prématurées (Sykes *et al.*, 2003).

Différents auteurs se sont penchés sur l'étude des densités limites pour une bonne survie et une bonne croissance des juvéniles (**Figure 9**). Le TCI des jeunes seiches (< 40 jours post-éclosion) n'est pas affecté par les fortes densités, allant jusqu'à 1544 seiches par m<sup>2</sup>, néanmoins elles étaient particulièrement stressées dans les élevages aussi bien isolés que surpeuplés. Cependant, une corrélation positive entre la densité de population et le taux de survie a été observée. Sykes *et al.* (2003) ont indiqué que les densités ne devaient pas excéder 500 seiches par m<sup>2</sup> avec une surface de fond d'au moins 600 cm<sup>2</sup>. Forsythe *et al.* (2002) ont trouvé que les densités, de 400 seiches par m<sup>2</sup> qui approche des limites supérieures, ont un impact sur la survie et l'alimentation des juvéniles. Néanmoins, ces observations concernent les seiches dans leur premier mois post éclosion. En effet, entre le 40<sup>ème</sup> jour post-éclosion et l'âge adulte, la densité de population semble avoir plus d'impact sur le TCI. Les densités de seiche au m<sup>2</sup> doivent être inférieures à celles des premiers stades (Sykes *et al.*, 2003). Correia *et al.* 2005 trouve un impact, avec une densité de 76

seiches/m<sup>2</sup>, sur le TCI à partir du 40<sup>ème</sup> jour mais n'en trouve pas sur le TS(%). Finalement, un effet positif de la densité est observé sur la fertilité au moment des pontes avec des taux d'éclosion plus importants lorsque la densité des femelles est plus forte. En revanche, les fortes densités induisent une baisse de fécondité soit moins d'œufs déposés par femelle (Correia *et al.*, 2005).



+, ++, +++: importance croissante

-, \*: respectivement absence et présence d'impact

Figure 9 : Effets de la densité de seiches *Sepia officinalis* en culture par m<sup>2</sup> sur leur croissance et leur survie. TC : taux de conversion (%), TCI : taux de croissance instantanée (% poids seiche / jour), TI : taux d'ingestion (% poids seiche/jour), TS : taux de survie (%). (D'après les résultats de Domingues *et al.* 2003, Sykes *et al.* 2003, Correia et al, 2005).

#### C. Croissance des seiches aux premiers stades de vie

La croissance peut être étudiée de différentes manières, dont par l'étude de la fréquence de taille qui peut être appliquée chez la seiche (Challier, 2005 ; Royer, 2006). Mais la plupart des auteurs soulignent la nécessité d'être prudent dans l'interprétation de ces données, principalement en raison des fréquences de taille qui sous-estiment la croissance, due fait de la variabilité des tailles à un âge donné (Caddy, 1991). De plus, cette méthode est difficilement applicable à de très jeunes seiches dans le milieu naturel. Challier et al. (2005) ont combiné cette méthode avec la détermination de l'âge des individus par la méthode des statholithes. Ces auteurs ont pu déterminer des taux de croissance de pré-recrues dans différentes régions mais avec des individus âgés au minimum d'une trentaine de jour. Cette estimation de taux de croissance couvrait des âges compris entre 30 et 90 jours post-éclosion. Des indices biochimiques ont été développés afin d'estimer le taux de croissance des animaux du milieu naturel. Les indices biochimiques les plus couramment utilisés : le taux protéique et les acides nucléiques servent à déterminer la croissance somatique de l'animal par l'évaluation de la synthèse protéique. Clarke et al. (1989) ont montré qu'il existait une relation entre ARN/ADN et taux de croissance chez des juvéniles de Sepia officinalis. Cependant, Pierce et al. (1999) estiment que le taux de protéines est préférable au taux d'ARN ou au rapport ARN/protéines en tant qu'indice de croissance, car il est corrélé à la nutrition à court-terme. Moltschaniwskyj et Jackson (2000) abondent en ce sens en montrant que le rapport ARN/protéines n'est pas adapté pour estimer le passé nutritionnel chez Sepia elliptica et Sepioteuthis lessoniana. D'autres indices biochimiques ont été développés. Koueta et al. (2000) ont montré que l'ATCase peut servir d'indice de croissance instantanée chez les jeunes seiches dont l'âge ne dépasse pas 40 jours. Perrin (2004) a montré une corrélation entre la croissance des pré-recrues de seiche dans le milieu naturel et des activités enzymatiques digestives (protéases totales acides et la trypsine) pouvant servir en tant que biomarqueurs pour la croissance. Cependant, l'application de ces méthodes à des âges précis nécessite des méthodes d'évaluation de l'âge qui soient facilement réalisable sur des échantillons du milieu naturel. Le suivi expérimental de la croissance de juvéniles de seiche à partir d'œufs collectés reste la méthode la plus simple pour suivre la croissance avec l'avantage de connaître avec précision l'âge des individus. Cette technique a été utilisée pour tester l'effet de différents facteurs biotiques (Sykes et al., 2003; Grigoriou and Richardson, 2008; Baeza-Rojano et al., 2010) et abiotiques (Domingues et al., 2001; Koueta and Boucaud-Camou, 2003) sur la croissance des juvéniles de seiche dans la première phase de croissance post-éclosion. De plus, le suivi de croissance expérimental permet

d'estimer différents paramètres tels que le taux de croissance instantanée, le taux d'ingestion, le taux de conversion des aliments mais aussi le taux de survie des juvéniles (Koueta and Boucaud-Camou., 2001).

#### D. Contexte et but de ce chapitre

Plusieurs facteurs, à grande échelle comme à échelle locale, influencent le cycle de vie de la seiche (**Figure 10**). Les facteurs abiotiques et biotiques forment les deux principaux axes qui déterminent les variations locales entre différents sites.

En Manche, la population de seiche effectue des migrations saisonnières entre la zone Ouest Manche et les zones de pontes côtières. Cette espèce nectobenthique vit donc près des côtes pendant les premiers stades de vie. Cette phase juvénile joue un rôle primordial dans le cycle de vie par la suite. Ayant un cycle de vie de deux ans, le renouvellement du stock de seiche de Manche se fait fréquemment. Ce renouvellement est donc hautement dépendant de la réussite des stades de pré-recrues au bord des côtes.

Le chapitre 1 explore, pour la première fois, la variabilité spatio-temporelle des caractéristiques des œufs (durée d'incubation, taux d'éclosion), des juvéniles (poids à l'éclosion, taux de croissance et autres paramètres de croissance, taux de survie) et des pré-recrues (poids, taux de croissance) dans quatre sites de ponte des côtes anglo-normandes. Le but de ce travail est d'obtenir des informations sur les jeunes stades de vie de la seiche dans les habitats côtiers (stades dit de pré-recrues) et d'identifier des variables au cours de cette phase critique de développement pouvant influencer la distribution et le recrutement de cette ressource en Manche. Ce premier chapitre se subdivise en deux parties :

- La première partie traite d'une part, des caractéristiques des œufs et d'autre part, du suivi expérimental de la croissance des juvéniles issus des éclosions
  (Cette première partie à fait l'objet d'une publication soumise dans *Journal of Sea Research*)
- La deuxième partie s'intéresse aux caractéristiques des pré-recrues récoltées dans les sites de ponte



Figure 10 : Schéma récapitulatif des influences environnementales (biotiques et abiotiques) et des activités humaines sur la croissance embryonnaire et post-éclosion de *Sepia officinalis*.

### *II. VARIATIONS SPATIO-TEMPORELLES DES CARACTERISTIQUES DES SEICHES AU COURS DE LEUR JEUNES STADES DE DEVELOPPEMENT EN MANCHE*

#### <u>Résumé:</u>

Les écosystèmes côtiers présentent une variation spatio-temporelle des facteurs abiotiques qui peuvent influencer les jeunes stades de vie de la seiche et induire par la suite des fluctuations de son recrutement et de son abondance. Dans cette étude, la variation des taux d'éclosion des œufs ainsi que la survie et la croissance des jeunes seiches a été étudié dans quatre sites de ponte (deux français et deux anglais) entre 2008 et 2011. Les œufs de seiche ont été récoltés au mois de juillet dans l'ensemble des sites en prenant note de leur localisation (zone intertidale/subtidale). Les grappes d'œufs sont différemment concentrées en fonction des sites avec le site d'Agon Coutainville (AC, Ouest Cotentin) ayant la plus forte concentration d'œufs dans la zone intertidale contrairement aux trois autres sites [Torbay (TB), Selsey (SE) et Baie de Seine (BS, Est Cotentin)] où les œufs sont essentiellement (pour BS) voir exclusivement (pour TB et SE) en zone subtidale. Ces différences sont liées en partie à la topographie du terrain et à l'amplitude de marnage dans les sites étudiés (Le marnage à AC est de 12m alors qu'il est de 8m à BS et de 4m dans les sites anglais). Mais la possibilité d'un choix des géniteurs ne peut être exclue puisque les plus fortes concentrations sont trouvées dans la zone intertidale à AC. Un décalage dans la période d'éclosion des œufs a été relevé entre les côtes françaises et les côtes anglaises où les œufs anglais nécessitent une période d'incubation plus longue en laboratoire comparé aux œufs des sites français. Ce retard est lié à la température d'incubation des œufs. Le nombre de degrés jours accumulés par les œufs dans les sites anglais n'est pas suffisant (dû aux températures plus froides comparé à celle des sites français). Les œufs nécessitent encore 20 à 45% de degrés jours supplémentaires au moment de la collecte pour que les éclosions se produisent. De même, une différence significative a été observée dans les taux d'éclosion entre les deux côtes avec les œufs des sites anglais ayant des taux d'éclosion significativement supérieurs (p< 0.05). Une variabilité interannuelle du taux d'éclosion a aussi été notée au sein de chaque site.

Un suivi de croissance expérimentale a ensuite été réalisé dans les mêmes conditions biotiques et abiotiques, à partir des nouveau-nés éclos. Des différences significatives (p < 0.05) ont été trouvées au niveau des poids de juvénile à l'éclosion qui résultent des températures d'incubation dans le milieu naturel. Ces différences sont maintenues après 35 jours d'élevage puisque les juvéniles présentent des performances de croissance similaires (Taux de croissance instantanée, taux d'ingestion et de conversion des aliments) avec aucune différence significative (p > 0.05). Les juvéniles ont une croissance identique lorsqu'ils sont élevés dans les mêmes conditions environnementales. Quant aux taux de survie des juvéniles, une faible survie a été observé dans le site de TB en 2011. Les mortalités seraient liées à la qualité des œufs sur ces sites de cette année là. L'ensemble de ces résultats indiquent des variations spatiales et temporelles dans les taux d'éclosion des œufs, la période d'éclosion et la survie des juvéniles. Ces variations peuvent influencer des variabilités spatiales et temporelles dans la contribution de ces sites au stock de seiche recruté.

#### SPATIAL AND TEMPORAL VARIATION IN CHARACTERISTICS OF CUTTLEFISH, SEPIA OFFICINALIS L., EARLY LIFE HISTORY

Safi G.<sup>a\*</sup>, Bloor I.<sup>b</sup>, Gras M.<sup>a</sup>, Grangeré K.<sup>a</sup>, Jackson E.L.<sup>b</sup>, Robin J.P.<sup>a</sup>, Koueta N.<sup>a</sup>

a- Laboratoire de biologie des mollusques marins et des écosystèmes associés, FRE3484 BioMEA, CNRS INEE, Université de Caen Basse-Normandie, 14032 Caen, France

b- Marine Biological Association, the Laboratory, Citadell Hill, Plymouth PL12PB, UK

\*Corresponding author: Georges Safi: tel.: (33) 231565295; fax: (33) 231565346; safigeorges@hotmail.fr

#### <u>Highlights</u>

- Early life characteristics are the basis of understanding stock renewal
- Incubation temperature affected hatching time, rate and hatchling weight
- Hatching rate was significantly higher on the English coast compared to the French coast
- Mortality episodes observed may affect a site contribution to the stock

#### Abstract

Coastal ecosystems exhibit various spatio-temporal patterns of abiotic factors which could influence early life stages of Sepia officinalis L. and afterwards induce fluctuations in its recruitment and abundance. In this study, variation in hatching, survival and growth of young cuttlefish stages was investigated in two French and two English spawning sites of the English Channel between 2008 and 2011. Cuttlefish eggs were collected in July from all sites taking note of egg location (in intertidal or subtidal area) and the determination of their hatching rate. Egg clusters were found to be differentially concentrated in sites between intertidal and subtidal areas and a clear shift in hatching time was observed between English and French coasts. English eggs needed longer laboratory incubation times compared to the French eggs. This delay was linked to incubation temperature as the degree-days, accumulated by eggs in the English sites till collection date, were not sufficient for hatching to occur. Furthermore, a significant difference was observed in hatchings between the two coasts with English sites having significantly (p < 0.05) higher hatching rates than the French sites. An inter-annual variability in hatching rate was also noted within each site. An experimental growth survey was performed in standardized abiotic and biotic conditions with hatchlings obtained from collected eggs. Significant differences (p < 0.05) were found in juvenile weight at hatching that were due to the incubation temperature in spawning sites. These differences were maintained in an experimental growth survey with no significant (p >0.05) difference in growth parameters (instantaneous growth rate, ingested rate or conversion rate) and a parallel growth between the juvenile batches. As for juvenile survival rate, episodes of high mortality were observed in specific sites and years that were probably linked to lower egg quality with hatchlings being more easily subject to disease. Finally, spatial and temporal variations in hatching time and rate along with juvenile survival could impact the capacity of some coastal sites to contribute to the renewal of the cuttlefish stock.

Keywords: Cuttlefish, early life, hatching, juveniles, growth, English Channel

#### A. Introduction

Early life stages of animals are of interest both as components of the life cycle of a given species and as models for generalized ontogenetic patterns and processes. Such stages include embryonic and post-embryonic development (Boletzky, 2003). In cephalopods, embryonic development is characterized by the yolk presence in eggs with different duration of embryogenesis ranges from a few days in small eggs at high temperatures (O'Dor and Dawe, 1998) to more than one year in large eggs developing at low temperatures (Voight and Grehan, 2000). Apart from species differences, ambient temperature sets the pace of the development and thus influences the duration of embryogenesis (Boletzky, 2003). Most post-hatching cephalopods, primarily squids and octopods, have a planktonic stage (paralarva stage). In other cephalopods (for example cuttlefish) hatchlings are large, immediately benthic replicas of the adults and thus referred to as juveniles (Navarro and Villanueva, 2000).

The geographical distribution of the common cuttlefish, *Sepia officinalis* L., 1758 covers the Mediterranean Sea and the waters of the Eastern Atlantic from southern Norway and northern England to the northwestern coast of Africa. It is also found in Madeira and in the Canary Islands (Guerra, 2006). In the English Channel, the population of *S. officinalis* makes large migrations offshore in winter and inshore in spring for reproduction (Boucaud-Camou and Boismery, 1991). The littoral zones of the English Channel are thus important spawning locations for *Sepia*. Once mating occurs, cuttlefish lay their eggs on benthic structures in coastal waters essentially between April and June and die shortly afterwards (Boucaud-Camou and Boismery, 1991). These spawning sites were described by several authors (Boucaud-Camou and Boismery, 1991; Dunn, 1999; Challier, 2005) and are distributed on the French coast between the western and eastern Cotentin Peninsula and Bay of Somme area and on the English coast in Lyme Bay, Sussex and Kent coasts. Egg masses, which represent the cuttlefish stock renewal leaving the coast in autumn, are subject to environmental variables that influence their development and survival which can affect life history characteristics afterwards as well as distribution and abundance(Bouchaud and Daguzan, 1989; Pierce *et al.*, 2008).

Many authors have described cuttlefish embryonic development and eggs characteristics (Boletzky *et al.*, 2006; Sykes *et al.*, 2008; Gutowska and Melzner, 2009). Lemaire (1970) defined 30 stages for embryonic development and examined the relationship between water temperature and egg incubation time. Egg characteristics have been investigated in terms of yolk composition and

quality (Navarro and Villanueva; 2000, Sykes et al. 2008) and the embryos environment within eggs, both with respect to the evolution of physiochemical parameters (Gutowska et al., 2009), but also hatching, which is the final result. Hatching rates were often studied in relation to specific parameters such as temperature (Basuyaux et al., 2010), salinity (Blanc, 1998) or spawning date (Bouchaud, 1991), but few studies were interested in spatial hatching variations. Juvenile growth can be observed in many ways. Length-frequency analysis is one of them and has been applied for S. officinalis (Royer et al., 2006). But most authors point to the need for caution in interpreting such data, principally because length-frequency data is known to underestimate growth because of inter-individual variability in size at age (Caddy, 1991) and this method is also very difficult to apply in very young specimen. Other techniques include the examination of periodic growth increments in hard structures such as the statoliths (Challier, 2002), somatic growth determination by studying the DNA, RNA and protein ratios (Ferron and legget, 1994) or experimental growth surveys using juveniles from collected eggs, which have the advantage of knowing the age of hatchlings (Koueta et al., 2000; Domingues et al., 2001; Koueta et al., 2006; Sykes et al., 2006). Experimental growth surveys can give information on growth parameters such as the instantaneous growth rate, the ingested rate and the conversion rate (Koueta and Boucaud-Camou., 2001). This method is used to test various biotic (Sykes et al., 2003; Grigoriou and Richardson, 2008; Baeza-Rojano et al., 2010) and abiotic (Domingues et al., 2001; Koueta and Boucaud-Camou, 2003) influences on juvenile growth and performance.

The present study investigates, for the first time, early stages characteristics (hatching rates, hatching growth and survival) of cuttlefish in relation to different spawning sites, using data collected in four different spawning habitats over four years. Hatching rate was obtained after egg collection from spawning sites. Growth and survival were estimated by the experimental growth survey method. Relationship between the cuttlefish abundance and the early life history of juveniles in the coastal habitats is still not well documented. Studying these habitats could give important elements for understanding their contribution to the central stock. The aim of this work was to (1) obtain more information on early life stages (also known as pre-recruited stages) of *S. officinalis*; (2) to study pre-recruited stage characteristics between various locations in order to answer the following questions: Are there inter-annual and spatial differences in eggs incubation and hatching rates due to various environmental conditions? Do these conditions have an impact afterwards on hatchlings growth and survival?

#### B. Material and methods



#### 1. Study spawning sites

## Figure 11: Study spawning sites distribution of *Sepia officinalis* in the English Channel. The monitored spawning sites are: BS (Bay of Seine-FR), AC (Agon Coutainville-FR), TB (Torbay-UK) and SE (Selsey-UK).

This study was performed with four sites among the main spawning grounds of cuttlefish in the English Channel. Two spawning sites were located on the French coast (Agon Coutainville (AC; 49°02'35"N, 1°34'32"W) and Bay of Seine (BS; 49°18'53"N, 0°21'0"W)) and two were located on the English coast (Torbay (TB; 50°27'08"N, 3°33'25"W) and Selsey (SE; 50°44'06"N, 0°47'23"W)) (Figure 11). The French sites were on the eastern (BS) and western (AC) coasts of Cotentin peninsula. The west coast is exposed to general currents of the North Atlantic drift, which are propagated eastward and deflected northward along the coast. The maximum spring tidal range is as much as 12 m, and among the highest in the world. Thus, ecosystems of the west coast are megatidal (maximal bottom current speed is 10 knots and intertidal zone covers a very large surface) (Lefebvre et al., 2009; Dauvin et al., 2012). Furthermore, this site offers wide sandy expanses with scattered rocks and seaweeds. The BS, located east of the Cotentin Peninsula, is a very large bay that is open to the Channel but which nevertheless remains more protected from the prevailing western winds and marine currents than ecosystems on the west coast. The environment is macrotidal with a maximum tidal range of 8m, maximal bottom current speed is 5 knots and the intertidal zone is smaller than the west coast (Lefebvre et al., 2009; Dauvin et al., 2012). This site offers sandy areas and rocky plateaus with high macroalgal densities. Macroalgae

are important as natural support for egg clusters and sandy bottoms are areas for hatchlings to hide (via burial). Indeed, the young animals, with a sand covering behavior that begins very early, stay on the bottom and swim up only to capture prey (Boletzky, 1983).

For the English coastal sites, TB, which is a smaller and more protected bay than the BS, and SE, which is a site widely open to the English Channel, were chosen for this study (Figure 11). TB is situated in Devon off the south-west coast of England, in the Western English Channel. The environment at TB is meso-tidal with a maximum spring tidal range of 4m (Woodroffe, 2003; Herbert *et al.*, 2007). TB is exposed to the east and thus sheltered from the prevailing west and south-west winds. It has relatively weak tidal streams, but is vulnerable to wind and wave action from the east (Forster, 1955). The area is relatively shallow, reaching depths of around 20 m in the centre of the bay, where muddy sediment is considered to dominate (Larsonneur *et al.*, 1982), further inshore areas of sand and reef are also found (McBreen *et al.*, 2011). A large part of the shallow (less than 5m) periphery of the bay is covered by seagrass meadows (Hirst and Atrill, 2008). SE is situated in West Sussex off the south-east coast of England, in the Eastern English Channel. The environment is mesotidal with a maximum spring tidal range of 4.5 m (Cope, 2005). The inshore region within the study area is relatively shallow (< 30m). The sediment in the area is a mix of sand, mud and rocky reef (McBreen *et al.*, 2011) which supports a diverse range of flora and fauna. No seagrass was present at this site.

#### 2. Eggs collection and handling

Eggs from *S. officinalis* were collected during July from 2008 till 2011. Two protocols were used: intertidal and subtidal. The intertidal protocol consisted of making linear transects that were perpendicular to the coast at low tide. Five to eight persons were aligned over a 1 kilometre distance and moved towards the sea. Each cluster found was geo-localised with a GPS then transferred in a box half filled with seawater and algae to keep it fresh and stabilized for transport. The subtidal protocol also consisted in linear transects with three to five scuba-divers. Eggs were geo-localised and conditioned as for the intertidal protocol. Clusters were transported afterwards to the marine research centre where eggs were separated in groups (approximately 100 eggs) and placed on sieves (0.36 x 0.28 m, 1mm mesh size) distributed in large tanks containing circulating seawater, with temperature between 18-19°C. Hatching was recorded daily and the final hatching rate calculated as:

Hatching percentage = (number of hatchlings / total number of collected eggs) x 100

#### 3. Experimental design

Once eggs were installed in the rearing structures they were acclimatized for 3 days to avoid premature hatchlings, resulting from transport stress, being used in the rearing experiments. Afterwards, hatchlings were collected daily to determine their hatching day. Throughout the hatching period, hatching peaks were observed. Juveniles used for the growth survey were collected during these peaks in order to have 150 cuttlefish per site which hatched on the same day. The experimental growth survey ran afterwards for 35 days between July and September from 2008 till 2011. Cuttlefish from each site were placed into six rectangular tanks (0.36 x 0.28; 1mm mesh size; 25 hatchling /tank). All batches were under the same controlled and standardised conditions and were fed *ad-libitum* with frozen shrimp, *Crangon crangon*.

#### Rearing system and parameters

Rearing was conducted in a semi-enclosed system that limited the presence of debris that causes turbidity of the water. This system allowed 80% of seawater to be renewed in the tanks per day to avoid problems with evaporation, loss of water due to tank cleaning, changes in salinity and pH, and accumulation of nitrate ( $NO_3^-$ ), nitrite ( $NO_2^-$ ), ammonium( $NH_4^+$ ), and ammonia ( $NH_3$ ) concentrations (Koueta and Boucaud-Camou, 2003). The base of the rearing system consisted of a 1000l storage tank containing a heating system to maintain a constant temperature. The natural seawater used to renew the circuit ran through UV lamps before filling the tank which also contained oyster shells that acted as biological filters. Water was driven by an automatic pump into a protein skimmer, which removed dissolved organic material and returned the seawater to the superior tray containing the filters.

Physical and chemical parameters were maintained by constant renewal of fresh seawater. The photoperiod was 12:12. Weekly measurements made with colorimetric kits (Tetra Test Kit) consistently revealed concentrations of  $NO_3^- < 10 \text{ mg/l}$ ,  $NO_2^- < 0.1 \text{ mg/l}$ ,  $NH_4^+ < 0.5 \text{ mg/l}$  and  $NH_3 < 0.02 \text{ mg/l}$ . The pH of seawater was 8 and the oxygen was optimised by adding aerators to each tank.

#### Food preparation

Size	Length range (mm)	Mean weight (mg)	rearing period (days)
Mini	12 - 16	25.7 ± 5.6	1-7
Small	17 - 23	64.5 ± 7.4	8 - 21
Average	24 - 30	112 ± 30.2	22 - 35

Table 8: Size classes, based on brown shrimps (*Crangon crangon*) total length and their subsequent mean weight, used to feed *Sepia officinalis* hatchlings.

Controlled food preparation (regulating the food quantity and size) was an important consideration to avoid bias between cuttlefish batches due to food availability. The food preparation started before the rearing period and lasted for more than one month (between June and July). When rearing started, cuttlefish were fed every afternoon with frozen wild caught brown shrimps (*Crangon crangon*). The shrimps were divided into three classes based on their length (**Table 8**). It was important to rank prey according to their size to ensure shrimp were the same size as cuttlefish or smaller. After size classification, the prey mean weight was used for the preparation of standard prey bags with 2g (Mini), 3g (Small) or 4g (Average) of shrimps. The bags were then frozen at -80°C and used afterwards to feed each cuttlefish tank (25 cuttlefish / tank). The same food quantity was placed in each tank every day and the amount of ingested food was estimated by weighing the remaining shrimps.

#### Growth monitoring

Weight and length measurements were conducted once a week on 24 juvenile cuttlefish per site (4 per tank). A sliding calliper was used to measure dorsal mantle length (mm) and a Sartorius balance was used to weigh all animals with a precision of 0.1 mg (Koueta and Boucaud-Camou., 1999). Furthermore, the quantity of food eaten by each cuttlefish batch was calculated. These measurements allowed us to determine the mean length (mm) and weight (g) of cuttlefish at each sampling date to be determined and several growth parameters to be calculated such as:

Weight increase (g): final weight - initial weight
Ingested rate (IR - % body weight/day): (IF/average W(t)) x 100, where IF is the ingested food (g) and average W(t) is the average wet weight (g) of the cuttlefish during the time period (g.d<sup>-1</sup>).

Instantaneous growth weight (IGR - % body weight/day): (In W2 – In W1) x 100/t, where W2 and W1 are, respectively, final and initial weight (g) of each animal and t (35 days) the duration of the experiment in days.

Conversion rate (CR - %): (weight increase (g) / Ingested Food (g)) x 100

#### 4. Data modeling and statistical analysis

Juvenile cuttlefish have an exponential growth in their early life history due to high growth rate when reared in optimal conditions (Koueta and Boucaud-Camou, 2001; Domingues *et al.*, 2006) as described in the rearing parameters. Exponential models were thus fitted by applying linear models to log transformed weight-at-age data. Natural logarithmic transformations were formed for comparison of growth.

For statistical analysis, preliminary tests of normality and homoscedasticity allowed the use of parametric methods. Weight, growth parameters and survival rate of juveniles from BS, AC, TB and SE were compared using analysis of variance (ANOVA or ANCOVA in the case of growth rates) with R statistical software. When differences were present, a post hoc Tukey test was used to determine differences between batches. Hatching rate differences were analyzed with a binomial error GLM (GLM function with R software).

Temperature (T) (in °C) was obtained from three of the four study sites (SE data absent) and salinity only from the French sites. These data were provided by the Smel and Somlit-CREC for the French sites and by MBA for TB. T (in °C) was used to calculate natural degree-days (°C) accumulated by eggs during incubation. The formula used was:

$$DD = \sum_{1}^{n} (ti - t0)$$

where DD is the accumulated degree-days (°C), ti is T (in °C) at day (i) and t0 is the threshold T (in °C) below which eggs stop developing and which value is 9.7°C in cuttlefish eggs (Bouchaud, 1991). DD necessary for *S. officinalis* hatching success was estimated to 409°C by Basuyaux *et al.* (2010). NDD is the natural degree-days calculated from sites T (in °C) between 1<sup>st</sup> May and eggs collection date. 1<sup>st</sup> May was chosen because data was available from May till collection date in all sites and

all studied years and this time is consistent with eggs incubation period. EDD is the experimental degree-days accumulated between eggs collection date and first hatching.

T (in °C) and salinity were found to be significantly correlated in BS (p-value=0.003) and in AC (p-value=0.03). In order to test the effect of T (in °C) and salinity independently, a linear model was performed between the two variables and salinity residuals (SR) were extracted. Finally, SR, T (in °C) and NDD were tested as explaining variables of the hatchling weight in a linear model with R software. T (in °C) impact on TB hatchlings weight was not studied because of the delay in first hatching observed with this site.

# C. Results

#### **1.** Hatching and juveniles survival rates

The mean hatching rate (HR) over four years monitoring revealed significant differences between the four studied sites (**Table 9-A**). For all eggs collected, the lowest mean HR found was for French sites (BS (62.2%) and AC (65.9%)) and the highest in English sites (TB (74.4%) and SE (91%)) (**See Figure 11** for station location). Only one exception was observed for TB in 2010 where HR was lower than the French ones (**Table 9-B**). Furthermore, differences in egg location, hatching rate and survival rate were observed between the sites for each year and between years (**Table 9-B**).

For the egg location, AC had high egg concentrations in the intertidal zone. As for the other sites, the highest egg concentrations were in the subtidal zone between 5 and 10 meter depth. The comparison between eggs from the subtidal and intertidal zone from French sites showed that the egg location in BS had no impact on the hatching rates that were already the lowest. On the other hand, in AC site, the subtidal zone was more favorable for a better hatching rate (93% in 2011) compared to those found in the intertidal zone (between 60 and 73 %). The high hatching rate of AC site in 2011 was also comparable to those found in the English sites. However, beside the egg location effect, an inter-annual variability was also observed in the hatching rate when eggs were collected in the same zone. Indeed, in AC intertidal zone, HR varied from 60% to 73% between 2008 and 2010 and in TB, HR in subtidal zone varied from 66% to 93% between 2009 and 2011.

As for the mean survival rate after 35 days of rearing, no significant differences were observed between the four studied sites (**Table 9-A**). The mean survival rate for all batches was around 90% except for three points (TB in 2010 (98  $\pm$  1.5%), SE in 2010 (84  $\pm$  5.4%) and TB in 2011 (76  $\pm$  6%)) (**Table 9-B**).

Table 9: Hatching and hatchling survival (35 days of rearing) rates obtained for cuttlefish eggs collected from different spawning sites over several seasons. A- Mean values of four year monitoring. B- Details for each year and each site. The monitored spawning sites are: BS (Bay of Seine-FR), AC (Agon Coutainville-FR), TB (Torbay-UK) and SE (Selsey-UK). The location of eggs is specified by Inter (intertidal) and Sub (subtidal) and n is the sample size.

Α	Site	Total eggs	Total hatchlings	Hatching rate / site	Total reared juveniles	Juveniles survival rate / site
	BS	8510	5289	62.2 <sup>a</sup>	600	91 ± 1 <sup>a</sup>
	AC	7967	5248	65.9 <sup>b</sup>	600	92 ± 1 <sup>a</sup>
	ТВ	3437	2558	74.4 <sup>c</sup>	450	88 ± 11 <sup>a</sup>
	SE	3180	2895	91 <sup>d</sup>	300	87 ± 4 <sup>a</sup>
В		Eg	gs characteris	tics	Juvenile	s characteristics
Year	Site	Eggs location	n	Hatching rate (%)	n	Survival rate (%)
80	BS	Inter	1666	57 <sup>a</sup>	150	92.7 ± 2.1 <sup>ab</sup>
20	AC	Inter	4902	60.1 <sup>b</sup>	150	92.7 ± 2.1 <sup>ab</sup>
•	BS	Sub	3704	58 <sup>ab</sup>	150	90.4 ± 3.2 <sup>ab</sup>
2009	AC	Inter	1034	60.5 <sup>ab</sup>	150	91.2 ± 3.9 <sup>ab</sup>
	ТВ	Sub	925	66.4 <sup>ce</sup>	150	91.2 ± 3.9 <sup>ab</sup>
	BS	Sub	800	72.6 <sup>d</sup>	150	91.2 ± 1.5
010	AC	Inter	1100	73.3 <sup>d</sup>	150	90.4 ± 4.1 <sup>ab</sup>
20	ТВ	Sub	1502	66.8 <sup>ce</sup>	150	98 ± 1.5 <sup>a</sup>
	SE	Sub	2020	94.4 <sup>f</sup>	150	84 ± 5.4 <sup>b</sup>
	BS	Sub	2340	68.8 <sup>e</sup>	150	91±3 <sup>ab</sup>
011	AC	Sub	931	93 <sup>f</sup>	150	92.8 ± 3.4 <sup>ab</sup>
50	ТВ	Sub	1010	93.2 <sup>f</sup>	150	76±6 <sup>°</sup>
	SE	Sub	1160	85.2 <sup>g</sup>	150	90.4 ± 4.7 <sup>ab</sup>
	a,b,c,d,e,f:I	Numbers not bearing	the same subsc	cript letter are significa	ntly different (p < 0	,05)

Table 10: Comparison of mean weight ( $\pm$  s.e.), mean ingested rate (IR %) ( $\pm$  s.e.), mean instantaneous growth rate (IGR %) ( $\pm$  s.e.), and mean conversion rate (CR %) ( $\pm$  s.e.) for all monitored sites over 35 days of rearing and for 4 seasons. The monitored spawning sites are: BS (Bay of Seine-FR), AC (Agon Coutainville-FR), TB (Torbay-UK) and SE (Selsey-UK), and n is the number of individuals used for the mean weight (g) at day 1 and day 35 (rearing end).

Year	Site	5	Mean we Day 1	ight (g) n	) Dav 35	Mean IR (%) Period 1-35 davs	Mean IGR (%) Period 1-35 davs	Mean CR (%) Period 1-35 davs	Mean T (°C) Period 1-35 davs
800	BS	24	0.26±0.01 <sup>a</sup>	30	3.92±0.17 <sup>a</sup>	39.1±0.7 <sup>a</sup>	7.4±0.2 <sup>a</sup>	25.4 ± 0.8 <sup>ª</sup>	21.2 ± 0.07 <sup>a</sup>
7	AC	24	0.22 ± 0.006 <sup>cde</sup>	28	3.29±0.16 <sup>b</sup>	37.7±0.7 <sup>a</sup>	7.5±0.3 <sup>a</sup>	23.8±0.7 <sup>ab</sup>	21.2 ± 0.07 <sup>a</sup>
e	BS	24	0.22 ± 0.005 <sup>bcd</sup>	24	2.62 ± 0.09 <sup>c</sup>	15.3 ± 0.6 <sup>de</sup>	7±0.1 <sup>ab</sup>	23.3 ± 0.5 <sup>abc</sup>	19.9±0.06 <sup>b</sup>
500Z	AC	24	0.19±0.004 <sup>e</sup>	25	1.52 ± 0.09 <sup>e</sup>	14.7 ± 0.7 <sup>e</sup>	6 .1±0.3 <sup>bc</sup>	22.8±1.2 <sup>abc</sup>	19.8±0.09 <sup>b</sup>
	TB	24	0.20±0.008 <sup>de</sup>	24	2.29 ± 0.12 <sup>cd</sup>	15 ± 0.8 <sup>de</sup>	7 ± 0.3 <sup>ab</sup>	$20 \pm 1.3^{abcd}$	20 ± 0.05 <sup>b</sup>
	BS	24	0.25 ± 0.007 <sup>ab</sup>	26	1.99±0.11 <sup>de</sup>	22.2±0.6 <sup>b</sup>	6.5±0.3 <sup>ab</sup>	13.3 ± 2.1 <sup>bcd</sup>	19.3 ± 0.05 <sup>cd</sup>
070	AC	24	0.19±0.004 <sup>e</sup>	22	1.74 ± 0.07 <sup>de</sup>	23.2 ± 0.4 <sup>b</sup>	6.3±0.2 <sup>bc</sup>	17.6±1.8 <sup>bcd</sup>	19.4±0.03 <sup>c</sup>
)Z	TB	24	0.21 ± 0.009 <sup>de</sup>	29	2.02 ± 0.11 <sup>cde</sup>	19.9 ± 0.8 <sup>bc</sup>	6.5±0.2 <sup>ab</sup>	19.1 ± 2.2 <sup>abcd</sup>	19.4±0.03 <sup>c</sup>
	SE	24	0.20 ± 0.004 <sup>de</sup>	30	1.93 ± 0.15 <sup>de</sup>	20.3 ± 0.7 <sup>bc</sup>	6.3 ± 0.1 <sup>bc</sup>	$16.5 \pm 1^{bcd}$	19.4 ± 0.03 <sup>c</sup>
	BS	24	0.23 ± 0.004 <sup>bc</sup>	19	1.47 ± 0.06 <sup>e</sup>	20.4 ± 0.8 <sup>bc</sup>	$5.4\pm0.2^{cd}$	16±1.6 <sup>cd</sup>	19.1±0.06 <sup>d</sup>
ττ	AC	24	0.20±0.003 <sup>de</sup>	25	$1.08 \pm 0.04^{f}$	20.5 ± 1 <sup>bc</sup>	4.8±0.2 <sup>d</sup>	13.7 ± 1.1 <sup>d</sup>	19.1±0.06 <sup>d</sup>
50	TB	24	0.25 ± 0.005 <sup>abc</sup>	∞	1.58 ± 0.07 <sup>e</sup>	18.5±0.7 <sup>cd</sup>	4.9±0.1 <sup>d</sup>	$19.8 \pm 1.6^{abcd}$	19.4±0.03 <sup>c</sup>
	SE	24	0.24 ± 0.005 <sup>abc</sup>	20	1.51 ± 0.04 <sup>e</sup>	21 ± 0.8 <sup>bc</sup>	4.8±0.1 <sup>d</sup>	16.7±2.8 <sup>bcd</sup>	19.4 ± 0.06 <sup>cd</sup>
		a,b,c,	d,e,f: Numbers no	ot beari	ing the same sub	iscript letter are sign	ificantly different (p	0 < 0.05)	

#### 2. Experimental growth survey

Significant differences (p < 0.05) in juvenile weight at hatching (Day 1) were observed between spawning sites and these differences were maintained untill day 35 after hatching in experimental conditions (**Table 10**). Indeed, the comparison between the two French sites showed marked differences between BS and AC over four monitoring years with BS juveniles being significantly bigger than those of AC. Only one exception was noticed in 2010 when the weight of AC juveniles after 35 days was not significantly smaller (p > 0.05) than BS ones. As for the English sites, no significant differences (p > 0.05) were observed between TB and SE. At the end of the rearing, the English juvenile weights were closer to those observed for BS. A linear growth model applied to log transformed weight-at-age data was considered appropriate to describe juvenile exponential growth in these experimental rearing conditions (**Figure 12**). This model highlighted the parallel growth observed between cuttlefish batches for the entire duration of the experiment.

For each year, the ingested rate (IR - % cuttlefish body weight/day), the conversion rate (CR - % cuttlefish body weight/day) and the instantaneous growth rate (IGR - % cuttlefish body weight/day) did not show significant differences between cuttlefish groups (**Table 10**). The water temperature, which was the only abiotic parameter that varied between years, was also stable within each year, with no differences between cuttlefish batches. However, significant differences (p < 0.05) were noticed between the years (from 2008 till 2011) in the growth parameters where a decrease in the IR, CR and the IGR was observed. The same pattern was also noted for juvenile weight after 35 days of rearing and in the water temperature. In 2008, water temperature was 20.55 ± 0.12°C with a mean juvenile weight at day 35 around 3.5 g, a mean IR of 38%, a mean IGR of 7.5% and a mean CR of 23%. In 2011, the juveniles mean weight (ca. 1.3 g) was almost three times smaller than in 2008 when reared in water temperature around 19.2°C with a mean IR of 20%, a mean IGR of 5% and a mean CR of 15%.



Figure 12: Linear transformation of the exponential growth models fitted to *Sepia officinalis* early juvenile experimental growth from different spawning sites of the English Channel over four years. The monitored spawning sites are: BS (Bay of Seine-FR), AC (Agon Coutainville-FR), TB (Torbay-UK) and SE (Selsey-UK). (ANCOVA analysis indicates that within each year, slopes are not significantly different (p > 0.05)).

#### 3. Hatchlings and environmental parameters

			Tempera	iture (°C)			Salinit	y (psu)	
Site	Year	April	May	June	July	April	May	June	July
n 1ville :oast)	2008 2009	- 10,7 ± 1,29 11,6 ± 0,9	14,9 ± 0,9 14,2 ± 1	17,5 ± 1 17,5 ± 1,2	18,9 ± 0,9 19,3 ± 0,7	33,7 ± 0,01 34,9 ± 0,5	33,9 ± 0,2 34,6 ± 0,2	33,9 ± 0,2 34,6 ± 0,8	34,6 ± 0,06 34,8 ± 0,06
Agc outaii Vest c	2010	10,7 ± 1,4	13,4 ± 1,6	16,9 ± 1,2	20 ± 0,5	34,9 ± 0,4	35,3 ± 0,8	35,2 ± 0,5	35,3 ± 0,4
ح ت	2011	13 ± 1,1	15,3 ± 0,5	16,7 ± 0,8	18,2 ± 0,7	34,7 ± 0,1	35 ± 0,2	35,2 ± 0,4	35,8 ± 0,2
Mean/r	nonth	11,5 ± 1,1	14,5 ± 0,8	17,2 ± 0,4	19,1 ± 0,8	34,5 ± 0,6	34,7 ± 0,6	34,7 ± 0,6	35,1 ± 0,5
er ()	2008	10,3 ± 2,2	13,3 ± 2	15,6 ± 0,9	17,5 ± 0,7	32 ± 1	32,4 ± 0,4	32,5 ± 0,1	33,1 ± 0,7
Seir	2009	10,5 ± 1,5	13,3 ± 1,9	16,5 ± 2,3	18,2 ± 0,1	32 ± 0,2	32,5 ± 0,3	32,4 ± 0,3	33 ± 0,4
ıy of ast ı	2010	10,4 ± 1,1	12,6 ± 1,9	17,3 ± 0,8	19,2 ± 1,5	32,4 ± 0,6	33 ± 0,5	33,1 ± 0,3	33 ± 0,09
B.	2011	10,6 ± 1,2	13,6 ± 1,3	16,2 ± 0,4	18,5 ± 1,1	32,6 ± 0,3	32,6 ± 0,9	32,5 ± 0,7	32,8 ± 0,06
Mean/r	nonth	10,4 ± 0,1	13,2 ± 0,4	16,4 ± 0,7	18,3 ± 0,7	32,2 ± 0,3	32,6 ± 0,3	32,6 ± 0,3	33 ± 0,1
рау	2010	10,1 ± 0,3	12,9 ± 2,6	15,8 ± 0,7	14,9 ± 0,02	-	-	-	-
Tor	2011	-	12,6 ± 0,2	14,4 ± 0,5	15,9 ± 1	-	-	-	-
Mean/r	nonth	10,1 ± 0	12,7 ± 0,2	15,1 ± 1	15,4 ± 1	-	-	-	-

Table 11: Coastal water temperature (°C) and salinity (PSU) (mean and SD) for Agon Coutainville, Bay of Seine and Torbay sites between April and July from 2008 till 2011.

During the egg incubation period, mean coastal water temperature were higher in AC (FR) compared to those observed in BS (FR) and TB (UK) at the same time (**Table 11**). AC, BS and TB mean coastal water temperature in May were respectively  $14.5 \pm 0.8$  °C,  $13.2 \pm 0.4$  °C and  $12.7 \pm 0.2$  °C. A 1 °C difference was thus observed between AC and BS in May, but also in all the studied period (from April till July). As for TB, mean water temperature in April and May were slightly lower than BS ones and 1.5 °C lower than AC ones (**Table 11**). However, starting in June, a shift is observed between the French sites and the English one. Mean water temperature in French sites, respectively in June and July, rises up to  $16.4 \pm 0.7$  °C then  $18.3 \pm 0.7$  °C in BS and  $17.2 \pm 0.4$  °C then  $19.1 \pm 0.8$  °C in AC while the temperature stay stable in TB (respectively  $15.1 \pm 1$  °C and  $15.4 \pm 1$  °C). Furthermore, salinities were also studied in French sites but not in TB where these data were missing. Mean salinities rate were 2 PSUs higher in AC compared to those of BS all over the studied period.

Table 12: Cullefish *Sepia officinalis* L. eggs characteristics collected from different spawning sites over several seasons. NDD is the natural degree-days (°C) accumulated in eggs between the 1<sup>st</sup> May and the eggs collection date; EDD is the experimental degree-days (°C) accumulated between eggs collection date and first hatching date which corresponds to hatching delay period. The monitored spawning sites are: BS (Bay of Seine-FR), AC (Agon Coutainville-FR), TB (Torbay-UK) and SE (Selsey-UK).

Year	Site	Eggs collection date	Hatching delay	NDD	EDD
2008	BS	July, 8	0	385.5	0
2008	AC	July, 7	0	452.4	0
	BS	July, 23	0	476.3	0
2009	AC	July, 21	0	579.3	0
	ТВ	July, 24	3	-	30.6
	BS	July, 12	0	320.5	0
2010	AC	July, 12	0	448.1	0
2010	ТВ	July, 15	8	294.7	77.6
	SE	July, 12	14	-	135.8
	BS	July, 5	0	338.9	0
2011	AC	July, 6	0	435.4	0
2011	ТВ	July, 6	19	258.6	184.3
	SE	July, 5	13	-	126.1

A delay in hatching date was observed between French and English sites (**Table 12**). Eggs were collected from all studied sites in the same period (in July) and then transferred to rearing structures. However, hatching did not occur at the same time for all batches. Indeed, eggs from the French coast started hatching earlier than those from the English coast and this was observed in all monitoring years. Hatching delay observed in English sites vs French sites varied between 3 and 19 days depending on eggs collection date. Degree-days accumulated in the natural environment (NDD) were then calculated based on the temperature data collected in each site. This approach revealed a significant difference in degree-days accumulation between sites. AC had the higher NDD values followed by BS then TB. For AC and BS, hatching started the day after the eggs were installed in the rearing structure (**Table 12**). Eggs from TB and SE were not mature enough to hatch as they needed more degree-days before starting hatching. Experimental degree-days (EDD) accumulated by these eggs varied between 30°C EDD and 184°C EDD.

Relat	ionships			
Dependant	Explanatory	d.f.	F-statistic	p-value
variable	variables			
Weight	T (in °C)	6	11.17	*
Weight	NDD	6	11.97	*
Weight	Salinity	6	0.35	NS
Weight	T + SR	6	4.91	*
Weight	NDD + SR	6	6.52	*

Table 13: Regression coefficients of linear model between hatchlings weight (g) and environmental parameters (temperature and salinity). NDD is day degree accumulated by eggs; D.f.: Degree of freedom, + is for interaction between the explanatory variables.

\* P < 0.05 ; NS: Not significant

Afterwards, environmental parameters (temperature, salinity and NDD) were tested separately on hatchlings weight (**Table 13**). Temperature and NDD had a significant (p < 0.05) impact on juvenile weight but not salinity residuals (p > 0.05).

# D. Discussion

Due to their shallow depths and terrestrial inputs, coastal ecosystems are characterised by high spatial and temporal variability of environmental factors such as freshwater runoff, levels of irradiance, temperature, water movement and other factors. Coastal spawning sites are influenced by these parameters which could affect spatio-temporal characteristics of eggs (*e.g.* hatching rate) and hatchlings in these ecosystems. This work is a first time comparison of early life history characteristics of English Channel cuttlefish population in different spawning sites distributed at the north and at the south of the population stock area.

### 1. Coastal spawning sites and hatching rate

Spatial and temporal differences in egg cluster characteristics were observed between English Channel study sites. Intertidal habitat in AC (West Cotentin coast) was an important spawning area for cuttlefish with hatching rates that were similar to those found in BS subtidal zone. Successful embryonic development in this particular ecosystem can be due to several reasons. First of all, the clusters were generally found at base of algae that covered eggs at low tide and probably protected them from desiccation. Secondly, the thickness of the egg envelope with its several layers, protected embryonic development until at least stage 26 of Lemaire (1970), from which there is a decrease in thickness till stage 30 (= hatching stage) (Paulij *et al.*, 1991; Lacoue-Labarthe

*et al.*, 2010a). Spawning behavior in AC was probably related to habitat typology characteristics. Indeed, West Cotentin coast maximal tidal range is 50% higher (12 m) than BS (8m). (Lefebvre *et al.*, 2009; Dauvin *et al.*, 2012) and almost four times higher than the English sites (TB and SE; respectively 4 and 4.5 m) (Cope, 2005; Herbert *et al.*, 2007). More eggs were discovered at low tide in AC as the water recedes with greater amplitude. This was probably the reason why eggs were abundant in AC intertidal zone. However, egg abundance in this zone might also indicate that this area has characteristics preferred by females such as egg supports or prey abundance for hatchlings.

Temporal differences were observed in the field for the beginning of the spawning period and in the laboratory with rate and time of hatching. One to two weeks delay was noticed during four years monitoring between the two French sites. Eggs started to be laid around mid-April in AC and at the end of April/ early May in BS. This is in agreement with Boucaud-Camou and Boismery (1991) where these authors observed an earlier arrival of spawners on the west coast. Furthermore, in laboratory experiments, 10 to 20 days delay (in 2010 and 2011) were also seen in first hatchings between French and English sites. This delay has never been described before with English eggs not mature enough when collected during July and had to be incubated in experimental conditions before hatching occurred. This was noted in the NDD where TB degreeday values that were accumulated in the natural environment were less than 300°C. Furthermore, EDD values calculated for English sites were between 77.6°C and 184.3°C which represented respectively 19% and 45% of total amount of degree-days necessary till first hatching. Two hypotheses may be given for this difference between French and English sites. Either the egg laying period in English sites was later than French sites, which induced a delay due to the longer time necessary for eggs to cumulate the degree-days needed, or the lower temperatures in June and July observed in TB caused a longer incubation period. Joyce (2006) reported long temperature series data of the English Channel UK coast and these authors gave mean coastal water temperatures in April that were between  $8.8 \pm 0.7$ °C (Weymouth, south west UK) and  $9.4 \pm$ 1.2°C (Shoreham, south east UK). These temperatures are lower than the ones noted in TB but this site is a small protected bay that can have slightly higher temperatures. Colder coastal waters in April on the UK side could be partly responsible of the shift between French and English coasts and this difference would support the hypothesis of a later egg laying period in English sites. Indeed, S. officinalis is only active above 10°C (Boucaud-Camou and Boismery, 1991) and in this study, eggs

were observed in coastal waters only when water temperature reached 12°C. Results found for English eggs could indicate that the hatching peak on this coast is delayed in comparison to the French one. A July hatching peak (Challier, 2005) probably only occurs in French sites as the delay seen in English sites would indicate a probable hatching peak in august. Cuttlefish spawners would, therefore, arrive in West-Cotentin first around mid April then to Eastern-BS at the end of the same month followed by the English coast in May.

Finally, eggs collected at French sites had different spawning period, at least for one part. Indeed, AC NDD values were always higher than 409°C which meant that eggs collected were probably laid after the 1<sup>st</sup> May. BS values, excepting 2009, were lower than 409°C meaning that at least one part of collected eggs was laid before the 1<sup>st</sup> May as hatching was observed from the beginning without a delay with AC eggs. This parameter does not induce bias in this study as the purpose was to get juveniles that hatched in the same period to be reared in the same time for growth comparison.

Another shift was observed between French and English Coastal spawning habitats that concerned egg hatching. When considering total amount of collected eggs between 2008 and 2011 at each site, the English ones had significantly higher hatching rates than the French ones which indicated also that transportation did not harm the eggs. Several hypotheses could be given to explain these differences. Firstly, spawning period and eggs incubation temperatures affects hatching rates (Bouchaud, 1991). This author studied these two parameters and observed that early laid eggs had lower hatching rates than later ones. Furthermore, eggs incubated between 12°C and 17°C also had higher hatching rates than ones incubated between 17°C and 21°C where hatching rates were between 60 and 75%. Results in the present study are consistent with these descriptions either with temperature or with egg laying period.

Secondly, egg location between subtidal and intertidal in AC affected hatching with higher hatching rate in subtidal area. But to confirm this observation, comparisons between intertidal and subtidal collected eggs must be made at one site within the same year. The comparison between these two habitats in BS did not show significant differences. Moreover, the BS subtidal zone had the lowest hatching rates compared to other sites. Water environmental parameters and quality could be responsible of low hatching rates. BS site is impacted by high river inputs and thus has the lowest salinity in the Channel which affects hatching rate (Dauvin, 2007, 2012; Blanc, 1998). The decrease in salinity is positively correlated with hatching decrease in *S. officinalis* 

(Palmegiano and D'Apote, 1983). Episodes of heavy rainfall and river discharge can increase this salinity effect too. In addition, Seine estuary is highly contaminated by metals, with high levels of Cd, Hg and Ag, in addition to PAHs and PCBs making it one of the most contaminated estuaries in Europe. More recently, significant levels of new contaminants, including antibiotics and estrogens, have been reported (Dauvin *et al.*, 2007 and 2012). Heavy metal affects mechanism of development and also whole developmental and hatching process in many cephalopods such as *Loligo vulgaris* (Halil and Ugur, 2007) and *S. officinalis* (Le Bihan, 2004; Lacoue-Labarthe 2008a, 2009a, 2009b, 2010b). Salinity variations and pollution in BS can thus be responsible for the low hatching rates observed.

Thirdly, food availability and quality experienced during female's reproductive season influences eggs quality. In *S. officinalis*, egg yolk lipids quantity varies with egg size, suggesting that differences in cuttlefish egg quality exist. Furthermore, lipid requirements for correct cephalopod development are not fully understood; however, phospholipids and long-chained polyunsaturated fatty acids, particularly eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), are likely to be essential constituents (Boucaud and Galois, 1990; Navarro and Villanueava, 2000, 2003). The different migration pathways taken by spawners to get to coastal habitats may influence the food availability and quality. Thus, egg quality due to maternal transfer could be a major factor in understanding hatching success.

Fourthly, egg oxygenation is a key factor leading to hatching success (Gutowska and Melzner, 2009) and embryos develop normally when oxygen concentrations are close to saturation (Boletzky *et al.*, 2006). SE site, being completely open to the Channel thereby incurring greater water hydrodynamics, may have a better rate of water oxygenation than TB, BS and AC intertidal zone leading to higher hatching rates. Lastly, there is always the possibility of bias in hatching evaluation even with all precaution taken. Indeed, the French clusters were already ready to hatch when they were collected in contrast with the English ones that needed 10 to 20 days of incubation before starting hatching. In addition, the incubation period in the rearing structures might also have influenced the hatching rate by increasing the successful development of embryos in the final embryonic development phase. But this assumption is very unlikely to have had a major effect. AC hatching rate in 2011 was as high as the English ones even though hatching started from the beginning which indicates that precautions taken in sorting egg clusters were appropriate to hatching comparison.

Finally, an inter-annual variability was also observed in hatching rate in all studied sites. Since the incubation conditions in rearing structures were similar over the four year monitoring, it was unlikely that these variations would be due to experimental bias. These variations were more likely related to environmental and eggs quality variations. Quality evolution between years is due to changes in reserves composition transferred by females (Steer et al, 2004; Leporati *et al.*, 2007) and environmental parameters such as salinity, oxygen and temperature vary between years potentially affecting hatching rates

#### 2. Impact of environmental factors on eggs incubation and hatchlings weight

Looking into correlations between hatchling weight and environmental parameters is a way to understand eggs incubation conditions at spawning grounds. Hatchling weight varied from one spawning site to another with some marked differences mainly between western (AC) and eastern (BS) Cotentin peninsula. According to recent literature, temperature, salinity and oxygen are the major factors that influence the traits of cephalopods early life stages (Guerra *et al.*, 2010). Embryonic development of many cephalopods has been shown to be highly temperature dependent, with eggs generally developing faster in warmer waters (Semmens *et al.*, 2007). An inverse relationship was observed between temperature and embryonic development duration in many cephalopods such as *Sepiola atlantica* (Rodrigues *et al.*, 2011), *Octopus mimus* (Uriarte *et al.*, 2012), *Illew coindetii* (Villanueava *et al.*, 2011) and *S. officinalis* (Lemaire, 1970; Bouchaud and Daguzan, 1989; Dickel, 1997; Blanc, 1998). This development duration was found to be proportional to hatchlings length and weight for cuttlefish and *I. coindetii* (Bouchaud and Daguzan, 1989; Villanueava *et al.*, 2011) but inversely proportional in *O. mimus* (Uriarte *et al.*, 2012).

Seawater salinity affected hatching rate, survival and incubation time in many cephalopods. *L. vulgaris* embryonic development was possible at salinity range between 34 and 37 but was stopped below 31 (Halil, 2004). In *Octopus vulgaris*, abundance was closely related to salinity and mass mortalities were observed with episodes of decreased salinity (Sobrino *et al.*, 2002; Guerra *et al.*, 2010). Blanc (1998) studied the relationship between four different salinities (20, 25, 30 and 35) and *S. officinalis* egg incubation time and hatchling characteristics. This author observed that at the lowest salinities (20 and 25), no hatching occurred and for the two other salinities, significant relationships were found. Salinity of 30 induced longer incubation period for eggs compared to 35 and bigger hatchling weight and mantle length.

Lower temperature and salinity in BS might have affected embryonic development duration period and afterwards hatchling weight. Temperature and salinity data were only studied in the two French sites because of the delay in hatching for TB and in order to avoid any bias on hatchling weight as incubation in rearing structures lasted for 8 days in 2010 and 19 days in 2011 before first hatching occurred. Mean water parameters between April and July in AC were respectively 15.6°C and 34.5 vs 14.6°C and 32.6 in BS. This is due to the fact that hydrologic and oceanographic features are mainly dominated in the Western basin of the English Channel by the influence of Atlantic waters (Dauvin et al., 2012) and in BS by the fresh water inputs of the Seine estuary. Watersheds impacting east coast are four times larger than west Cotentin coast (Lebfevre et al., 2009). In this study, only temperature had a significant (p < 0.05) effect on hatchling weight. Correlation between hatchling weight and water temperature were consistent with authors' descriptions as colder water, in BS site, induced hatchlings that were significantly bigger than in AC site. Larger cuttlefish hatchlings are produced at low temperature due to better yolk absorption (Bouchaud and Daguzan, 1989). But the combined effect of temperature and salinity could be occasional. Indeed, other factors such as rainfall, river discharge, water turbidity, solar flux and photoperiodicity could influence the eggs incubation duration as they will influence water temperature and salinity. Sobrino et al. (2002) found that O. vulgaris abundance was highly correlated with rainfall and river discharge previous to fishing season. S. officinalis, is a migrating species (Boucaud and Boismery, 1991) therefore it is less concerned by coastal environmental conditions. But in its early life history, when eggs are incubating in coastal habitats, episodes of heavy rainfall and river discharge can locally affect their development by affecting salinities and currents. Furthermore, Paulij et al. (1991) studied the influence of photoperiodicity on hatching of S. officinalis. These authors observed that in the absence of an external Light-Dark rhythm, the time to hatching increased. In BS, turbidity is high where the mean annual particulate river discharge has been evaluated at 650 000 t of suspended matter (Dauvin et al., 2007) in contrast with west coast were clarity of water is high (Dauvin et al., 2012). The higher turbidity in BS could then also increase incubation duration.

#### 3. Hatchlings growth and survival

AC and BS hatchlings had always significantly (p < 0.05) different weight at hatching. Challier *et al.* (2005a) have already observed differences in cuttlefish juveniles between the East (BS) and West (AC) Cotentin coast. These authors showed that pre-recruits growth rate differed significantly in

inshore waters between BS and AC. They suggested the possibility of a difference in growth of prerecruits between these areas that may be caused by genetic variation or by environmental differences (such as the variability in rate flow of Seine River) affecting growth rate. Results from this study indicate that local environmental variations had an impact on eggs incubation and were correlated with hatchling characteristics. Indeed, weight distribution observed at hatching was found after 35 days of rearing highlighting the importance of cuttlefish initial weight. The initial weight of hatchlings played a major role in their growth performance and this was also reported by Leporati *et al.* (2007). Differences observed at hatching were thus maintained when juveniles were reared in the same biotic and abiotic conditions. Furthermore, cephalopod growth is exponential during the first part of their life cycle (Koueta and Boucaud-Camou, 2001; Domingues *et al.*, 2006) thus applying a linear model to log transformed weight-at-age data was appropriate.

The use of a linear model in this study was interesting for parallel growth observation between hatchlings from different spawning sites. In addition, no significant differences were observed in growth parameters (IGR, IR and CR) between sites. IR was similar to all batches indicating that food source had no particular effect on one group compared to another. No differences were observed in IGR and in CR too. IGR and CR values were consistent with those found by Koueta and Boucaud-Camou (1999); Domingues *et al.* (2002, 2006) and Sykes *et al.* (2003). However, a decrease in IGR and in CR was observed between 2008 and 2011 that was clearly related to water temperature decreasing. Cephalopods are poikilothermic organisms and react instantly to increased temperatures by raising all metabolic processes, including feeding and growth (Domingues *et al.* 2001). But decreases in IGR and in CR were similar to all batches and thus linear growth was appropriate all along monitoring.

Early life stages of cephalopods are known to be a critical phase and are highly important for the stock renewal. Ecosystem variability affects biological parameters, such as mortality rate, life span, fecundity, maturity and growth and thereby affects models of population dynamics (Challier *et al.*, 2006). In this study survival rates were pretty high, around 90%. Similar rates were found by Koueta and Boucaud-Camou (2001) and Forsythe *et al.* (2002) between 90% and 96.7% survival after 35-40 days of rearing. These high survival rates are due to optimal experimental conditions and standardized parameters. However, lower survival rates were observed in some sites in specific years. Since all juveniles were reared in the same rearing structures and in the same conditions, means that it is unlikely that these mortality rates would be related to rearing

conditions. High mortalities observed for those groups are more likely related to egg quality in those years. Cuttlefish egg quality differs in its size, reserves content, composition and even the number of eggs per clutch (Boucaud and Galois, 1990; Navarro and Villanueava, 2000, 2003) from one year to another and from one site to another. Eggs of lower quality might produce hatchlings that are more easily subject to infections and diseases inducing variation in juvenile survival rates and thus potential site contribution to the recruited cuttlefish stock.

### E. Conclusion

Spawning behavior in AC was different from the other three studied sites as egg clusters were found in subtidal and intertidal zones. This is probably related to habitat typology in AC but the possibility of a choice of a more favorable area cannot be excluded as the highest egg concentration was in the intertidal zone. Afterwards, a delay in spawners arrival and hatching time was noticed between the different sites. Indeed, spawners arrived in AC (West-Cotentin) first around mid April then to BS (East Cotentin) at the end of the same month followed by the English coast in May. The spawners arrival to coastal spawning sites was probably linked to temperature. Furthermore, in July, when eggs were collected, hatching was undergoing for the French sites but not in the English ones. English eggs were not mature enough when collected and had to be incubated in experimental conditions before hatching occurred. These eggs still required between 20% to 45% of total degree-days necessary for hatching to occur when collected early in July. Another shift was observed between French and English Coastal spawning habitats that concerned egg hatching. English eggs had significantly higher hatching rates than the French ones (Table 16). This difference was related to spawning delay and to water incubation temperature, which is markedly different between the two coasts in June and July. But other factors could also be implicated, such as local environmental variations and pollution or yolk quality deposited by females in the eggs.

A parallel growth was seen in four years monitoring between all sites with similar growth parameters (IGR, IR, CR) for all batches within each year. This supports the idea of a single population across these sites with only local environmental variables that are responsible for hatchlings characteristics. Moreover, weight distribution observed at hatching was found after 35 days of rearing highlighting the importance of cuttlefish initial weight (**Table 14**). The initial weight

was found to be related to incubation temperature in the natural environment with larger juveniles obtained when eggs were incubated in colder waters. Finally, juvenile survival rates were high around 90% in all sites except for two episodes of high mortalities that were localised to a specific site and year.

Table 14: Summary of results on hatching rate, growth and survival of cuttlefish *Sepia officinalis* L. in its early life stages in different spawning sites of the English Channel. HR: is the mean hatching rate (%), IGR: is the instantaneous growth rate (% bodyweight/day), WD1 and WD35: are the initial (WD1) and the final (WD35) juvenile weight (g) and SR: is the survival rate (%).

	Incubation time	HR	WD1	IGR	WD35	SR
Differences between sites	*	*	*	NS	*	NS
Differences between years	Nd	*	*	*	*	*
Relationship with temperature	*	Nd	*	*	*	Nd

\* means significant; NS: not significant; Nd: not demonstrated in our study

Early life stages of *S. officinalis* with embryonic and post-embryonic development in spawning grounds are major components of the life cycle as they represent the basis of cuttlefish stock renewal. Spatial and temporal variations in hatching time and rate along with juvenile survival could impact the potential site contribution to the cuttlefish recruited stock and its distribution. Increased knowledge into these patterns can help to better understand inter-annual fluctuations in the stock and to identify critical periods or spawning sites that should be protected to maximize recruitment to the stock.

# Acknowledgements

This work was mainly achieved in the CREC marine research station and was supported by European funding as part of the CRESH INTERREG IV-A project and by the regional fundings of Basse-Normandie. We would like to thank Jehane Lepoittevin for her precious help in the rearing installation and survey. We would like also to thank Dr. Estelle Le Bihan and Hélène Viala from IVAMER society for their advices in the rearing installations. We are very grateful to Dr. Olivier Bazuyaux (SMEL) and Pr. Pascal Claquin (SOMLIT) for the environmental data of the studied sites.

# *III. EFFETS DE LA TEMPERATURE SUR LA CROISSANCE DES PRE-RECRUES.*

# A. Introduction

L'étude des caractéristiques des œufs et des juvéniles de seiche à l'éclosion, (Chapitre 1-II) a permis de mettre en évidence la présence d'une variabilité spatio-temporelle dans le taux d'éclosion des œufs, le poids des juvéniles à l'éclosion ainsi que le taux de survie de ces derniers au cours de certaines années et dans des sites précis. Parmi les paramètres abiotiques du milieu, seul la température a montré un effet significatif sur la période d'incubation des œufs et les caractéristiques des juvéniles à l'éclosion.

Le but de cette étude était de s'intéresser aux pré-recrues dans le milieu naturel pour vérifier la présence ou non de variabilité dans leurs performances de croissance. Cette étude est la continuité de l'approche faite aux premiers stades de vie de la seiche et permet de comprendre comment la variabilité spatio-temporelle des facteurs biotiques et abiotiques peut influencer la croissance des juvéniles.

Pour atteindre cet objectif, des collectes de pré-recrues ont été effectuées sur plusieurs sites de ponte pour la comparaison des poids et l'estimation des taux de croissance. De plus, une approche expérimentale a été réalisée pour illustrer l'impact du facteur température sur les performances de croissance des pré-recrues.

# B. Matériel et méthodes

### 1. Matériel biologique

### Récolte des pré-recrues

Pour étudier les pré-recrues de seiche dans les différents sites de ponte, il a été nécessaire de faire des pêches expérimentales avec des petits chalutiers (12-15 m, maillage utilisé < 80 mm) permettant la capture de juvéniles dans les zones côtières (< 3 milles) de poids inférieur à celui des seiches recrutées (< 100 g). Les échantillonnages ont eu lieu à l'automne, avant la migration des pré-recrues vers le centre de la Manche. Trois aires de ponte ont été étudiées dont deux sur les

côtes françaises [Ouest Cotentin (AC) et Baie de Seine(BS), septembre 2010 et novembre 2011] et une sur les côtes anglaises [Torbay (TB), décembre 2010 et 2011].

Les échantillons collectés sont individualisés dans des sachets puis couverts de glace pilée pour le transport jusqu'au laboratoire. Le poids (g) et la taille (cm) de chaque individu sont mesurés puis les échantillons sont congelés à -80°C pour des analyses biochimiques ultérieures.

# Collecte des œufs pour l'élevage expérimental

Des œufs de seiche ont été collectés sur les deux sites français (AC et BS) en 2011 avec le même protocole que celui décrit précédemment dans le chapitre 1-II-B.2.

# 2. Conditions d'élevage et expérimentation

Les juvéniles utilisés pour cette expérimentation proviennent des mêmes lots (AC et BS) que ceux utilisés pour le suivi de croissance (Chapitre 1-II-B.3) en 2011. Dans chaque lot, 2 groupes de 30 seiches (un duplicat de chaque condition) a été effectué. Les groupes de juvéniles d'AC, qui sont plus petits à l'éclosion (Chapitre 1-II-C.2) que ceux de BS, sont maintenus durant 35 jours d'élevage à une température d'1°C supérieure à ceux des groupes de juvéniles de BS. Cette différence de température correspond à la différence moyenne de température entre les deux sites.

### Système d'élevage et paramètres de l'eau

Les élevages ont été effectués dans un système semi-fermé qui permet de contrôler les paramètres de l'eau des bacs, tout en renouvelant plus de 80% de celle-ci par jour. Pour le système d'élevage, deux grands bacs en PVC (0.80 x 0.60 x 0.25 m) ont été utilisés pour les deux conditions, soit 1 bac pour chaque site (**Figure 13**). Dans chacun des bacs, une sonde thermorégulatrice (Newatt, 25 W) a été installée ainsi qu'une pompe (NJ 400 Aquarium systems), permettant de créer un courant (120 Litres/heure) dans le bac de façon à homogénéiser la température de l'eau. Une arrivée d'eau de mer est filtrée mécaniquement grâce à des filtres en mousse mais aussi biologiquement grâce à la présence de coquilles d'huîtres (développement de bactéries dénitrifiantes) au fond des bacs. Ces bacs ont été préparés une semaine avant l'installation des juvéniles de seiche de façon à stabiliser le système avant l'élevage et de permettre à la flore microbienne de se développer. Deux bacs rectangulaires (0.5 x 0.3 m, 0.2 mm de maillage) ont ensuite été installés dans chacun des bacs en PVC pour le duplicat de chaque site.



Figure 13: Schéma du système d'élevage utilisé pour avoir deux bacs avec les mêmes conditions abiotiques et la température de l'eau comme seul facteur différent. AC : Bac d'Agon Coutainville (température d'élevage :  $20.5 \pm 0.7^{\circ}$ C), BS : Bac de Baie de Seine (température d'élevage :  $19.4 \pm 0.6^{\circ}$ C).

# Aliment utilisé

Des crevettes grises *Crangon crangon* congelées et triées par taille et par poids (Chapitre 1-II-B.3) ont été utilisées pour les élevages. Ceci permet d'éliminer tout biais entre les lots dus à des quantités d'aliments différentes.

# 3. Paramètres de croissance

La quantité d'aliment, non ingérée par les lots de seiche, est pesée quotidiennement et 10 individus par site sont prélevées et pesées chaque semaine pour le suivi de la croissance. Les mesures de poids de seiche et d'aliment non ingéré permettent ensuite la détermination des divers paramètres de croissance. Le TCI (% poids de la seiche/ jour), le taux d'ingestion (TI, % poids de la seiche/ jour) et le taux de conversion (TC, %) ont été calculés comme décrit dans le Chapitre 1-II-B.3).

#### 4. Données de température

Les données de température côtières proviennent des données du SMEL (Agon Coutainville, Ouest Cotentin) et du SOMLIT (Luc sur mer, Baie de Seine) sur la période de juillet à décembre 2010 et 2011. Pour calculer, la moyenne de la température des eaux côtières durant lesquelles les prérecrues se sont développées, nous avons pris l'ensemble des données de température entre le 15 juillet et la date de collecte des pré-recrues. Le 15 juillet correspond à la date où une grande partie des œufs collectés dans le milieu naturel ont éclos en milieu expérimental.

Pour le suivi d'élevage, une sonde de température était installée dans chaque bac et des relevés quotidiens de température étaient effectués. La différence de température entre les deux bacs sur 35 jours d'élevage était de  $1.1 \pm 0.3$ °C. La température moyenne pour le site de BS était de  $19.4 \pm 0.6$ °C et celle d'AC de  $20.5 \pm 0.7$ °C (**Figure 14**).



Figure 14: Suivi quotidien des températures de l'eau des bacs d'élevage. BS : Température du bac des juvéniles provenant de Baie de Seine, AC : Température du bac des juvéniles provenant d'Agon Coutainville.

#### 5. Analyses statistiques

Pour les tests statistiques, les tests préliminaires de normalité et d'homoscédasticité ont permis l'utilisation des méthodes de comparaison paramétriques. Les poids et les paramètres de croissance ont été comparés avec une analyse des variances (ANOVA simple ou à deux facteurs pour la comparaison des sites et des stades) en utilisant le logiciel « R statistical software ». Quand des différences étaient présentes, un test post hoc Tukey a été réalisé pour déterminer les différences entre les groupes (p<0.05).

# C. Résultats

# 1. Caractéristiques des pré-recrues récoltées

Les pré-recrues récoltées début septembre 2010 (**Figure 15A**) en BS (08-09-10) étaient plus petites (p < 0.05) que celles récoltées à AC le 09 septembre et de celles récoltées à TB le 03 décembre 2010. Ces dernières n'étant pas différentes (p > 0.05) de celles d'AC. En 2011 (**Figure 15B**), aucune différence significative (p > 0.05) n'a été observée dans les poids des seiches des trois sites étudiés. La comparaison entre 2010 et 2011 a montré que les poids des pré-recrues de TB (du 03 décembre 2010) n'étaient pas différents (p > 0.05) de ceux des trois sites en 2011.



Figure 15 : Poids (g) des pré-recrues de seiche collectées dans différents sites de ponte en 2010 (Graphe A) et en 2011 (Graphe B). Les sites de ponte étudiés sont : BS : Baie de Seine, AC : Agon Coutainville et TB : Torbay. Les significativités sont étudiées entre sites dans une même année et entre les deux années. Les barres ne portant pas la même lettre sont significativement différentes (p<0.05).

La température côtière moyenne entre le 15 juillet et le 9 septembre 2010 était de 0.7°C supérieure à AC comparativement à BS (**Tableau 15**). En 2011, aucune différence de température n'est mise en évidence entre les deux sites, pour une moyenne de température calculée du 15 juillet au 4 novembre.

Tableau 15: Température moyenne de l'eau côtière (°C) entre le 15 juillet et la date de collecte des prérecrues en 2010 et en 2011. Les sites étudiés sont : BS : Baie de Seine et AC : Agon Coutainville.

Δηρόο		Sites
Annee	BS	AC
2010	18.7±1.3	19.4±0.7
2011	$17.4 \pm 1.8$	$17.4 \pm 1.7$

#### 2. Effets d'un degré de température sur la croissance des juvéniles

Deux lots de juvéniles, dont l'un provient d'AC et l'autre de BS, ont été utilisés pour tester les effets de l'augmentation d'un degré de la température de l'eau d'élevage, sur la croissance des juvéniles d'AC comparativement à ceux de BS (Figures 16A à 16D). Une différence significative (p < 0.05) est à noter entre les deux sites à l'éclosion (Figure 16A) où les nouveaux nés du site de BS sont significativement plus gros que ceux d'AC. Après une semaine d'élevage à une température supérieure d'1°C pour les juvéniles d'AC, cette différence disparaît. On note en même temps une légère diminution des poids des juvéniles provenant de BS à 7 jours post-éclosion et à l'inverse une faible augmentation des poids de ceux d'AC. L'absence de différences significatives (p > 0.05) entre les deux lots se maintient après 14 et 21 jours post-éclosion. Des différences significatives (p < 0.05) apparaissent à partir du 28ème jour où les juvéniles d'AC sont plus gros (p < 0.05) que ceux de BS, ceci se maintient après 35 jours d'élevage. Les taux de croissance instantanés (TCI) sont significativement (p < 0.05) supérieurs pour les juvéniles d'AC à 7 et 14 jours post-éclosion comparés à ceux de BS (Figure 16B). La différence des TCI n'est plus visible ensuite entre les juvéniles des deux sites. Le profil du TCI présente, pour les deux lots étudiés, une augmentation entre 7 et 21 jours post éclosion puis une diminution jusqu'à 35 jours. Le profil des taux d'ingestion (TI) sur l'ensemble de la période d'élevage montre de faibles variations dans les quantités d'aliments ingérées par les juvéniles de seiche, avec des valeurs oscillant entre 10 et 15% du poids des seiches/ jour (Figure 16C).



Figure 16: Suivi des paramètres de croissance de juvéniles de seiche provenant de deux sites différents (BS : Baie de Seine et AC : Agon Coutainville). Les seiches d'AC sont élevées à 1°C de plus que celles de BS pendant 35 jours d'élevage. A- Croissance pondérale des juvéniles, B- Taux de croissance instantané (% poids des seiches/ jour), C- Taux d'ingestion (% poids des seiches/ jour) et D- Taux de conversion des aliments (%). Les barres ne portant pas la même lettre sont significativement différents (p < 0.05).

Cependant, les juvéniles d'AC présentent deux valeurs de TI supérieures (p < 0.05) à celle des juvéniles de BS à 7 et 21 jours post-éclosion. Quant aux taux de conversion des aliments (TC), des différences significatives (p < 0.05) sont observées sur toute la période de suivi, à l'exception du  $14^{eme}$  et du  $28^{eme}$  jour (**Figure 16D**). A 7 jours post éclosion, le TC des juvéniles de BS est inférieur

(p< 0.05) à celui des juvéniles d'AC. Ensuite, à 14 jours, la différence disparaît entre les deux sites puis une inversion dans les TC est observée à 21 jours. A 28 jours post éclosion, la différence disparaît à nouveau entre les deux sites avant de réapparaître à 35 jours.

#### **D.** Discussion

Les pré-recrues d'AC et de BS récoltées dans les sites de ponte côtiers en 2010 et 2011 ont montré une différence importante par rapport aux observations faites en milieu expérimental. En effet, les suivis expérimentaux (Chapitre 1-II) sur plusieurs saisons ont révélé un poids de juvéniles d'AC à l'éclosion significativement inférieur (p < 0.05) à celui des juvéniles de BS. Cette différence de poids est due aux températures d'incubation des œufs dans le milieu naturel (Chapitre 1-II). Avec un taux de croissance similaire, le poids des juvéniles à l'éclosion se maintenait après 35 jours d'élevage en milieu contrôlé. Cependant, dans le milieu naturel, nous avons observé une inversion des rapports de poids chez les pré-recrues de ces deux sites en 2010, et des poids identiques en 2011.

En 2010, la température des eaux côtières à AC était en moyenne de 0.7°C supérieure à celle mesurée en BS. Cette différence de température a probablement induit un taux de croissance supérieur chez les pré-recrues d'AC par rapport à celles de BS. L'augmentation de température s'accompagne d'une augmentation de la croissance des seiches avec un taux de croissance plus important (Domingues *et al.*, 2001 ; Forsythe *et al.*, 2002 ; Grigoriou *et al.*, 2004). En 2011, la température moyenne sur la période de croissance des pré-recrues était identique entre les deux sites ce qui pourrait indiquer une croissance similaire, d'ou l'absence de différences dans les poids des pré-recrues. Toutefois, le poids des juvéniles de BS à l'éclosion est significativement supérieur à celui des juvéniles d'AC (Chapitre 1-II). En ayant une croissance similaire avec des températures moyennes identiques, les pré-recrues de BS auraient due être plus grosses (Leporati *et al.*, 2007 ; Chapitre 1-II). Le fait que les pré-recrues de ces deux sites avaient un poids similaire en 2011 indique donc une croissance légèrement plus importante pour les pré-recrues dans le site d'AC. Ceci serait dû à un autre facteur que la température tel que la qualité des proies du milieu. En effet, la qualité de l'aliment joue sur le taux de croissance des seiches (Domingues *et al.*, 2001 ; Correia *et al.*, 2008).

La variabilité du taux de croissance entre ces deux sites (*i.e.* BS et AC) a déjà été observée par Challier *et al.* (2005a). Ces auteurs ont effectué des échantillonnages de pré-recrues sur les côtes Est et Ouest Cotentin (respectivement, BS et AC) sur deux années (2000 et 2002) et ont noté des différences de taux de croissance chez les pré-recrues. En 2000, le taux de croissance des prérecrues d'AC était supérieur à celui de BS, néanmoins une inversion a lieu en 2002. De plus, le taux de croissance des pré-recrues à AC était stable entre les années mais pas celui des pré-recrues de BS. Cette variabilité est liée aux variations de débit de La Seine qui modifie la température et la salinité de l'eau en BS. Donc la croissance des pré-recrues peut varier entre les deux sites (*i.e.* BS et AC), et le taux de croissance est lié à la température de l'eau mais aussi à d'autres facteurs du milieu tels que la qualité des proies ou la salinité. Quant aux pré-recrues récoltées à TB en décembre 2010 et 2011, le poids des individus n'était pas significativement différent entre les deux années. Ce résultat est intéressant puisqu'il indiquerait une stabilité interannuelle des paramètres de croissance dans ce site.

Nous avons trouvé utile de tester les effets d'une augmentation de la température d'un degré sur la croissance des nouveau-nés d'AC comparativement à ceux de BS. Partant d'un poids à éclosion pour les juvéniles d'AC significativement (p < 0.05) inférieur à celui des juvéniles de BS, nous avons observé une disparition des différences à partir du 7<sup>ème</sup> jour post-éclosion puis une inversion significative des rapports de poids à partir du 28<sup>ème</sup> jour post-éclosion entre les deux sites. Donc un degré de différence dans la température de l'eau peut avoir un effet significatif sur la croissance des juvéniles et ce, dès la fin du premier mois post-éclosion. Cette différence de croissance se traduit par des paramètres qui diffèrent entre les sites. La moyenne du TCI sur 35 jours d'élevage à AC était 1,3 fois supérieur à celui de BS (respectivement, 7.2 ± 0.03 et 5.4 ± 0.22 (% poids seiche/jour)). Ce TCI différent est la résultante d'un TI 1,2 fois supérieur à AC par rapport à BS (respectivement, 13.3 ± 0.14 et 11.8 ± 0.03 % poids seiche/jour) et d'un TC 1,3 fois plus important à AC qu'à BS (respectivement, 8.7 ± 0.42 et 6.9 ± 0.17 %). Forsythe et al. (2002) ont testé l'effet de deux températures (17 et 25°C) sur les paramètres de croissance et ont trouvé des TCI (respectivement 3.5 et 8.4 % poids seiche/jour) et TI (respectivement 8.9 et 21.4 % poids seiche/jour) proches des nôtres. Avec 8°C de différence entre les deux conditions, ces auteurs enregistrent une augmentation d'un facteur 2,5 alors que nous notons un facteur 1,3 avec seulement un degré de différence. Ceci peut être dû à la tranche de température étudiée. En effet, Grigoriou et al. (2004) ont testé aussi deux températures différentes (11 et 19°C) avec 8°C de

différence mais enregistrent un facteur (x 5) du TCI et un facteur (x 3) du TI entre les deux conditions. La moyenne des paramètres de croissance expérimentaux, sur 35 jours post-éclosion, nous a permis d'expliquer l'inversion des poids des pré-recrues observés en 2010. Les résultats expérimentaux confirment l'étroite relation entre la température du milieu et la croissance des pré-recrues.

L'étude détaillée des paramètres de croissance expérimentaux (par semaine), permet de relever des points intéressants, notamment les différences entre les deux sites au 7<sup>ème</sup> et au 21<sup>ème</sup> jour post éclosion. En effet, au 7<sup>ème</sup> jour post-éclosion, le TCI et le TC calculés pour les juvéniles d'AC sont respectivement 20 et 15 fois supérieurs à ceux trouvés pour les juvéniles de BS. Cette différence est due en partie à la température et au fait que le TI des juvéniles d'AC soit significativement supérieur. Mais la différence entre les deux sites pour le TI n'est que d'un facteur (x 1,2), ce qui n'explique pas les facteurs 15 à 20 fois supérieurs. Dans les premiers jours postéclosion, les juvéniles finissent de digérer leur vitellus interne et commencent en parallèle l'alimentation exogène (Boucaud-Camou et al., 1985 ; Boucher-Rodoni et al., 1987). La différence dans le TCI et le TC entre les deux sites peut être une résultante d'une variation dans la qualité ou la quantité de vitellus interne, qui cumulée avec le début de l'alimentation exogène peut induire des différences plus importantes entre les sites. De même, au 21<sup>ème</sup> jour post-éclosion, on observe un TI significativement (p < 0.05) supérieur chez les juvéniles d'AC en comparaison à BS, et en même temps, un TCI équivalent entre les deux sites, voir légèrement supérieur pour BS. Par conséquent, un TC significativement (p < 0.05) supérieur pour les juvéniles de BS comparé à ceux d'AC. Donc même avec un métabolisme accéléré pour AC avec une température d'élevage supérieure d'un degré, de meilleures performances sont observées chez les juvéniles de BS au 21<sup>ème</sup> jour post-éclosion. Ceci pourrait refléter des performances physiologiques qui varient entre les sites.

Au cours du premier mois post-éclosion, le système digestif mature (Yim et Boucaud-Camou, 1980). Le début de l'alimentation exogène déclenche la maturation des cellules digestives et notamment la synthèse des « boules » (vésicules protéiniques contenant des enzymes digestives) (Yim et Boucaud-Camou, 1980). La digestion, initialement à prédominance intracellulaire acide devient extracellulaire alcaline après un mois de maturation de la glande digestive (Perrin *et al.,* 2004). La différence au 21<sup>ème</sup> jour entre les deux sites peut être une résultante de cette maturation qui se ferait plus rapidement chez les juvéniles de BS par rapport à ceux d'AC dans la

première phase du développement jusqu'à 21 jours post-éclosion. Nous relevons que le TC des juvéniles d'AC est significativement (p< 0.05) supérieur à l'éclosion par rapport à celui de BS. Mais entre 7 et 21 jours, on va avoir une inversion entre les deux sites dans le TC, avec perte de significativité après 14 jours et inversion significative (p < 0.05) au  $21^{\text{ème}}$  jour.

# E. Conclusion

La croissance des pré-recrues varie selon les sites et les années. Ces variations sont liées aux paramètres environnementaux avec un impact important de la température de l'eau dans laquelle les juvéniles vivent. La comparaison des poids des deux sites français (AC et BS) a montré une étroite relation entre la distribution des poids observés et la température de l'eau. Une augmentation de température induit une augmentation du taux de croissance. Pour pouvoir estimer l'impact de 0.7°C de différence moyenne entre les deux sites (moyenne température en 2010) sur la croissance des pré-recrues, nous avons mené une approche expérimentale avec des nouveau-nés d'AC et BS, élevés avec 1°C de différence. Cette approche nous a permis de constater qu'un degré de différence induit une inversion des rapports de poids dès la fin du premier mois post-éclosion. Cette inversion est la résultante, d'une part du métabolisme accéléré avec la hausse de température, illustrée par l'augmentation du TCI, du TI et du TC, et d'autre part en raison des performances physiologiques qui diffèrent chez les nouveau-nés et qui résultent des conditions d'incubation des œufs dans les sites. En effet, la maturation du système digestif des juvéniles de BS se ferait plus rapidement, au premier mois post-éclosion, que ceux du site d'AC. Cette dernière constatation a pu être relevée grâce à l'approche expérimentale et doit être confirmée avec l'étude de la maturation du système digestif des nouveau-nés en fonction de leur site de provenance.

# **IV.** CONCLUSION

Ces études ont mis en évidence des variations spatio-temporelles des caractéristiques des premiers stades de vie de la seiche en Manche.

Dans les œufs, une différence est marquée au niveau des taux d'éclosion entre les côtes françaises et anglaises. Les pourcentages d'éclosion sont significativement supérieurs sur les côtes anglaises (**Figure 17**). Mais un décalage est observé entre les deux côtes dans la période d'éclosion, avec des éclosions plus tardives pour les sites anglais. Ce décalage est d'une part, lié à la température d'incubation des œufs qui est plus faible dans les sites anglais durant la période d'incubation. Les œufs dans les sites anglais ont besoin donc de plus de temps pour atteindre le nombre de degrés jours nécessaire pour les éclosions. Et d'autre part, ce décalage peut être dû à un décalage de la période de ponte (arrivée des femelles à la côte), entre les côtes françaises et anglaises. Ceci est observé entre les deux sites français où les pontes commencent en premier à AC avec 1 ou 2 semaines d'avance par rapport à BS.

Chez les nouveau-nés, une distribution de poids stable est remarquée au niveau des deux sites français et une distribution variable pour les sites anglais. En effet, sur quatre années de suivi pour les sites français, quelque soit la zone de récolte des œufs (intertidal/subtidal), les juvéniles à éclosion de BS (0.24g en moyenne sur les années de suivi) sont significativement plus gros que ceux d'AC (0.20 g). Au niveau des côtes anglaises, la distribution des poids est similaire entre les deux sites (TB et SE, 0.22 g en moyenne à éclosion) mais variable par rapport aux sites français. Les poids des juvéniles de TB et SE sont intermédiaires à ceux de BS et d'AC en 2009 et en 2010 et supérieurs en 2011. Ces distributions de poids à l'éclosion se sont révélées importantes pour la compréhension des poids après 35 jours d'élevage en milieu expérimental, dans les mêmes conditions biotiques et abiotiques. Car n'ayant pas de différences dans les performances de croissance, ces distributions sont retrouvées après 35 jours d'élevage. En se basant sur ces résultats et ceux de la littérature, ces différences auraient pu être retrouvées jusqu'à l'âge adulte si les juvéniles sont maintenus dans les mêmes conditions d'élevage. Une telle variabilité observée dans le milieu naturel se traduirait par une entrée plus rapide des pré-recrues de BS dans le stock de seiche en Manche suivi par celles des deux sites anglais (ou inversement selon les années et la distribution des poids à l'éclosion) et enfin par les pré-recrues d'AC.



Figure17: Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus sur les variations spatio-temporelles des caractéristiques des œufs et des juvéniles de seiche en Manche.

La croissance des pré-recrues était variable spatialement (entre BS et AC) et temporellement (entre 2010 et 2011) (**Figure 17**). La distribution des poids observée en milieu expérimental s'inverse en milieu naturel avec les pré-recrues d'AC étant similaires à celles de BS ou significativement plus grosses. Le site d'AC fournirait donc des conditions de croissance plus favorables pour les pré-recrues. De meilleures performances de croissance dans ce site induit un recrutement plus rapide des pré-recrues d'AC. Toutefois, il faut augmenter le nombre d'échantillonnage et le nombre d'années de suivi des pré-recrues dans les différents sites. Ceci permettra de confirmer nos observations sur un recrutement plus tôt des pré-recrues d'AC comparé à celles de BS et de pouvoir aussi les comparer avec les pré-recrues des sites anglais.

# CHAPITRE 2 :

# Etude du système digestif et de sa maturation chez *Sepia officinalis*
#### I. INTRODUCTION

#### A. Les organes digestifs chez Sepia officinalis

#### 1. Anatomie de l'appareil digestif de la seiche



Figure 18: Anatomie de l'appareil digestif de la seiche, *Sepia officinalis* L. AGD : Appendice de la glande digestive, C : Caecum, E : Estomac, GD : Glande digestive, GSP : Glandes salivaires postérieures, I : Intestin, MB : Masse buccale, OE : Œsophage. (Photo personnelle et figure d'après Bidder, 1966).

Chez les céphalopodes, le tractus digestif est en forme de U. La branche descendante (ou partie antérieure de l'appareil digestif) inclue l'œsophage, la glande digestive et l'estomac alors que la branche ascendante (ou partie postérieure de l'appareil digestif) regroupe le caecum et l'intestin (Boucaud-Camou et Boucher-Rodoni, 1983) (**Figure 18**). Chez la seiche, la première partie de l'appareil digestif est constituée par la masse buccale qui se trouve à l'intérieur du cercle formé par les bras. Le ganglion buccal et les glandes salivaires antérieures sont plus ou moins intégrés dans la masse buccale. De ce complexe part ensuite l'œsophage, long et mince, qui traverse le crâne cartilagineux et le système nerveux central, puis passe dorsalement entre les deux lobes de la glande digestive et débouche sur l'estomac. A la suite de l'estomac se trouve le caecum spiral, les appendices de la glande digestive, puis l'intestin qui s'ouvre par l'anus dans la cavité palléale. Les appendices de la glande digestive relient la glande au caecum et à l'intestin. Enfin, les glandes salivaires postérieures, qui déversent leurs sécrétions dans la masse buccale, sont situées dorsalement juste à la base du crâne, contre la glande digestive (Boucaud-Camou, 1973 ; Boucaud-Camou et Boucher-Rodoni, 1983).

#### 2. Les étapes de la digestion

La digestion débute dès le bulbe buccal qui sert à déchiqueter les proies mécaniquement mais aussi à l'aide d'enzymes sécrétées par les glandes salivaires postérieures. La nourriture transite ensuite par l'œsophage vers l'estomac. Les débris non digérables sont directement évacués vers l'intestin. L'estomac, très musculeux, continue de broyer les aliments qui, de plus, subissent l'action des enzymes massivement sécrétées par la glande digestive (digestion extracellulaire). L'absorption des petites molécules se déroule ensuite dans la glande digestive, les appendices de la glande digestive et le caecum. Quant aux grosses molécules, ces dernières sont capturées par pinocytose au niveau des cellules de la glande digestive puis sont digérées de manière intracellulaire sous forme d'hétérophagosomes. Pour cela, une partie du liquide nutritif contenu dans le caecum remonte vers les appendices de la glande digestive et vers la glande digestive grâce à un système de sphincters. Les résidus issus de la digestion intracellulaire forment des corps bruns qui sont évacués ensuite par l'intestin (Boucaud-Camou et Boucher-Rodoni, 1983).

#### 3. La glande digestive: organe clé du système digestif

La glande digestive est composée de tubules glandulaires dont les plus larges se terminent dans de larges lumières qui débouchent ensuite dans les conduits digestifs. Les tubules sont formés par un épithélium glandulaire unistratifié qui se trouve sur une gaine mince richement vascularisée et innervée de tissus musculaires et conjonctifs (Boucaud-Camou et Boucher-Rodoni, 1983). La glande digestive chez la seiche, et plus généralement chez les céphalopodes, joue un rôle important dans les processus digestifs tels que la production de la plupart des enzymes digestives ainsi que le stockage de nutriments et de lipides (Boucaud-Camou et Roper, 1995 ; Martinez *et al.*, 2011). Les secrétions d'enzymes et le stockage sont assurés par les cellules digestives formant l'épithélium glandulaire des tubules. Ces cellules assurent donc plusieurs fonctions et leur aspect est différent selon le stade de maturation ou de digestion de la seiche (**Figure 19**). Ainsi, une seule et même cellule, assure les fonctions de synthèse et de sécrétion d'enzyme, mise en réserve de lipides, ainsi que d'absorption, digestion et d'excrétion (Boucaud-Camou et Boucher-Rodoni, 1983) Chez *Sepia officinalis*, on retrouve quatre variantes issues d'un seul type de cellule digestive (**Figure 19**).



Figure 19: Types morphologiques de la cellule digestive de *Sepia officinalis* (Yim et Boucaud-Camou, 1980). Les flèches indiquent le passage d'un type de cellule à un autre.

Ces quatre variantes peuvent être subdivisées en deux catégories de cellules :

- Les Cellules « jeunes » : qui ne présentent pas d'inclusions et regroupent donc les cellules immatures, les cellules élaboratrices et les cellules au repos ((Figure 19).
- Les cellules à « boules » : qui sont caractérisées par leurs inclusions « boules » (Figure 19 et 20). Ce sont des inclusions protéiniques des cellules digestives caractérisant la plupart des céphalopodes (Boucaud-Camou et al., 1985).

Dans cette dernière catégorie cellulaire, on distingue différentes évolutions cellulaires qui marquent les phases de la digestion et témoignent des différentes étapes physiologiques. Après développement de la cellule élaboratrice où s'effectue la synthèse des « boules », la <u>cellule à boule « sécrétrice »</u> (Figure 20) se caractérise par de nombreuses boules volumineuses dont le produit est évacué dans la lumière des tubules. Ensuite, cette cellule « sécrétrice » évolue en une <u>cellule « absorbante</u> » (Figure 20) marquée par de gros hétérophagosomes (vacuoles digestives) et de petites boules moins nombreuses puis apparaît progressivement le stade final des <u>cellules</u> « <u>excrétrices »</u> (Figure 20) avec la formation des corps bruns et leur libération dans la lumière des tubules (Yim, 1978 ; Boucher-Rodoni, 1981 ; Perrin, 2004). La présence de boules peut donc être observée dans les différentes phases de la cellule digestive. (Boucher-Rodoni, 1981).

#### B. Les enzymes digestives chez la seiche

#### 1. Nature et action des enzymes digestives

La majeure partie des enzymes digestives chez la seiche est de nature protéolytique: trypsine, chymotrypsine, protéases totales acides (Boucaud-Camou, 1974; Mangold, 1989a). Ces peptidases sont des enzymes qui brisent les liaisons peptidiques des protéines et assurent donc l'hydrolyse de ces molécules en petits peptides (Boucaud-Camou, 1973). Ces activités sont primordiales chez la seiche, et plus largement chez les céphalopodes, qui ont un métabolisme basé sur les protéines et acides aminés (O'Dor et Wells, 1987; Lee, 1994; Villanueva *et al.*, 2002). Des activités non protéolytiques sont également présentes comme celles d'amylases (enzymes hydrolysant les polysaccharides), de lipases, d'estérases, de phosphatases acides et alcalines (Boucaud-Camou, 1974). Les lipases et les estérases sont des enzymes capables d'hydrolyser des fonctions esters avec une action plus spécifique pour les lipases en ciblant les lipides. Quant aux

phosphatases acides et alcalines, ces dernières catalysent l'hydrolyse de liaisons esters en retirant des groupements phosphates (déphosphorylation) de nombreuses molécules.



Figure 20: Les différentes phases de digestion ou étapes physiologiques des cellules à « boules » de la glande digestive de *Sepia officinalis* L. (d'après Boucaud-Camou et Boucher-Rodoni, 1983). <u>Cellules sécrétrices</u> : exocytose, élimination des boules ; <u>Cellules absorbantes</u> : endocytose, formation des hétérophagosomes ; <u>Cellules excrétrices</u> : formation du "corps brun". (Photos personnelles, objectif x 40 et x 100, coloration au trichrome de Prenant-Gabe)

#### 2. Localisation de ces enzymes dans les principaux organes digestifs

La glande digestive est la plus importante source d'enzymes digestives chez Sepia officinalis en tant qu'organe principal de synthèse mais aussi d'absorption (Boucaud-Camou et al., 1985). Cet organe concentre à lui seul 65% de l'activité trypsine, 20 % de l'activité de la chymotrypsine, 64% des activités protéasiques totales acides et 20% des phosphatases acides (Tableau 16) comparé aux autres organes du système digestif (*i.e.* oesophage, glandes salivaires postérieures, appendice de la glande digestive, caecum, estomac, intestin) (Perrin, 2004). La glande digestive est principalement responsable de la digestion dans l'estomac et dans le caecum. L'activité protéolytique, prédominante dans cet organe, est due essentiellement à des enzymes de type cathepsine et trypsine dont les « boules » seraient le principal support. Les activités de type trypsique et chymotrypsique sont sécrétées (digestion extracellulaire) alors que les cathepsines, reflètent la digestion intracellulaire (Boucaud-Camou et Yim, 1980). Ce processus ancestral de digestion intracellulaire, comme chez d'autres mollusques, est maintenu dans la glande digestive chez Sepia officinalis (Boucaud-Camou et Boucher-Rodoni, 1983). La glande digestive sécrète aussi des amylases et des lipases et se révèle riche en autres enzymes lytiques telles que les estérases et les phosphatases acides et alcalines (Boucaud-Camou, 1974). La phosphatase alcaline a une localisation préférentielle aux zones de transfert de molécules. Cette enzyme est décelée au niveau de la bordure en brosse de la glande (Boucaud-Camou, 1973). La phosphatase acide quant à elle, est une enzyme caractéristique des lysosomes (Boucaud-Camou, 1973) et sa répartition est ubiquiste dans les différents organes du système digestif (Tableau 16).

Tableau 16 : Localisation des activités de la trypsine, chymotrypsine, protéases totales acides etphosphatases acides dans les différents organes du système digestif de la seiche (D'après Perrin, 2004).AGD : Appendices de la glande digestive, GD : Glande digestive, GSP : Glandes salivaires postérieures.

	Organes digestifs						
Activités enzymatiques	Œsophage	GSP	GD	AGD	Caecum	Estomac	Intestin
Trypsine	< 5	16	65	7	< 5	< 5	5
Chymotrypsine	5	56	20	8	1	5	5
Protéases totales acides	< 5	10	64	10	<5	< 5	9
Phosphatases acides	12	10	19	19	14	10	16

Perrin (2004) a montré que la glande salivaire postérieure (GSP) joue aussi un rôle important puisque cet organe concentre 56% de l'activité chymotrypsine totale. Ces enzymes interviennent dès la capture des proies grâce aux sécrétions de la GSP. Quant aux <u>appendices de la glande</u> <u>digestive</u> (pancréas), elles ne manifestent que de très faibles activités amylasiques et protéolytiques (7% trypsine, 8% chymotrypsine et 10% protéases totales acides). Leur rôle dans la sécrétion d'enzymes digestives est négligeable à côté de celui de la glande, surtout en prenant en compte les masses respectives des deux organes. Les phosphatases acides et alcalines sont présentes surtout au niveau de l'épithélium interne de cet organe. Finalement, des activités enzymatiques sont aussi retrouvées au niveau de l<u>'œsophage</u> et de l'<u>intestin</u> (Tableau 16).

## C. Maturation de la glande digestive chez les juvéniles de seiche au premier mois post-éclosion

A l'éclosion, les seiches juvéniles sont des adultes en miniature (Mangold, 1989a). Cependant, certaines fonctions ne sont pas encore pleinement matures. Le système nerveux n'est pas complètement développé comme le montre Dickel *et al.* (2001) 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). Quant à la glande digestive, elle est à l'éclosion très différente de celle de l'adulte : complètement incolore, elle se présente sous forme de deux petites masses de tubules glandulaires situées contre le volumineux sac vitellin interne (**Figure 21**). Les cellules glandulaires qui les composent sont toutes semblables et d'un seul type (Yim, 1978).

La digestion du vitellus interne se fait dans les premiers jours post-éclosion (Boucher-Rodoni *et al.,* 1987). Cette digestion s'effectue via l'absorption du vitellus par les cellules digestives en formation puis par une digestion intracellulaire par le système endolysozymal (Van Meel et Klumperman, 2008 ; Martinez *et al.,* 2011). Pendant la phase post-embryonnaire qui commence au premier repas, les modes de nutrition embryonnaire (digestion intracellulaire du vitellus) et post-embryonnaire (capture de petits crustacés et digestion extracellulaire dans le tractus digestif) vont coexister.



Figure 21: Coupe longitudinale de la glande digestive de *Sepia officinalis* L. à l'éclosion (objectif x4, coloration trichrome de Prenant-Gabe). SV : Sac vitellin interne, TG : Tubules glandulaires.

La maturation du système digestif s'initie ainsi avec la première prise de nourriture. Les cellules digestives se multiplient et commencent à assurer une digestion extracellulaire en sécrétant des enzymes. Le lancement de l'activité sécrétrice de la glande digestive s'accompagne de l'apparition des « boules », dans le cytoplasme des cellules digestives, et des sécrétions, dans la lumière des tubules glandulaires (Boucaud-Camou *et al.*, 1985). Peu à peu, la digestion initialement à prédominance intracellulaire, devient à prédominance extracellulaire avec la maturation de la glande digestive et l'apparition de plusieurs types cellulaires (Boucaud-Camou *et al.*, 1985). La digestion intracellulaire est assurée par des enzymes agissant en milieu acide, et la digestion extracellulaire par des enzymes alcalines (Perrin, 2004). Les travaux effectués par Yim et Boucaud-Camou (1980) ainsi que Boucaud-Camou *et al.* (1985) ont permis ainsi de caractériser trois phases dans la vie de la seiche au premier mois post-éclosion (**Figure 22**). Pendant la phase embryonnaire, la nutrition se fait uniquement aux dépends du vitellus, digéré grâce à l'activité enzymatique intracellulaire du syncytium vitellin. Cette digestion est assurée essentiellement par les enzymes

lysozymales acides telles que les phosphatases acides qui présentent une très forte réaction positive au niveau du syncytium (Boucaud-Camou, 1982).



Figure 22: Croissance, alimentation et maturation du système digestif chez les jeunes seiches, *Sepia officinalis* L., aux premiers stades post-éclosion. Les courbes de croissance linéaires et pondérales sont issues de données personnelles de suivi de croissance et chaque point représente une moyenne ± SD sur 24 individus. A- Etat de la glande digestive, B- Mode de digestion, C- Alimentation et D- Phases de la vie (Schéma récapitulatif d'après Boucaud-Camou *et al.*, 1985 ; Perrin (2004)).

La différenciation progressive de la glande digestive est en relation étroite avec l'alimentation exogène. Le passage à la phase juvénile-adulte se caractérise par un changement de régime

alimentaire (proies plus variées), l'acquisition d'une pigmentation et d'une physiologie « adultes » de la glande digestive. Enfin, à la fin du premier mois de vie post-éclosion, la glande digestive présente la même couleur, la même structure histologique et histophysiologique que celle des adultes (Yim et Boucaud-Camou, 1980). On retrouve ainsi, à l'âge d'un mois, les quatre variantes de la cellule digestive mâture, décrite précédemment (Boucher-Rodoni, 1982). Au niveau enzymatique, la maturation de la glande digestive se traduit par une forte activité enzymatique acide (intracellulaire) aux premiers jours post-éclosion. Cette activité diminue ensuite jusqu'au 30<sup>ème</sup> jour (**Figure 22**). Parallèlement, les activités enzymatiques alcalines se mettent en place. Ces activités augmentent alors progressivement avec la maturation du système digesti (Perrin, 2004).

#### D. But de l'étude

La maturation de la glande digestive, au premier mois post-éclosion, est une étape clé dans la digestion, la survie et la croissance des juvéniles (Perrin, 2004). Les conditions d'incubation dans les zones de pontes côtières influencent le développement embryonnaire (Chapitre 1-II). L'étude de l'évolution d'un système digestif, et plus particulièrement d'une glande digestive immature à l'éclosion, à une glande digestive mature après un mois post-éclosion, est donc essentielle pour la compréhension des caractéristiques physiologiques des juvéniles de seiche dont les œufs ont été incubés dans les différents sites côtiers. Le but de cette étude est d'évaluer la maturation du système digestif des juvéniles de seiche en fonction de leur site de provenance tout en décrivant les profils des activités enzymatiques digestives, en relation avec les observations histologiques de la glande digestive, au cours de ces étapes clés.

Ce chapitre s'articulera autour de deux axes :

- La description de la maturation de la glande digestive de juvéniles de seiche provenant de différentes aires de ponte en Manche au moyen d'outils biochimiques et histologiques.
  (Cette partie faisant l'objet d'une publication soumise dans *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*)
- L'étude comparative des activités enzymatiques digestives des œufs et des pré-recrues de seiche récoltés dans différentes zones de ponte côtières.

### *II. ETUDE DE LA MATURATION DE LA GLANDE DIGESTIVE DE JUVENILES DE SEICHE, SEPIA OFFICINALIS, PROVENANT DE DIFFERENTS SITES DE PONTE AVEC DES OUTILS BIOCHIMIQUES ET HISTOLOGIQUES*

#### <u>Résumé:</u>

La glande digestive des juvéniles de seiche mature au cours du premier mois post-éclosion au cours duquel la digestion, initialement à prédominance intracellulaire acide, évolue en digestion à prédominance extracellulaire alcaline. Les activités enzymatiques digestives changent au cours de cette période en lien avec le développement de nouveaux tissus et la croissance. Le but de cette étude était de voir si les différentes conditions d'incubation des œufs dans les quatre sites de ponte étudiés pouvaient induire des différences dans la maturation du système digestif des nouveau-nés, en utilisant des outils enzymatiques corrélés à des observations histologiques de la glande digestive.

Un élevage expérimental a été effectué sur 35 jours post-éclosion (DAH) avec 150 juvéniles/site à partir d'œufs collectés dans les différents sites en 2010 et 2011. Quatre activités enzymatiques [*i.e.* trypsine, cathepsine, phosphatases acides (ACP) et alcalines (ALP)] et deux ratios (trypsine/cathepsine et ALP/ACP) ont été étudiés. De plus, des observations histologiques des caractéristiques de la glande digestive ont été faites à l'éclosion (réserves de vitellus interne, développement de la glande digestive, rapports nucleoplasmiques) et sur 35 jours (taille des cellules et nombre moyen de « boules » par cellule).

Au cours de la première phase de transition de la digestion « embryonnaire » vers la digestion « post-embryonnaire » (0 à 7 DAH), le vitellus interne s'est avéré être le facteur le plus important pour la compréhension de la variabilité des activités enzymatiques et de la faible croissance des juvéniles au cours de cette première semaine post-éclosion. Ces réserves sont fortement corrélées aux activités enzymatiques acides (*i.e.* cathepsine et ACP) qui peuvent donc être considérées comme de bons marqueurs de la maturation de la glande au cours de cette première phase. Les ratios enzymatiques sont, quant à eux, corrélés au développement de la glande digestive à l'éclosion (développement estimé en pourcentage de surface de glande sur la surface totale de glande avec vitellus interne).

Ces ratios ont révélé, durant la deuxième phase de transition de la digestion « postembryonnaire » vers la digestion « juvénile-adulte » (7 à 35 DAH), les avantages pris par certains lots par rapport aux autres dans la rapidité de la mise en place de la digestion alcaline (surtout marquée à 7 et 14 DAH). Celle-ci est le reflet d'une maturation plus rapide du système digestif. Le modèle « ratios enzymatiques » reflète l'équilibre entre les deux modes de digestion (extracellulaire alcaline/intracellulaire acide) pendant le premier mois post-éclosion. Ces ratios sont corrélés aux caractéristiques histologiques (évolution de la taille des cellules et du nombre moyen de « boules » par cellule) qui sont révélatrices de la maturation de la glande digestive.

Les résultats de cette étude ont permis de mettre en évidence une variabilité spatiale et temporelle de la maturation de la glande digestive chez les juvéniles de seiche. 1- La variabilité spatiale de la maturation est en lien avec le site d'origine des œufs. La maturation la plus lente a ainsi été observée pour des juvéniles issus d'œufs récoltés à Agon Coutainville (France), suivis des juvéniles des deux sites anglais (Torbay et Selsey) puis de ceux du site de Baie de Seine (France) ayant la maturation la plus rapide. 2- La variabilité temporelle a été remarquée entre 2010 et 2011, pour l'ensemble des sites. La maturation de la glande digestive est plus lente chez les juvéniles suivis en 2011 par rapport à ceux de 2010. Cette plus faible maturation s'est traduite par des modifications au niveau des profils enzymatiques et par une diminution des taux de croissance entre les deux années. 3- Ce travail a aussi permis d'affiner les descriptions des phénomènes en cours pendant la maturation du système digestif tant au niveau des activités enzymatiques digestives qu'au niveau histologique.

# THE DIGESTIVE GLAND MATURATION IN JUVENILE CUTTLEFISH, *SEPIA OFFICINALIS* L., FROM DIFFERENT SPAWNING LOCATIONS ASSESSED WITH BIOCHEMICAL AND HISTOLOGICAL TOOLS.

Safi G.\*<sup>1,2,3</sup>, Le Pabic C.<sup>1,2,3</sup>, Martinez A.S.<sup>1,2,3</sup>, Le Bihan E.<sup>4</sup>, Robin, J.P.<sup>1,2,3</sup>, Koueta N.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Normandie Univ, France

<sup>2</sup> UCBN, BIOMEA, F-14032, France

<sup>3</sup> CNRS INEE, FRE3484, F-14032 Caen, France

<sup>4</sup> Société IVAMER, 32 rue Fragonard, 14220 Thury Harcourt, France

\*Corresponding author:

Georges Safi: tel.: (33) 231565295; fax: (33) 231565346; georges.safi@unicaen.fr,

safigeorges@hotmail.fr

#### Abstract

In Sepia officinalis hatchlings the digestive gland matures during the first month post-hatching while a shift from intracellular acid to extracellular alkaline digestion is observed. Digestive enzyme activities change during this period as a consequence of growth and development of new organs and tissues. The purpose of this study was to investigate whether different egg incubation conditions in various spawning sites could induce differences in hatchling digestive system maturation by using detailed description of digestive enzyme profiles correlated to histological observations. An experimental rearing was conducted over 35 days after hatching (DAH) on 150 hatchlings /site from wild eggs that were incubated in four different spawning sites in 2010 and 2011. Four digestive enzymes activities [i.e. trypsin, cathepsin, acid (ACP) and alkaline (ALP) phosphatase] and two enzyme ratios (ALP/ACP and trypsin/cathepsin) were studied along with histological observations of the digestive gland maturing [*i.e.* internal yolk surface (IYS), digestive gland development (DGD), nucleoplasmic ratio, digestive cell length (CL) and mean number of "balls" per cell (NBC)]. During the first "no net growth" phase (0 to 7 DAH), IYS proved to be an important factor in understanding the variability in growth between cuttlefish groups. This phase was dependent of the egg incubation conditions in the various sites that induced differences in hatchlings characteristics. IYS was highly correlated to intracellular enzyme activities (*i.e.* cathepsin and ACP) which can be considered as good indicators of early digestive gland maturation. ALP/ACP and trypsin/cathepsin ratios were correlated to DGD at 0 DAH and these enzyme ratios revealed afterwards, from 7 up to 35 DAH, the advantages taken by some batches in the faster establishment of the extracellular alkaline digestion *i.e.* the faster maturation of the digestive system. The enzyme ratio model took into account the balance that is made between the two digesting ways (intracellular and extracellular digestion) during the first month post-hatching. These ratios were correlated to histological features (i.e. CL and NBC) that characterize the digestive gland maturation. Intracellular digestive enzymes and enzyme ratios were thus good indicators for digestive gland maturation comparison between different cuttlefish batches and for the description of the digestive process in progress during early life history of cuttlefish.

#### A. Introduction

From a metabolic point of view, one of the most apparent differences between cephalopods and other marine organisms is high-protein content (75-85% of dry weight) due to the predominance of their amino acid metabolism (O'Dor and Wells, 1987, Lee, 1994, Villanueva et al., 2002). Cephalopods are a highly developed group of marine molluscs with physiological characteristics similar to those of fish, with the extracellular digestion in the stomach, while keeping some characteristic features of their molluscan ancestry, with the intracellular digestion (Boucaud-Camou and Yim, 1980, O'Dor and Webber, 1986). The digestion of proteins by intracellular enzymes has been shown to occur in fish larvae and is thought to aid in digestion to compensate for the lack of a functional stomach (Georgopoulou et al., 1985, Govoni et al., 1986, Cahu and Zambonino Infante, 1995, Lazo et al., 2007). However, in cephalopods, this "ancestral" intracellular digestion is described at all life stages in parallel with the "advanced" extracellular digestion leading therefore to a fast growth of these animals due to the efficient assimilation of nutrients (Boucaud-Camou and Roper, 1995, Swift et al., 2005). The most important digestive organs of cephalopods include the stomach, caecum, pancreatic diverticula, intestine and digestive gland (Swift et al., 2005). However, the efficiency of this digestive system is mostly attributed to the digestive gland with its many roles in digestion. The most important of these roles are enzyme secretion, nutrient and lipid storage, absorption of molecules, intracellular digestion and excretion of waste products (Boucaud-Camou and Yim, 1980, Boucaud-Camou and Boucher-Rodoni, 1983, Boucher-Rodoni et al., 1987, Budelman et al., 1997, Semmens, 2002, Martinez et al., 2011).

The most important digestive enzymes from fish and aquatic invertebrate viscera are pepsin, the aspartic and serine proteases, collagenase and esterase (Balti *et al.*, 2012). Given the carnivorous diet of cephalopods (Boucaud-Camou and Boucher-Rodoni, 1983), the dominant enzymes are expected to be a suite of proteases. Cephalopod enzymatic activities, which are localized in the digestive system, were determined as non specific proteolytic,  $\alpha$ -amylasic, alkaline and acid phosphatasic activities (Boucaud-Camou, 1973, Boucher-Rodoni, 1981, Perrin *et al.*, 2004). Among the non specific proteolytic activities are found the trypsin and cathepsin enzymes. Trypsin is a member of a large family of serine proteinases which specifically hydrolyse proteins and peptides at the carboxyl group of arginine and lysine residues and play major roles in biological processes including digestion and activation of zymogens of chymotrypsin and other enzymes (Kolodziejska

and Sikorski, 1996, Jellouli et al., 2009). Cathepsin is an intracellular lysosomal enzyme that is considered as an aspartic proteinase which is a class of endopeptidases active at acid conditions (Gildberg, 1988). Acid phosphatase (ACP) is an enzyme characteristic of lysosomes (Boucaud-Camou, 1974) and alkaline phosphatase (ALP) is a membrane-bound enzyme found in cell membrane where active transport takes place (Boucaud-Camou and Roper, 1995). ACP and ALP various phosphate-containing compounds catalyze the hydrolysis of and act as transphosphorylases at acid and alkaline pHs, respectively (Mazorra et al., 2002, Lacoue-Labarthe, 2010). These enzymes activities were described in the digestive system of several cephalopod species such as Octopus maya (Aguila et al., 2007, Rosas et al., 2011, Martinez et al., 2011), Dosidicus gigas (Gardenas-Lopez and Haard, 2009), Rosbonella fontaniana (Pereda et al., 2009), Sepioteuthis lessoniana (Semmens, 2002) and Sepia officinalis (Perrin et al., 2004, Balti et al., 2010, Lacoue-Labarthe et al., 2010).

The European common cuttlefish, *S. officinalis* covers the Mediterranean Sea and the waters of the Eastern Atlantic from southern Norway and northern England to the northwestern coast of Africa. It is also found in Madeira and in the Canary Islands (Guerra, 2006). In the English Channel, the population of *S. officinalis* performs large migrations offshore in winter and inshore in spring for reproduction (Boucaud-Camou and Boismery, 1991). The littoral zones of the English Channel are thus important spawning locations for *Sepia*. Once mating occurs, cuttlefish lay their eggs on benthic structures in coastal waters essentially between April and June and die shortly afterwards (Boucaud-Camou and Boismery, 1991). Coastal egg masses will provide the cuttlefish recruits when juveniles leave the coast in autumn. The eggs undergo local environmental conditions that influence their development and survival and that can affect life history characteristics afterwards as well as distribution and abundance (Bouchaud and Daguzan, 1989, Pierce *et al.*, 2008). Transition from dependence on maternally derived yolk reserves to independent active feeding represents a critical period in the early life history of cephalopods (O'Dor and Wells, 1975, Vecchione, 1987, Boletzky, 1989). Early life history is thus assumed to be one of the most critical phases in *Sepia* life cycle and is likely a key factor for recruitment success.

The digestive system of cuttlefish hatchlings matures during the first month post-hatching. This was described by Boucaud-Camou and Yim (1980) in experimental rearing at temperature range between 17°C and 20°C using live mysis and Brown Shrimps as food source. The digestive gland cells that are immature at hatching become fully mature after one month of life. These cells are filled with various cytoplasmic inclusions, such as vacuoles, lipid droplets and "balls" (digestive

vesicles described as "boules" by Boucaud-Camou and Yim, 1980) while maturing. "Balls" are densely staining spheres containing digestive enzymes which are released into the lumen of the digestive gland and passed to the stomach for primary digestion (Boucaud-Camou and Yim, 1980, Boucaud-Camou and Boucher-Rodoni, 1983). Their appearance is a sign of the extracellular alkaline digestion establishment. During this period, a shift from predominant acid intracellular digestion to extracellular alkaline digestion is observed (Boucaud-Camou *et al.*, 1985). The adjustment in enzymatic activities that occurs during the first days post-hatching is a signal of juvenile digestion changing to adult digestion (Yim and Boucaud-Camou, 1980, Vecchione and Hand, 1989, Perrin *et al.*, 2004).

The present study investigates, for the first time, the digestive system maturation in early stages of cuttlefish in relation to four different spawning sites and two different years. Four digestive enzymes activities (*i.e.* trypsin, cathepsin, ACP and ALP) were studied along with histological observations of the digestive gland maturing applied to hatchlings throughout their first month post-hatching (35 days). Correlations between hatchling growth performance, digestive enzyme activities and histological features were also studied.

The aim of this work was to (1) have a more detailed description of digestive enzymes profile in early post-hatching days of cuttlefish life that would be correlated to histological observations of the digestive gland maturation, (2) investigate if there are differences in hatchling digestive system maturation due to egg incubation conditions (different spawning sites and years) and (3) check the applicability of enzymatic tools, to whole individual juveniles, for the description of their digestive system maturation.

#### B. Material and methods



#### 1. Egg sampling and experimental juvenile growth survey

Figure 23: Spawning sites distribution of *Sepia officinalis* in the English Channel. The monitored spawning sites are: BS (Bay of Seine-FR), AC (Agon Coutainville-FR), TB (Torbay-UK) and SE (Selsey-UK).

Juveniles used for this study were issued from the egg sampling and experimental growth survey done by Safi et al. (Unpublished data). Eggs of "wild" S. officinalis were collected from four sites among the main spawning grounds of cuttlefish in the English Channel (Boucaud-Camou et Boismery, 1991; Dunn, 1999; Challier, 2005). Two of them were located on the French coast [Agon Coutainville (AC; 49°02'35"N, 1°34'32"W) and Bay of Seine (BS; 49°18'53"N, 0°21'0"W)] and two others on the English coast [Torbay (TB; 50°27'08"N, 3°33'25"W) and Selsey (SE; 50°44'06"N, 0°47'23''W)] (Figure 23). Between 800 and 2400 eggs were sampled per site in July 2010 and 2011 and were transferred to the marine research centre of the University of Caen Basse-Normandie (CREC, Normandy, France). Eggs were conditioned in boxes half filled with seawater and algae to keep them fresh and stabilized for transport. Once in the marine research centre, eggs were separated in 100 individual-batches placed on sieves (0.36 x 0.28 m, 1mm mesh size) distributed in large tanks containing circulating seawater at a temperature of 18.5 ± 0.5°C. In order to avoid premature hatchlings resulting from transport stress, eggs were acclimatized for 3 days before hatchling collection. After hatching, juvenile rearing was conducted during 35 days between July and September 2010 and 2011. For each site, six batches of 25 hatchlings were placed into rectangular sieves (0.36 x 0.28 m, 1mm mesh size) under the same controlled and standardized conditions (Koueta and Boucaud-Camou, 1999) and were fed *ad libitum* with frozen shrimps *Crangon crangon*.

Juvenile sampling was conducted 0, 7, 14, 21, 28 and 35 days after hatching (DAH). Weight measurements were conducted on 24 juvenile cuttlefish/site/DAH with a Denver Instrument (Digital blanc, Washington) balance (precision of 0.001 g). For enzymatic assays, 8 juvenile cuttlefish/site/DAH were anesthetized in a 2 % solution of ethanol in seawater then frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C till biochemical analysis. This quick euthanasia method is adequate to avoid suffering to the animal. For histological experiments, 6 and 10 hatchlings (respectively in 2010 and 2011) were anesthetized in a 2 % solution of ethanol in seawater, fixed in Davidson's solution (10% glycerol, 20% formaldehyde, 30% of 96° ethanol, 40% filtered seawater) for 24h at 4°C and then transferred in 70% ethanol storage solution.

#### 2. Enzymes extraction and assays

#### a) Enzyme extraction

The extractions were made individually on the whole body after cuttlefish samples were weighed and ground in liquid nitrogen. Samples were then homogenised in a known amount (0.1 g to 10 ml) of Tris buffer pH 8 (10 mM Tris-HCl and 150 mM NaCl) and stored at 4°C for 1 hour. The mixture was then centrifuged for 10 min at 4°C at 15000 g. The supernatant was used for digestive enzyme assays and for determination of total protein concentration.

#### b) Total protein concentration

The total protein content was assayed according to the Bradford method (1976) using Bovine Serum Albumin (Sigma-Aldrich, France) as standard.

#### c) Enzyme assays

Trypsin activity was measured according to Tsunematsu *et al.* (1985) using 1 mM N $\alpha$ benzoyl-Arg-p-nitroanilide as substrate in a 0.1 M Tris buffer at pH 9. Twenty  $\mu$ l of supernatant were added to 100  $\mu$ l of substrate in triplicates in sterile 96-well flat bottom plates (BD, USA) and samples were incubated for 1 hour at 25°C. The final absorbance was recorded at 410 nm using Mithras LB940 luminometer (Berthold, Thoiry, France) and the enzyme activity was expressed as trypsin specific activity (U.mg<sup>-1</sup> protein) where one enzymatic activity corresponds to 1  $\mu$ mol of pNa formed.min<sup>-1</sup>. Cathepsin activity was measured according to Bonete *et al.* (1984) using 0.1 ml of supernatant, 0.05 ml of 0.4 M acetate buffer at pH 4 and 0.05 ml of 2% (w/v) haemoglobin solution. In parallel, intrinsic proteolytic end products were measured by replacing 0.05 ml of 2% haemoglobin by bi-distilled water. Samples were then incubated at 37 °C for 1 hour. The reaction was stopped by adding 1 ml of 3% (w/v) trichloroacetic acid. After 10 min, the assays were centrifuged at 800 g for 10 min at 4°C. Fifty µl aliquots were used for estimations of the released proteolytic end products by using the Bradford (1976) method with Bovine Serum Albumin (Sigma-Aldrich, France) as standard. The activity was expressed as cathepsin specific activity (U.mg<sup>-1</sup> protein).

Total acid and alkaline phosphatase (respectively ACP and ALP) activities were determined respectively according to Moyano *et al.* (1996) and Principato *et al.* (1982) using p-nitrophenyl-phosphate 2% as substrate in a 1 M Tris buffer at pH 3 for ACP and pH 10 for ALP. For the two activities, 10 µl of supernatant were added to 10 µl of substrate in 96-well flat bottom plates (BD, USA). After 30 min of incubation at 25 °C, 100 µl of NaOH 1 M were added to stop the reaction and reveal the colour. The absorbance was measured at 405 nm using Mithras LB940 luminometer. Total acid and alkaline phosphatase activities were expressed as specific activity (U.mg<sup>-1</sup> protein) where one enzymatic unit corresponds to 1 µmol of p-nitrophenol formed.min<sup>-1</sup>.

#### d) Enzymes ratio

Enzyme ratios were measured in order to evaluate the shift undergoing during the maturation of the digestive system between intracellular digestion carried out by enzymes acting in acidic medium and extracellular digestion carried out by alkaline enzymes. Two types of ratios were calculated, one between the two proteolytic enzyme activities (trypsin/cathepsin) and one between the two phosphatase activities (ALP/ACP).

#### 3. Histology

The histological study of the maturation of digestive gland was also undertaken in parallel to enzyme assays. For this purpose, samples stored in 70% ethanol solution were washed, dehydrated and embedded in paraffin. Serial sections of 5 µm were cut with a manual rotary microtome Leica RM2135 (Leica, ville, France), processed and stained with Prenant-Gabe's trichrome according to a classical protocol (Gabe, 1968). Digital pictures and cell measurements of

the digestive gland were achieved with the Nikon C system combining Eclipse 80i microscope / DXM1200-C digital camera and NIS-elements D 3.0 software.

The maturation of digestive gland was assessed from 0 to 35 DAH with special emphasis on the hatching day which only reflects incubation conditions in the spawning sites with no experimental interference. In 0 DAH juveniles, internal yolk and digestive gland surfaces (respectively IYS and DGS, mm<sup>2</sup>) were measured on 6-10 individuals/site/year in order to estimate the digestive gland development (DGD, %) according to the following equation:

 $DGD(\%) = 100 \times [DGS(mm^2)/(DGSmm^2) + IYS(mm^2)]$ 

Nucleoplasmic ratios (nucleus surface/ cytoplasm surface) were also estimated for 150 digestive cells/individual using 6-10 juveniles/site/ year. From 7 to 35 DAH, cytological features specific to maturing digestive cells such as the mean number of "balls" (proteinaceous inclusions characteristic of most cephalopods)/cell (NBC) and mean digestive cell length (CL,  $\mu$ m) were estimated from observations of 50 digestive cells/individual using 6 juveniles/DAH/site sampled in 2010.

#### 4. Statistical analysis

In each cuttlefish specimen, weight and average enzymatic values of aliquots are used to compute means and standard errors per sample. For statistical analysis, preliminary tests of normality and homoscedasticity allowed the use of parametric methods. Weight, enzymatic activities and enzyme ratios of juveniles from the four different sites of the English Channel (BS, AC, TB and SE) were therefore compared by using analysis of variance [one-way ANOVA (for sites comparison within each DAH) or two-ways ANOVA (for sites and DAH comparison within each year)] with R statistical software. When differences were observed, a *post hoc* Tukey test was used to look for homogenous groups of batches. For inter-annual comparisons (2010-2011) of growth, enzymes evolution and ratios, slopes were compared with an ANCOVA analysis. In order to avoid overloading the graphs with significance tests, only one way ANOVA significance (sites comparison within each DAH) were displayed and the legend indicates where the overall temporal trend is significant.

Juvenile exponential growth was transformed by using natural logarithm to weight-at-age data. Relationships between enzymatic activities and logarithmic weight (LW) or digestive gland characteristics were studied by applying linear models to data with R software.

#### C. Results

#### 1. Growth survey

Cuttlefish growth was monitored on reared juveniles hatched from eggs collected at four different spawning sites of the English Channel in 2010 and 2011 (**Figures 24A and 24B**). The general profile of hatchling growth showed a "no net growth" phase between 0 and 7 DAH then a significant (p < 0.05) weight increase between 14 and 35 DAH.



Figure 24: Growth of cuttlefish juveniles *Sepia officinalis* hatched from eggs collected at different spawning locations, and two different years, followed in their early post-hatching days (DAH) (A-2010, B-2011; n=24/site/DAH, values: mean  $\pm$  se). BS: Bay of Seine, AC: Agon Coutainville, TB: Torbay, SE: Selsey. Barplots, not bearing the same subscript letter within each DAH group are significantly different (p < 0.05, one way ANOVA). Line: general profile, NS: Not significant and \*: significant (p < 0.05, two ways ANOVA).

. In 2010 (**Figure 24A**) differences of weight were observed between sites, except at 7 and 35 DAH. Indeed, at hatching (0 DAH), juveniles had a significantly (p < 0.05) higher weight at BS site compared to the other ones. Between 14 and 28 DAH main significant weight differences were still observed between BS and AC. In 2011 (**Figure 24B**), BS, TB and SE had significantly (p < 0.05) higher weights at 0 DAH than AC. This difference was not observed at 7 DAH and the weight distribution reappeared afterwards from 14 till 35 DAH with marked significant differences at 28 and 35 DAH. The English hatchlings showed no difference (p > 0.05) in weight between each other and compared to BS site with one exception at 21 DAH between TB and BS. Slopes fitted to the weight natural logarithm were significantly lower in 2011 than in 2010 revealing a significantly lower growth rate in 2011 (ANCOVA analysis).

#### 2. Digestive enzyme activities and ratios

Trypsin mean activity varied between 0.5 IU.mg protein<sup>-1</sup> and 1.6 IU.mg protein<sup>-1</sup> with no significant difference between sites at the same DAH (**Figures 25A and 25B**). In 2010 (**Figure 25A**), an increase of this activity was observed between 0 and 7 DAH then this activity stabilized until 35 DAH. In 2011 (**Figure 25B**), between DAH variability was high with a significant increase between 0 and 14 DAH then an important variability in activities between 14 and 35 DAH.

Cathepsin activity profiles (**Figures 25C and 25D**) were similar between years and sites with a significant (p < 0.05) increase of this activity during the first week followed by a decrease in activity and a stabilisation afterwards between 21 and 28 DAH until 35 DAH. Decrease in activity from 7 up to 21 DAH was significantly higher in 2010 compared to 2011 (ANCOVA analysis). Comparison between sites revealed differences (p < 0.05) in cathepsin activity during early DAH (0 – 7 DAH) and these differences were no more significant once the stabilisation phase was reached. Two groups were observed in the first week post-hatching and in the two studied years with AC and SE on one side and TB and BS on the other. Indeed, at hatching day (0 DAH), SE and AC had significantly higher cathepsin activity than TB and BS and this distribution was maintained at day 7.

Trypsin/cathepsin ratios (Figures 25E and 25F) showed no significant differences between sites in 2010 (Figure 25E) and 2011 (Figure 25F) except at 0 and 7 DAH (p < 0.05) where BS and TB hatchlings had higher ratio than AC and SE. The general profile of this ratio varied between the two years however the increase in this ratio at 28 DAH was significant for both years. No differences (p > 0.05) in ratio temporal trends were found between sites and between years (ANCOVA analysis).



Figure 25 : Cathepsin and trypsin activities and enzyme ratios in cuttlefish juveniles hatched from eggs collected at different spawning locations, in their early post-hatching days in 2010 (Barplots A, C and E) and 2011 (Barplots B, D and F) (n=5/site and DAH, values: mean  $\pm$  se). BS: Bay of Seine, AC: Agon Coutainville, TB: Torbay, SE: Selsey. Barplots, not bearing the same subscript letter within each DAH group are significantly different (p < 0.05, one way ANOVA). Line: general profile, NS: Not significant and \*: significant (p < 0.05, two ways ANOVA).



Figure 26: Acid and alkaline phosphatases activities and enzyme ratios in cuttlefish juveniles hatched from eggs collected at different spawning locations, in their early post-hatching days in 2010 (Barplots A, C and E) and 2011 (Barplots B, D and F) (n=5/site and DAH, values: mean  $\pm$  se). BS: Bay of Seine, AC: Agon Coutainville, TB: Torbay, SE: Selsey. Barplots, not bearing the same subscript letter within each DAH group are significantly different (p < 0.05, one way ANOVA). Line: general profile, NS: Not significant and \*: significant (p < 0.05, two ways ANOVA).

Alkaline (ALP) and acid (ACP) phosphatase activities are illustrated on **Figures 26A to 26D**. ALP activity profiles (**Figures 26A and 26B**) showed a slight increase in early DAH then a stabilisation till 35 DAH. ACP activity profiles (**Figures 26C and 26D**) showed a slight increase between 0 and 7 DAH then a significant decrease up to 35 DAH with a stabilization phase observed in 2010 (**Figure 26C**). In this same year, ALP activity was higher (p < 0.05) in BS than AC at 0 DAH and higher (p < 0.05) than AC and SE at 7 DAH. No significant difference was noticed afterwards between sites. ACP activity was only significantly higher in AC at 14 DAH. In 2011 (**Figure 26B**), BS showed ALP activity that was higher than SE at 0 DAH and TB had higher activity than the three other sites at 7 DAH. ACP activity (**Figure 26D**) revealed higher activities in AC compared to the other sites. No significant differences in ratio temporal trends were found between sites and the two years for ALP acivity. A decrease (p < 0.05) in ACP temporal trends were observed between 2010 and 2011 with a slower decrease in this activity observed in 2011 (ANCOVA analysis).

ALP/ACP ratios were investigated afterwards with the two years data of ACP and ALP activities (**Figures 26E and 26F**). ALP/ACP ratio revealed a significant increase up to 35 DAH. This ratio highlighted differences between spawning sites in early DAH with two groups formed as observed in cathepsin. Indeed, BS and TB had higher (p < 0.05) ALP/ACP ratio than SE and AC at 0 and 7 DAH. These differences tended to disappear afterwards until 35 DAH. The comparison between the two years showed a significantly lower slope in 2011 than in 2010.

#### 3. Histological features of the maturing digestive gland

Internal yolk surface (IYS) (Figures 27A and 27B), digestive gland development (DGD) (Figures 27C and 27D) and digestive cells nucleoplasmic ratio (Figures 27E and 27F) distribution were similar between years with two juvenile groups formed at 0 DAH. Indeed, BS and TB hatchlings had lower IYS and nucleoplasmic ratios than AC and SE but higher DGD. The two year comparison showed significantly higher IYS and lower DGD for SE in 2011 compared to the same site in 2010.



Figure 27: Cuttlefish digestive gland characteristics at hatching (0 DAH) in 2010 (Barplots: A, C and E; n=6) and 2011 (Barplots: B, D and F; n=10, values: mean ± se), from four different spawning sites. IYS: Internal Yolk Surface (mm<sup>2</sup>), DGD= Digestive Gland Development (%). BS: Bay of Seine, AC: Agon Coutainville, TB: Torbay, SE: Selsey.. Barplots not bearing the same subscript letter are significantly different (p < 0.05, two ways ANOVA).

Digestive cell length (CL) (Figure 28A) significantly increased up to 28 DAH then decreased from 28 to 35 DAH. CL at 35 DAH were similar to those of 21 DAH. Significant differences were

noticed at 14 DAH with AC having smaller digestive CL than BS and TB but also at 21 DAH where BS and TB had smaller CL than SE. Mean number of "balls" per cell (NBC) (**Figure 28B**) were observed from 7 DAH on with an increase up to 21 DAH then a stabilization phase between 21 and 35 DAH. A significant difference was seen at 14 DAH where AC juveniles had lower NBC than BS and TB.



Figure 28 : Cuttlefish digestive cell length (CL, barplot A) and mean number of « balls » per cell (NBC, barplot B) during early post hatching days (35 DAH) of juveniles hatched from eggs collected at different spawning locations in 2010 (n= 6, values: mean  $\pm$  se). BS: Bay of Seine, AC: Agon Coutainville, TB: Torbay, SE: Selsey. Barplots, not bearing the same subscript letter within each DAH group are significantly different (p < 0.05, one way ANOVA). Line: general profile, NS: Not significant and \*: significant (p < 0.05, two ways ANOVA).



Figure 29: *Sepia officinalis.* Longitudinal sections of the digestive gland stained with Prenant-Gabe trichrome. Individuals at (A) 0 DAH and (B) 7 DAH observed at three different magnifications (x10, x40 and x100). DC: digestive cell, GT: glandular tubule, Hp : heterophagosome, L: lumen, nu : nucleus, V: vacuole, YP : yolk platelet. (Unpublished)



Figure 30: *Sepia officinalis.* Longitudinal sections of the digestive gland stained with Prenant-Gabe trichrome. Individuals at (A) 14 DAH and (B) 21 DAH observed at three different magnifications (x10, x40 and x100). b:"balls", ES: erythrophil secretions, Hp: heterophagosome, L: lumen, nu: nucleus, V: vacuole. (Unpublished)



Figure 31: *Sepia officinalis.* Longitudinal sections of the digestive gland stained with Prenant-Gabe trichrome. Individuals at (A) 28 DAH and (B) 35 DAH observed at three different magnifications (x10, x40 and x100). b:"balls", bb: brown body, CS: cyanophil secretions, Hp: heterophagosome, L: lumen, V: vacuole. (Unpublished)

**Figures 29, 30 and 31** are used in the manuscript to illustrate the histological observations. These figures were not submitted with the publication.

### 4. Correlations at hatching (0 DAH) between digestive gland characteristics and digestive enzymes

IYS was inversely correlated to DGS (Figure 32A) and positively correlated to digestive cells nucleoplasmic ratio (Figure 32B). The later was inversely correlated to DGD (Figure 32C).



Figure 32: Correlations between different digestive gland characteristics in cuttlefish juveniles at hatching day (0 DAH) in 2010 and 2011. DGD: digestive gland development (%), DGS: Digestive gland surface (mm<sup>2</sup>), IYS: internal yolk surface (mm<sup>2</sup>). A, B and C are Linear regressions respectively between IYS and DGD, IYS and nucleoplasmic ratio and DGD with nucleoplasmic ratio.

IYS was also correlated to ACP (Figure 33A) and cathepsin (Figure 33B) activities while DGD was correlated to ALP/ACP (Figure 33C) and trypsin/cathepsin (Figure 33D) ratios.



Figure 33: Correlations between digestive gland characteristics at hatching day (0 DAH) with enzyme activities (Linear regressions A and B) and enzyme ratio (Linear regressions C and D) in cuttlefish hatchlings. ACP: acid phosphatase activity, DGD: digestive gland development (%), IYS: internal yolk surface (mm<sup>2</sup>).

### 5. Correlations between enzyme ratios, juvenile weight and the digestive gland histological features

ALP/ACP ratio was highly correlated to juvenile weight (Figure 34A) and to NBC and CL (respectively figures 34C and 34E) of the maturing digestive gland. Similar correlations were

noticed between trypsin/cathepsin ratio and weight increase (Figure 34B), NBC (Figure 34D) and CL (Figure 34F).



Figure 34: Correlations between enzyme ratios (ALP/ACP and Trypsin/Cathepsin) and fitted growth linear model (Linear regressions A and B), NBC (Linear regressions C and D) and CL (Linear regressions E and F) in cuttlefish hatchlings. ALP: alkaline phosphatase activity, ACP: acid phosphatase activity, CL: digestive cell length (μm), NBC: mean number of "balls"/cell.

#### **D.** Discussion

The digestive gland of cuttlefish develops during the first month after hatching until it reaches its definitive adult form (Yim and Boucaud-Camou, 1980; Boucaud-Camou and Boucher-Rodoni, 1983; Perrin, 2004). During the transition between post-hatch and juvenile stage in cephalopods, the process of yolk absorption is carried out in the digestive gland, which directly receives these reserves from the inner yolk sac by means of the sanguineous torrent that provides the food (Boletzky, 1975). In this process, the digestive gland goes from being a reserve and yolk distribution organ to being the organ responsible for the processing of ingested food (Perrin, 2004). Boucaud-Camou et al. (1985) have defined three periods in the early life stages of cuttlefish S. officinalis. During the embryonic phase, which starts with the egg development and lasts until hatchling first meal (*i.e.* up to four days post-hatching), food is only provided by the yolk which is digested by the intracellular enzymatic activities of the yolk syncytium. During the post-embryonic phase, which begins with the first meal and lasts until thirty days post-hatching, the embryonic mode of nutrition (yolk digestion) comes to coexist with the post-embryonic mode (capture of prey and extracellular digestion in the digestive tract). The progressive differentiation of the digestive gland is closely related to exogenous feeding and the transition to the juvenile-adult phase is characterized by changes in the diet and by the acquisition of an adult pigmentation and physiology in the digestive gland which occurs around the 30<sup>th</sup> day post-hatching. In this study, the transition from embryonic to post-embryonic digestion was observed between 0 and 7 DAH whereas transition to the juvenile-adult phase was observed between 7 and 35 DAH.

#### 1. Embryonic to post-embryonic digestion transition

The transition between embryonic and post-embryonic digestion corresponded to the first week of hatchling life during which internal yolk reserve is digested and hatchlings start exogenous feeding by catching preys. During this transition period, a "no net growth" phase has been observed. Low growth in early post-hatching days has been described in several cephalopod species such as *Loligo opalescens* (Vidal *et al.*, 2002) and *O. maya* (Moguel *et al.*, 2010). Boucaud-Camou and Boucher-Rodoni, (1983) have also described this "no net growth phase" in *S. officinalis* and these authors related this delay in growth to the fact that the extracellular digestion has not started yet due to the phase of yolk absorption.

However, from a physiological point of view, several changes are taking place. A significant increase in cathepsin activity was observed at 7 DAH and "balls" appeared too. The enzyme

activity increase was less marked for ACP activity and ALP and not significant for trypsine. Umezawa (1982) presented evidence that the most abundant yolk protein is proteolytically processed primarily by the cathepsin-B-like enzyme and this enzyme was identified in *S. officinalis* digestive gland (Le Bihan, 2006). Furthermore, there is evidence that pH may be the key regulator of yolk degradation (Martinez *et al.*, 2011). In tick eggs, *Ornithodoros moubata*, acidic proteinases are stored in the yolk as a latent, acid-activable pro-enzyme (Fagotto, 1990). The yolk platelets are initially neutral, but they become acidic later in development, causing pro-enzyme maturation and yolk degradation (Fagotto, 1991). These mechanisms were described in cephalopods among which *O. maya has* probably this same regulatory enzymatic mechanism for yolk degradation (Martinez *et al.*, 2011). The acidophilic fluid permeating all the digestive gland around 5 DAH could be the evidence for this enzymatic mechanism. Peaks in digestive enzyme activity in *O. maya* hatchlings during early DAH (Moguel *et al.*, 2010) coincide well with the decrease in density of yolk platelets (Martinez *et al.*, 2011). Thus, in *S. officinalis*, increase in cathepsin activity, and in a lower manner ACP activity, during the first week post hatching would be a result of yolk acidification which induced cathepsin pro-enzyme activation.

Moreover, Lacoue-Labarthe *et al.* (2010b) studied the cathepsin and ACP activities evolution during egg development of *S. officinalis* and these authors observed an important increase in the final days before hatching with highest activities observed few hours before hatching. These authors suggested *de novo* synthesis of these enzymes in the embryo in final development stages before hatching. Thus, the increase in cathepsin activity continues after hatching at least until 7 DAH and could be partly due to the appearance of "balls" at 7 DAH containing *de novo* enzymes. Digestive gland cells synthesize two classes of "balls" with some of them being involved in intracellular digestion (heterophagosomes and heterolysosomes) and others are related to enzyme storage and secretion (*i.e.* extracellular digestion) (Boucaud-Camou and Yim, 1980; Martinez *et al.*, 2011). At 7 DAH, the first "balls" observed could be intracellular digestive ones. They may increase the acid digestive enzyme activities as their intracellular digestive activity will be additionned to the syncitium activity for the yolk digestion. However, the histological approach made here does not allow making the difference between the two kinds of balls.

Significant differences were observed in hatchling weight at 0 DAH and these differences disappeared at 7 DAH. This suggests that the growth of juvenile during this period, even low, varied between sites. Given that the biotic and abiotic conditions in juvenile rearing were identical for all batches for both studied years and that juveniles from all studied sites belong to the same
genetic population (Paul Shaw, personal communication), the differences observed in growth were thus the result of a physiological process probably resulting from different environmental conditions at the four different spawning sites. Understanding differences in growth requires therefore to study the maturation of the digestive system during this critical period of digestive changes (O'Dor and Wells, 1975; Vecchione, 1987; Boletzky, 1989).

The study of the DGD at 0 DAH showed significant differences between juveniles from the four studied sites. BS and TB exhibited, for two consecutive years, a DGD significantly higher than that of AC and SE. However, AC and SE revealed significantly higher internal yolk reserves (IYS) with higher nucleoplasmic ratio than BS and TB. At hatching, the digestive gland is still developing (multiplication stage, mitoses) and the digestive cells are still undifferentiated with most of them being immature (Yim and Boucaud-Camou, 1980). In this period, the nutriments are exclusively obtained from the yolk by the digestive activity of the yolk syncitium (Boucaud-camou *et al.*, 1985). This fact is illustrated by a strong activity of the yolk syncitium with an intracellular digestive activity contrasting with a weak activity of the digestive gland (Boucaud-Camou, 1982).

Cathepsin activity was higher among juveniles from AC and SE, between 0 and 7 DAH, compared to that of juveniles from BS and TB for the two consecutive years and the same pattern was observed in 2011 ACP activity. These activities at 0 DAH have revealed a significant correlation with IYS thus showing a greater intracellular digestion for AC and SE juveniles due to the larger amount of yolk reserves. The high acid phosphatase activity and cathepsin point to intracellular digestive processes in the gland (Boucaud-Camou and Roper, 1995). Both ACP and cathepsin are localized in specialized organelles known as yolk platelets, during all embryogenesis, which are modified lysosomes containing vitellin reserves (Lacoue-Labarthe, 2010b). Thus, the IYS effect on intracellular digestive activities was effective throughout the first week post-hatching, giving SE and AC advantage in growth compared to BS and TB.

But this advantage is temporary as the extracellular alkaline digestion is taking place more rapidly in BS and TB during the same period. The DGD was already different at hatching and the study of ALP activity with ALP/ACP and trypsin/cathepsin ratios showed a faster maturation of the digestive system in BS and TB juveniles since activities and ratios were greater at 0 and 7 DAH compared to those of AC and SE. DGD was positively correlated to ALP/ACP and trypsin/cathepsin ratios at 0 DAH. Furthermore, the mean digestive cell length showed a greater increase for BS digestive gland at 7 DAH compared to other sites and a same pattern for TB at 14 DAH. The digestive gland cell

length increases in cuttlefish during early post-hatching days and these cells reaches their maximal development around the 30<sup>th</sup> day (Yim, 1978).

During this first phase of transition from embryonic to post-embryonic stage, the yolk reserve proved to be an important factor in understanding the variability of enzyme activity and growth. This phase was thus highly dependent of the egg incubation conditions in the various sites that induced differences in hatchling characteristics. The internal yolk content of hatchlings was stable spatially (i.e. between different spawning sites) and temporally (i.e. between the two studied years) which emphasizes the local environmental influence. Embryonic development of many cephalopods has been shown to be highly temperature-dependent, with eggs developing faster in warmer waters (Semmens et al., 2007). This development duration was found to be proportional with cuttlefish hatchlings length and weight (Lemaire, 1970; Blanc, 1998; Villanueva et al., 2011). In the same way in S. officinalis juveniles, it has been shown that local temperature within each site had an impact on eggs incubation period and was correlated with the hatchlings weight at 0 DAH (Safi et al., Unpublished data). However, the yolk reserve availability at hatching may be due to a maternal effect. If a mother is able to predict the quality of her offspring's environment, she may increase the survival chances of her offspring by adjusting their phenotype to the expected conditions (Segers and Taborsky, 2010). Several examples of such maternal effects have been reported, demonstrating a wide range of mechanisms by which mothers can alter offspring phenotype in adaptation to environment (De Fraipont et al., 2000; Eising et al., 2001; Uller et al., 2007). Such hypotheses suggest that the female cuttlefish would adjust the yolk content in eggs depending on the environmental parameters (such as the availability and access to prey for juvenile hatchlings) where eggs are laid. Higher yolk content would enable better chances of survival in an environment that is not rich in prey for offspring.

#### 2. Post-embryonic to juvenile-adult digestion transition

The transition between Post-embryonic and juvenile-adult digestion was observed between 7 and 35 DAH and corresponded to the establishment of extracellular digestion with the exogenous feeding. The beginning of exogenous feeding is a major characteristic of the post-embryonic phase which induces the start of exponential growth (Boucaud-Camou *et al.*, 1985). The first meal triggers the secretory activity of the digestive gland: so-called "balls" while yolk is still being digested by the yolk syncitium (Boucaud-Camou and Boucher-Rodoni, 1983).

In this study, "balls" started to be observed at 7 DAH and increased rapidly at 14 DAH before stabilizing from 21 DAH on. From 7 up to 35 DAH, a parallel growth phase is observed between sites with no difference in growth rate between the batches (Safi et al., Unpublished data). Differences in enzyme activities and ratios disappeared due to the fact that food was the same for all batches but also due to the final phase approach of digestive system maturation. For some enzymes, a stabilization phase was observed with no differences between batches like ALP 2010 and 2011 from 14 up to 35 DAH and also ACP, cathepsin and trypsin from 21 up to 35 DAH in 2010. This stabilization phase with the digestive system maturation was already described in cephalopods. Solorzano et al. (2009) have studied several digestive enzymes (i.e. trypsin, chymiotrypsin, alkaline proteases, amylase and lipase) in newly hatched O. bimaculoides and these authors observed an oscillatory behavior of these enzymes with a tendancy to stabilize after day 15 post-hatching. Furthermore, histological observations revealed stabilization in the CL and NBC between 21 and 35 DAH thus parallel growth between sites is the result of the acquisition of similar digestive performances. The appearance of well-developed digestive gland cells and plenty of "balls" between 21 and 35 DAH demonstrated that S. officinalis reached its digestive maturity during the time when enzyme activity was stable.

However, several indices highlight a delay in the digestive system maturation of 2011 juveniles compared to the 2010 ones. Growth rate was lower in 2011, with mean juvenile weights at 35 DAH around 1.5 g while it reached 2 g in 2010. The discrepancy between the two years resulted from a delay in the physiological maturation of the digestive system. The decrease in intracellular acid activities was lower in 2011. The stabilization phase for cathepsin was observed from 28 DAH on and ACP decrease was seen up to 35 DAH whereas in 2010 ACP and cathepsin stabilized since 21 DAH. Perrin *et al.* (2004) considered ACP as a marker of juvenile cuttlefish digestive system and noticed that this enzyme was particularly active in stages from embryos (when they help to degrade vitellin reserves) until 20 DAH. These authors noticed also that a faster decrease of ACP activity was a sign of a faster maturation of the digestive system. ACP and cathepsin activities evolution between the two years related to juvenile growth were consistent with these author's descriptions. In addition, trypsin activity was stabilized since 14 DAH in 2010 while it was very variable in 2011. This last observation could be an indicator of a lower maturation of the digestive system inducing a lower growth rate. Lemieux et al (1999) worked on a large number of digestive enzymes (*i.e.* acid proteases, trypsin, chymotrypsin, ALP, glutamyltransferase) in cod *Gadus* 

*morhua* and these authors observed that in digestion, trypsin was the only enzyme measured that could be suspected to potentially limit growth rate in cod.

In carnivorous species as cuttlefish, trypsin activity is expected to play a major role as this enzyme breakdowns ingested proteins (Vonk and Western, 1984). High variability in its activity could thus indicate a lower efficiency of extracellular digestion of ingested proteins which limits the growth rate. Furthermore, changes in trypsin profiles between 2010 and 2011 could also be a result of food quality change between these two years as this enzyme is highly affected by food quality as observed in O. vulgaris (Villanueva et al., 2002), O. maya (Aguila et al., 2007) and S. officinalis (Perrin et al., 2004). An enzymatic content variation in relation to the alimentary source is a common metabolic regulation (Perrin et al., 2004). Animals can adjust their metabolism by varying their enzymatic secretions to allow the assimilation of diet components (Caruso et al., 1996; Zambonino-Infante and Cahu, 1994). Cephalopods have the capacity to adjust their digestive enzymes to different food items to optimize digestion (Perrin et al., 2004; Aguila et al., 2007) which seems to be particularly adapted to trypsin activity. In addition, this enzyme is excreted as a precursor, the trypsinogen and is activated when needed in the intestinal tract, either by autocatalysis or by an enteropeptidase (Kolodziejska and Sikorski, 1996), which highlights its capacity to be adjusted when needed. As the food ingested by juveniles was similar between the two years along with the abiotic rearing parameters, it is likely to be the food quality which is the source of the growth variation between the two years.

During this post-embryonic to juvenile adult digestion transition, weight differences between juveniles from the different spawning sites, already described at 0 DAH reappeared at 14 DAH. In 2011, weight distribution at 0 DAH was found at 14 DAH and lasted until 35 DAH. However in 2010, the difference at 0 DAH was significant between BS juveniles and the other three sites. At 14 DAH the difference was observed between AC juveniles and the other sites *i.e.* SE and TB took an advantage in growth compared to AC juveniles and joined those of BS. Then average weights differences were observed up to 35 DAH although significance tended to disappear. The advantage gained by SE and TB can be explained in two ways. For SE juveniles, the DGD at 0 DAH was lower than BS and TB but SE juveniles had also significantly more IYS than the other three sites, which induced higher intracellular acidic activities in the first phase of growth post-hatching. At 14 DAH, SE presented a high ALP/ACP ratio and a high NBC, similar to those found in BS and TB juveniles, whereas AC had significantly lower NBC and ratio. Thus, after having the advantage in the first phase in intracellular digestion, juveniles of SE have had a DGD maturation equivalent to

BS juveniles at the beginning of this second growth phase. This maturation was reached only after 21 days in AC juveniles and later in those of the other sites. This was observed in the two studied years with the ALP/ACP ratio. Intracellular acidic and extracellular alkaline digestion advantages helped explaining the higher growth for SE juveniles between 7 and 14 DAH. TB juveniles had a higher DGD at 0 DAH when compared to AC juveniles. This difference was also observed in ALP/ACP ratio where TB cuttlefish had always higher ratio than AC ones from 0 up to 14 DAH. Differences between AC and the other site batches were also observed in digestive cell length at 14 DAH when AC juveniles had the lowest digestive cell length but also the lowest NBC.

Differences were thus especially marked between 0 and 14 DAH in both enzyme activities and histological features. The advantage taken, in the digestive gland maturation, by some cuttlefish batches in this first period was maintained afterwards from 14 up to 35 DAH. The physiological performance observed in the first period (0 - 14 DAH) are a consequence of the pre-hatching environmental conditions which affect the newly hatched cuttlefish with an emphasis on the first day post-hatching (0 DAH). Correlation between environmental parameters underwent by eggs during incubation period and post-hatching maturation was already described in cuttlefish nervous system maturation between 0 and 7 DAH (Dickel *et al.*, 1997). Furthermore, other studies on different species have also shown such environmental impact on digestive tract maturation and growth performance in post-hatch animals (Van Damme *et al.*, 1992; Barri, 2008; Silva *et al.*, 2008).

## 3. Biochemical and histological tools to assess the digestive gland maturation in early life history of cuttlefish

Enzyme activity changes may be explained either as response to changes in the composition of food, or as a consequence of growth and development of new organs and tissues (Martinez *et al.*, 1999). The latter explains better what occurred in cuttlefish hatchlings since they were fed on the same type of food from day one until the end of rearing. The growth and the digestive system maturation were also influenced by the local environmental parameters that eggs endured in their original spawning sites.

Enzyme activities and ratios were good indicators of the digestive system maturation and revealed high correlations with juvenile growth and histological features in the digestive gland maturation. Indeed, growth rate was lower in 2011 compared to 2010 and this delay was revealed with the digestive enzyme assays especially with the cathepsin and ACP but also with the trypsin activity

thus making these enzymes good markers for juvenile growth in their first month of life. In parallel, the ALP/ACP ratio was highly correlated with juvenile weight changes as it increased throughout the studied period (up to 35 DAH). Trypsin/cathepsin ratio was less correlated with weight growth when studied throughout the 35 days period and varied also between the two years due to trypsin variation. However, this ratio presented significant differences between sites in the embryonic to post-embryonic transition phase which makes it interesting to be studied in early development stages when IYS is still being digested. In addition, histological examination showed high correlations with these ratios and improved targeting their importance at different stages of digestive gland maturation during the first month of cuttlefish life. The ALP/ACP and trypsin/cathepsin ratios were significantly correlated to DGD at 0 DAH but also with CL and NBC trends throughout the 35 days. As for the enzyme activities, only ACP and cathepsin activities were highly correlated to IYS at 0 DAH underlying their importance in yolk digestion. Enzyme ratios and acid activities can thus usefully describe the digestive system maturation in early life stages of cuttlefish. Ratios were found to be more specific than alkaline activities for the description of digestive system maturation. By integrating the acid activities into the establishment of the alkaline digestion with the digestive system maturing, the model reflects the balance that is made between the two digestions (intracellular and extracellular digestion) during the first month posthatching. The switch between the initial intracellular acid digestion and the extracellular alkaline digestion in cuttlefish is better represented with these ratios and especially with the ALP/ACP ratio. A correlation between enzyme activities and weight increase was already studied in other cephalopods. Villanueva et al. (2002) observed correlation between total proteolytic activity and weight of O. vulgaris paralarvae. Rosas et al. (2011) found correlation too between proteases and trypsin from the pancreas with O. maya growth rates. However, to our knowledge, up to now no study has used enzyme ratio to characterize digestive system maturation. This approach is very promising as it can give additional information on the digestive system maturation with simple tools.

#### E. Conclusion

Differences between cuttlefish hatchling characteristics from different spawning sites due to eggs incubation conditions were correlated with their digestive capacities during their first month post-hatching. In the first transition between embryonic and post-embryonic digestion, "a no net growth" phase was observed which corresponded to the period of yolk absorption and to the first

external food consumption before the establishment of the extracellular digestion. During this phase, the yolk reserve proved to be an important factor in understanding the variability in growth between cuttlefish groups. These reserves were highly correlated to intracellular enzyme activities (i.e. cathepsin and ACP) which can be considered as good indicators of the physiological phenomenon in progress during early digestive gland maturation. In the second transition between post-embryonic to juvenile-adult digestion, an exponential parallel growth was observed between cuttlefish batches which resulted from the establishment of a similar digestive performance between groups. However, during the early days of this second period (i.e. 7 to 14 DAH), the balance between intracellular and extracellular digestion played a major role in juvenile weight distribution, especially at 14 DAH. The ratios ALP/ACP and trypsin/cathepsin were already correlated to DGD at 0 DAH and these ratios revealed the advantages taken by some batches in the faster establishment of the extracellular alkaline digestion *i.e.* the faster maturation of the digestive system. When integrating the acid activities into the establishment of the alkaline digestion with the digestive system maturing, this model took into account the balance that is made between the two digestions (intracellular and extracellular digestion) during the first month post-hatching. Intracellular enzymes and enzyme ratios were highly correlated to digestive gland histological features (i.e. IYS, DGD, CL and NBC) which make them thus good indicators for the description of the digestive system maturation in early life stages of cuttlefish. Results obtained in this study showed a good complementarity between enzyme activities and histological descriptions of the digestive gland maturation. These tools seem thus suitable to compare growth and to better understand observed differences.

#### **Acknowledgments**

This work was supported by European funding as part of the CRESH INTERREG IV-A project and by the regional funding of Basse-Normandie. This work was achieved in the CREC marine research station (for the rearing) and in BioMEA laboratory (for biochemical analysis). We would like to thank Mrs Béatrice Adeline for her precious help in achieving the histological sections.



Figure 35 : Trypsine (A), cathepsine (C), alkaline (ALP) (B) and acide (ACP) (D) phosphatases activities and trypsine/cathepsine (E) and ALP/ACP (F) ratios in cuttlefish *Sepia officinalis* L. hatched from eggs collected at different spawning locations, in their early post-hatching days in 2009 (n=5/site and DAH, values: mean  $\pm$  se). BS: Bay of Seine, AC: Agon Coutainville, TB: Torbay. Barplots, not bearing the same subscript letter within each DAH group are significantly different (p < 0.05, one way ANOVA).

**Figure35** is added to the manuscript in addition to the results presented. This figure was not submitted with the publication.

Enzymatic activities obtained on 2009 samples confirm observations made on the two years monitoring (2010 and 2011) presented in this study. Trypsin activity was variable between years and this was also observed here (**Figure 35A**). The ALP activity (**Figure 35B**) showed a slight increase with a stabilization phase that was more variable than what was described before however with no significant differences between days after hatching (DAH). The acidic activities (*i.e.* cathepsin and ACP) (**Figures 35C and 35D**) had the same profile as in 2010 and 2011 where an increase is described in the early DAH followed by a decrease up to 35 DAH. Trypsin/cathepsin ratio showed an increasing profile with no significant differences (p < 0.05) between DAH (**Figure 35F**). The comparison of sites revealed the same pattern as for the two years monitoring presented in this study with AC juveniles having significantly (p < 0.05) lower trypsin/cathepsin ratio at 0 DAH and significantly (p < 0.05) lower ALP/ACP at 7 and 14 DAH. This was due to lower alkaline activities and higher acid activities which indicates lower digestive gland maturation for this site compared to the others.

## *III. ETUDE COMPARATIVE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES DIGESTIVES DES ŒUFS ET DES PRE-RECRUES DE SEICHE*

#### A. Introduction

La variabilité spatio-temporelle des paramètres environnementaux (*e.g.* température) au niveau des sites de ponte des seiches en Manche affecte l'incubation des œufs, les caractéristiques des juvéniles à l'éclosion (Chapitre 1-II) et la croissance des juvéniles dans leurs stades dits « prérecrues » (Chapitre 1-III). L'étude des enzymes digestives a permis de mettre en évidence que les activités enzymatiques ainsi que les ratios enzymatiques peuvent être utilisés comme outils pour une comparaison spatiale de la maturation du système digestif (Chapitre 2-II). Cette approche est effectuée en milieu expérimental à partir de l'éclosion jusqu'à 35 jours post-éclosion.

Le but de cette étude est de s'intéresser aux échantillons du milieu naturel des stades avant l'éclosion (*i.e.* œufs) et pendant la croissance côtière des juvéniles (*i.e.* les pré-recrues). L'étude des pré-recrues dans le milieu naturel (Chapitre 1-III) a montré une inversion des rapports de poids entre les deux sites français en 2010 comparé au milieu expérimental. Etudier les activités enzymatiques chez les pré-recrues peut permettre de mettre en évidence des variabilités spatiales du métabolisme de croissance.

Pour atteindre cet objectif, nous avons effectué des dosages des activités enzymatiques [*i.e.* trypsine, cathepsine, et phosphatases acides (ACP) et alcalines (ALP)] ainsi que les ratios enzymatiques de ces activités. Ces dosages ont été faits tout d'abord, sur les œufs de seiche collectés entre 2009 et 2011 et ensuite, sur la glande digestive des pré-recrues de 2010 et de 2011 prélevées dans les différents sites de ponte.

#### B. Matériel et méthodes

#### 1. Matériel biologique

#### Les œufs de seiche

Les œufs de seiche ont été collectés dans les quatre sites de ponte sélectionnés et acheminés jusqu'à la station marine de Luc sur mer, tel que décrit dans le chapitre 1-II-B2. Après installation dans les structures d'élevage, les œufs ont été acclimatés durant une semaine avant d'être prélevés puis congelés à -80°C pour les analyses biochimiques. En l'absence de détermination précise du stade embryonnaire, les échantillons congelés couvraient l'ensemble des tailles d'œufs observées dans chaque site de façon à avoir des groupes d'œufs comparables entre sites.

#### Les organes des pré-recrues de seiche

Après collecte dans les sites de ponte, les pré-recrues sont congelées à -80°C jusqu'aux analyses biochimiques (Chapitre 1-III-B1). Les animaux sont ensuite disséqués à froid dans un bac contenant de la glace pilée pour conserver leur qualité et couvert d'une feuille d'aluminium. Les branchies, cœurs branchiaux, appendices des cœurs branchiaux et le cœur central sont échantillonnés pour le dosage des lysozymes. Le manteau des pré-recrues est gardé pour l'étude de sa composition, et la glande digestive est prélevée pour les dosages des activités enzymatiques digestives. Les glandes digestives proviennent d'animaux en fin de digestion extracellulaire. Ce stade est déterminé par la présence de liquide dans l'estomac et le caecum selon les observations de Boucaud-Camou (1973). Après dissection de l'ensemble des individus, les organes toujours congelés sont remis à -80°C jusqu'au jour du dosage.

#### 2. Extraction et essais enzymatiques

Les échantillons d'œufs (30 œufs/site/année répartis en 6 réplicats de 5 œufs/dosage) ou de glande digestive (n = 10/site/année) sont broyés dans de l'azote liquide jusqu'à obtenir une poudre fine. Ensuite l'extraction enzymatique est faite dans du tampon Tris pH 8 (Chapitre 2-II-B2) et le surnageant obtenu est utilisé pour les dosages enzymatiques et le contenu protéique.

Le contenu protéique du surnageant ainsi que les activités et les ratios enzymatiques sont déterminés, tels que décrit dans le Chapitre 2-II-B2.

#### 3. Résultats et analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± erreur standard. Pour les tests statistiques, les tests préliminaires de normalité et d'homoscédasticité ont permis l'utilisation des méthodes de comparaison paramétriques. Les activités enzymatiques ont été comparées avec l'analyse des variances (ANOVA à deux facteurs pour la comparaison des sites et des années) en utilisant le logiciel « R statistical software ». Quand des différences sont présentes, un test post hoc Tukey est réalisé pour déterminer les différences entre les groupes (p<0.05).

#### C. Résultats

#### 1. Activités enzymatiques digestives dans les œufs de seiche

Les activités ALP, ACP et cathepsine des œufs de seiche ainsi que les ratios ALP/ACP et trypsine/cathepsine ne présentaient pas de différences significatives (p > 0.05) entre les sites et les années étudiées (**Tableau 17**). Une différence significative (p < 0.05) est relevée pour l'activité trypsine entre les œufs d'AC en 2009 et les œufs de BS en 2011.

Tableau 17 : Activités de la trypsine, de la cathepsine et des phosphatases acides (ACP) et alcalines (ALP) ainsi que les ratios enzymatiques dans les œufs de seiche provenant de différents sites de ponte en Manche entre 2009 et 2011 (valeurs en moyenne  $\pm$  se, n= 6/site/année). Les tests de significativité ont été faits, pour chaque activité enzymatique ou ratio, entre les sites et entre les années (ANOVA à 2 facteurs). Les chiffres ne portant pas la même lettre sont significativement différents (p < 0.05).

année	site	Activité enzymatique (UI.mg prot <sup>-1</sup> ) ou ratio enzymatique						
		ALP	АСР	ALP/ACP	Trypsine	Cathepsine	Trypsine/ cathepsine	
2009	BS	1.78±0.61 <sup>a</sup>	6.50 ± 0.84 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.07 <sup>a</sup>	2.57±0.36 <sup>ab</sup>	5.76±1.01 <sup>a</sup>	0.59±0.19 <sup>a</sup>	
	AC	$1.56 \pm 0.61^{a}$	6.62 ± 0.86 <sup>a</sup>	$0.25 \pm 0.1^{a}$	3.04 ± 0.43 <sup>a</sup>	6.30 ± 1.12 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.08 <sup>a</sup>	
	ТВ	$2.43 \pm 0.42^{a}$	6.52 ± 1.67 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.06 <sup>a</sup>	$1.66 \pm 0.30^{ab}$	5.28 ± 1.23 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.27 <sup>a</sup>	
2010	BS	1.93 ± 0.68 <sup>a</sup>	4.40 ± 2.01 <sup>a</sup>	0.38±0.15 <sup>a</sup>	$0.94 \pm 0.34^{ab}$	5.69±0.21 <sup>a</sup>	$0.16 \pm 0.06^{a}$	
	AC	3.07±0.52 <sup>a</sup>	5.40 ± 0.52 <sup>a</sup>	$0.55 \pm 0.06^{a}$	2.40 ± 0.33 <sup>ab</sup>	4.23 ± 0.28 <sup>a</sup>	0.56±0.06 <sup>a</sup>	
	тв	2.68 ± 0.32 <sup>a</sup>	4.19±0.44 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.09 <sup>a</sup>	2.84 ± 0.36 <sup>ab</sup>	$4.18 \pm 0.36^{a}$	0.67±0.02 <sup>a</sup>	
	SE	$2.27 \pm 0.54^{a}$	5.72±0.81 <sup>a</sup>	0.38 ± 0.07 <sup>a</sup>	2.01 ± 0.71 <sup>ab</sup>	5.11±0.81 <sup>a</sup>	0.62 ± 0.26 <sup>a</sup>	
	BS	1.63 ± 0.45 <sup>a</sup>	4.27 ± 1.01 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.26 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.05 <sup>b</sup>	5.43 ± 0.67 <sup>a</sup>	0.11±0.02 <sup>a</sup>	
11	AC	$2.10 \pm 0.60^{a}$	6.67±1.01 <sup>a</sup>	0.29 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.30 <sup>ab</sup>	3.78±0.31 <sup>a</sup>	0.27±0.08 <sup>a</sup>	
8	ТВ	3.73 ± 0.80 <sup>a</sup>	5.37±1.14 <sup>a</sup>	0.72 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.45 ± 0.39 <sup>ab</sup>	6.17±1.60 <sup>a</sup>	0.39±0.21 <sup>a</sup>	
	SE	2.18 ± 0.29 <sup>a</sup>	4.99 ± 1.02 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.98 ± 1.28 <sup>ab</sup>	5.11±0.81 <sup>a</sup>	0.58±0.19 <sup>a</sup>	



Figure 36 : Activités de la trypsine et de la cathepsine ainsi que le ratio trypsine/cathepsine dans la glande digestive de pré-recrues de seiche *Sepia officinalis* récoltées dans trois sites de ponte en Manche en 2010 (graphes A, C et E) et 2011 (graphes B, D et F) (valeurs en moyenne ± se, n=10/site/année). AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine, TB : Torbay. Les tests de significativité ont été faits entre sites et entre années pour chaque activité enzymatique séparée (ANOVA à 2 facteurs). Les barres ne portant pas la même lettre sont significativement différentes (p < 0.05).

#### 2. Activités et ratios enzymatiques dans la glande digestive des pré-recrues de seiche

#### Trypsine, cathepsine et ratio trypsine/cathepsine

L'activité de la trypsine était variable dans la glande digestive des pré-recrues en fonction de leur site de provenance, du mois de collecte et de l'année. En décembre 2010 (**Figure 36A**), l'activité de la trypsine dans la glande digestive des pré-recrues de TB était significativement supérieure (p < 0.05) à celle retrouvée chez les pré-recrues d'AC et de BS, collectées respectivement le 08 et le 09 septembre de la même année. Cependant, l'activité de la trypsine des pré-recrues de TB 2010 n'était pas différente (p > 0.05) de celle des activités retrouvées en 2011 (**Figure 36B**). Pour les pré-recrues de BS 2010, l'activité de la trypsine n'était pas différente (p > 0.05) de celle d'AC 2010 et de BS 2011 (collectées le 03 novembre 2011).

L'activité de la cathepsine (**Figures 36C et 36D**) était inversement proportionnelle à l'activité de la trypsine. En effet, l'activité de la cathepsine était significativement (p < 0.05) supérieure dans la glande digestive des pré-recrues de BS et AC en septembre 2010 comparé aux activités retrouvées chez les pré-recrues de TB en décembre 2010 ainsi que de TB (décembre 2011) et d'AC (novembre 2011). Cependant, l'activité des pré-recrues de BS et de AC 2010 n'était pas différente (p > 0.05) de celle des pré-recrues de BS (novembre 2011).

Le ratio de l'activité des enzymes trypsine/cathepsine (**Figures 36E et 36F**) avait un profil similaire à celui de l'activité de la trypsine avec néanmoins une meilleure discrimination des groupes. Les ratios des pré-recrues de BS et d'AC 2010 étaient significativement (p < 0.05) inférieurs à tous les autres et celles de BS 2011 avaient un ratio significativement inférieur (p < 0.05) à celui des prérecrues de TB 2010 et 2011. Une constance est notée dans le ratio entre les deux années pour le site de TB. Ce ratio constant est la résultante d'un maintien du même niveau d'activité de la trypsine et de la cathepsine pour ce site entre les deux années étudiées. De même, on observe trois groupes de ratio avec le ratio le plus faible pour les pré-recrues collectées en septembre 2010 (AC du 08-09-10 et BS du 09-09-10) qui est inférieur à 0.5. Un deuxième groupe de ratio correspondant aux pré-recrues récoltées au mois de novembre (BS du 03-11-11 et AC du 04-11-11) ayant des valeurs comprises entre 1 et 2. Enfin un troisième groupe concerne les pré-recrues de TB collectées en décembre des deux années avec des valeurs supérieures à 2.



Figure 37 : Activités des phosphatases acides (ACP) et alcalines (ALP) et du ratio ALP/ACP dans la glande digestive des pré-recrues de seiche *Sepia officinalis* récoltées dans trois sites de ponte en Manche en 2010 (graphes A, C et E) et 2011 (graphes B, D et F) (valeurs en moyenne ± se, n=10/site/année). AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine, TB : Torbay. Les tests de significativité ont été faits entre sites et entre années pour chaque activité enzymatique séparée (ANOVA à 2 facteurs). Les barres ne portant pas la même lettre sont significativement différentes (p < 0.05).

#### ALP, ACP et ratio ALP/ACP

L'activité ALP retrouvée dans la glande digestive des pré-recrues de seiche en 2010 (**Figure 37A**) n'était pas significativement différente (p > 0.05) entre les trois sites avec des valeurs allant de 3 UI.mg prot<sup>-1</sup> à 6 UI.mg prot<sup>-1</sup>. En 2011 (**Figure 37B**) aucune différence (p > 0.05) a été relevée entre les sites avec des valeurs allant en moyenne de 2.9 UI.mg prot<sup>-1</sup> à 3.7 UI.mg prot<sup>-1</sup>. La comparaison des activités entre les deux années a révélé une activité ALP significativement supérieure (p < 0.05) dans la glande digestive des pré-recrues de TB 2010 comparée aux activités retrouvées pour BS et TB 2011.

Une première différence a été observée dans l'activité ACP mesurée dans la glande digestive des pré-recrues de BS en septembre 2010 étant la plus élevée, et cette dernière était supérieure (p < 0.05) aux activités retrouvées dans la glande digestive des pré-recrues de 2011 mais n'était pas significativement (p > 0.05) supérieure à celles des pré-recrues d'AC et TB 2010 (**Figures 37C et 37D**). Une seconde différence significative (p < 0.05) a été observée chez les pré-recrues de TB entre les deux années avec une activité ACP supérieure en 2010 par rapport à 2011.

Pour chacun des 3 sites, le ratio ALP/ACP des pré-recrues (**Figures 37E et 37F**) était similaire entre les deux années. Ce ratio était inférieur (p < 0.05) pour les pré-recrues de BS comparé aux prérecrues TB et n'était pas différent (p > 0.05) entre BS et AC. La différence de ratio entre AC et TB était uniquement significative (p < 0.05) en 2011.

### 3. Corrélations entre les activités enzymatiques digestives, le poids et la taille des prérecrues

#### *Trypsine, cathepsine et ratio trypsine/cathepsine*

L'activité de la trypsine était positivement corrélée (p = 0.04) avec le poids des pré-recrues récoltées dans les différents sites en 2010 et 2011 (**Tableau 18**) mais pas significativement corrélée (p > 0.05) avec la taille des pré-recrues. En revanche, l'activité de la cathepsine et le ratio trypsine/cathepsine étaient corrélés avec la taille et le poids.

#### ALP, ACP et ratio ALP/ACP

Les activités des phosphatases acides et alcalines ainsi que le ratio ALP/ACP, ne présentaient pas de corrélations significatives (p > 0.05) avec le poids et la taille des pré-recrues (p > 0.05) (**Tableau 18**).

Tableau 18 : Corrélations des activités enzymatiques digestives (UI.mg prot<sup>-1</sup>) et des ratios enzymatiques avec le poids (g) et la taille (mm) des pré-recrues de seiche *Sepia officinalis* récoltées dans différents sites côtiers en Manche. Les sites de collecte sont : Agon Coutainville (AC), Baie de Seine (BS) et Torbay (TB).

Relat					
Variables	variables	d.l.	F-stat	Corrélation	p-value
dépendantes	explicatives				
Trypsine	Poids	4	8.4	+	0.04*
,	Taille	4	6.9	+	0.06 <sup>NS</sup>
Cathepsine	Poids	4	17.1	-	0.01*
	Taille	4	15.4	-	0.02*
Trypsine/	Poids	4	10.1	+	0.03*
cathepsine	Taille	4	8.5	+	0.04
ALP	Poids	4	0.9	x	0.4 <sup>NS</sup>
	Taille	4	0.9	Х	0.4 <sup>NS</sup>
ACP	Poids	4	7.9	-	0.05 <sup>NS</sup>
	Taille	4	6.7	-	0.06 <sup>NS</sup>
ALP/ACP	Poids	4	1.6	x	0.3 <sup>NS</sup>
	Taille	4	1.3	Х	0.3 <sup>NS</sup>

+: Correlation positive

\* : significatif (p < 0.05)

- : Correlation négative

NS : non significatif (p > 0.05) d.l. : degré de liberté

X : Pas de correlation

#### **D.** Discussion

Le dosage des activités enzymatiques digestives sur les œufs des différents sites étudiés n'a pas révélé de différence entre les lots. Dans cette étude, nous avons choisi d'effectuer les dosages sur des groupes d'œufs de différents stades de développement en prenant soin à ce que les groupes soient comparables entres sites. Ceci implique pour chaque groupe d'œufs d'un site donné, un mélange des différents stades de développement embryonnaire pour une mesure d'activité enzymatique. L'absence de différence significative entre lots est donc due à ces groupements d'œufs de différents stades embryonnaires. Lacoue-Labarthe *et al.* (2010b) ont étudié l'évolution des activités de la cathepsine et des ACP dans les œufs de seiche. Ces auteurs décrivent une augmentation progressive et significative de l'activité ACP de la ponte jusqu'à l'éclosion. Quant à l'activité de la cathepsine, ces auteurs montrent également des différences significatives entre les stades de développement embryonnaire se reflètent par une absence de différences entre les lots d'œufs due à une importante variabilité des valeurs obtenues.

Les pré-recrues de seiche ont été prélevées à l'automne avant la migration des animaux vers le large, à Agon Coutainville, Baie de Seine et Torbay en 2010 et 2011. Les glandes digestives ont été ensuite récupérées sur les animaux possédant un estomac et un caecum remplis de liquide, ce stade est facilement identifiable se situant généralement 3h après la prise de nourriture (Boucaud-Camou, 1973). Les activités enzymatiques digestives dosées étaient variables d'une période à l'autre et d'un site à l'autre. Les activités de la trypsine et de la cathepsine ont révélé respectivement une corrélation positive et négative avec le poids des jeunes animaux alors que les activités ALP et ACP n'ont pas présenté de corrélations significatives (p > 0.05). Perrin (2004) a mesuré les activités de la trypsine et des ACP dans la glande digestive de pré-recrues provenant de différentes zones et sur plusieurs dates entre les mois de juillet et août. Les pré-recrues choisies étaient au même stade de digestion que les nôtres. Cet auteur a observé qu'une augmentation du poids des pré-recrues en fonction des mois de collecte était corrélée avec une augmentation de l'activité de la trypsine mais non corrélée à l'activité ACP qui restait stable dans le temps. Cet auteur conclut que le couplage de ces deux activités permettrait de diagnostiquer l'état nutritionnel des seiches en milieu naturel. L'évolution des activités de la trypsine et des ACP observés sont comparable avec les descriptions faites par Perrin (2004). Quant à l'activité de la

cathepsine, la diminution d'activité observée est déjà décrite au premier mois post-éclosion (Chapitre 2-II) et cette diminution semble donc se poursuivre au delà d'un mois post-éclosion ce qui induit une augmentation du ratio trypsine/cathepsine. L'étude des ratios enzymatiques a permis de mettre en évidence des corrélations intéressantes. En effet, nous avons remarqué une augmentation des ratios trypsine/cathepsine en relation avec l'augmentation des poids des individus avec une meilleure corrélation que l'activité de la trypsine seule. Quant au ratio ALP/ACP, la signature de ce rapport enzymatique est stable inter-annuellement au sein de chaque site.

L'utilisation des ratios (e.g. ratios lipoprotéiques ou enzymatiques) en tant qu'indice de santé, d'âge ou de sexe est souvent utilisée chez l'homme. Une augmentation du rapport LDL/HDL (respectivement lipoprotéines de basse et de haute densité) augmente le risque des maladies cardiovasculaires (Soska et al., 2012) et l'étude de longue date de ce rapport a permis de définir des valeurs permettant de réduire les risques de maladies (Fukuda et al., 2011). Hormis, les ratios lipoprotéiques, des rapports d'activités enzymatiques (e.g. aspartate aminotransférase (AST)/ alanine aminotransférase (ALT), superoxyde dismutase (SOD)/ glutathionne peroxydase (GPx) ou glutathionne réductase (GR)/ GPx) sont aussi utilisés en tant qu'indices de santé ou d'âge. Le rapport enzymatique AST/ALT est un des marqueurs non invasif utilisé pour l'évaluation de la fibrose hépatique dans le cas des hépatites B (Shin et al., 2008) et C (Fabris et al., 2006). Ces marqueurs permettent d'éviter les biopsies du foie pour les patients. La GPx, la GR et la SOD sont des enzymes antioxydatives qui jouent un rôle crucial dans la protection de l'organisme contre le stress oxydatif lié à l'âge. Ozturk et al. (2012) ont montré que l'étude des ratios de ces enzymes était plus adaptée et mettait mieux en évidence l'effet du stress oxydatif lié à l'âge comparé à l'étude séparée de ces enzymes. Nous avons mis en évidence une corrélation entre le ratio trypsine/cathepsine et le poids des individus récoltés. La comparaison des ratios des pré-recrues avec ceux des juvéniles post-éclosions (Chapitre 2 - II) montre un continuum de cette augmentation du ratio en corrélation avec le poids (Figure 38). Cependant, l'étude détaillée de la corrélation trypsine/cathepsine avec le poids révèle la présence d'autres facteurs en jeu faisant varier ce ratio. En effet, en intégrant le facteur site, on observe des différences de ratio pour un même poids (sites français en novembre) voire une inversion du ratio en relation avec le poids (sites français en septembre) (Figure 38). L'âge des individus pourrait être un facteur clé pour expliquer ces différences relevées.



Figure 38 : Graphe récapitulatif des ratios trypsine/cathepsine en fonction des mois d'étude et des poids moyens (g) des seiches. Juillet: correspond aux ratios obtenus pour les juvéniles d'élevage âgés de moins de 14 jours, Août: correspond aux ratios obtenus pour les juvéniles d'élevage âgés de 21 à 35 jours, Septembre à Décembre: ratios obtenus dans l'étude des activités enzymatiques de la glande digestive des pré-recrues collectées dans les différents sites de ponte. ). AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine, TB : Torbay. Les barres ne portant pas la même lettre sont significativement différentes (p < 0.05).

Pour confirmer la corrélation entre le ratio trypsine/cathepsine et l'âge des individus, un suivi de l'évolution du ratio est nécessaire, en milieu contrôlé, sur plusieurs mois post-éclosion. Cette perspective est intéressante au vu de la complexité, encore aujourd'hui, de déterminer l'âge des individus collectés dans le milieu naturel.

Le second ratio étudié était celui des enzymes ALP/ACP. L'étude de ce ratio est prometteuse pour une discrimination spatiale des individus collectés. Le ratio ALP/ACP a montré une augmentation en fonction de l'âge et du poids des individus au premier mois post-éclosion (Chapitre 2-II) pendant la maturation du système digestif (Bouchaud-Camou et Yim, 1980). Mais cette corrélation avec le poids et probablement l'âge n'était plus visible chez les pré-recrues avec des poids plus importants. Le ratio ALP/ACP semble se stabiliser une fois que la maturation de la glande digestive est complète. Le rapport de ces deux activités enzymatiques pourrait représenter une signature locale liée au régime alimentaire. En effet, la signature de ce ratio sur deux ans était stable dans chaque site et significativement différente entre certains sites. Le ratio de ces enzymes pourrait donc agir de la même manière que les ratios d'isotopes stables pouvant discriminer des individus d'origine spatiale différente liée à des régimes alimentaires différents (Lefebvre *et al.*, 2009). Toutefois, pour pouvoir utiliser ce ratio en tant que signature de l'origine des pré-recrues, il est nécessaire de valider ces observations en augmentant le nombre d'échantillons étudiés. De plus, afin d'utiliser les résultats de ce ratio en dehors des zones de ponte côtières, il faudrait approfondir sur l'évolution de ce ratio après la migration des pré-recrues vers la zone centrale de la Manche, événements marqués par un changement de source alimentaire.

Les pré-recrues des deux sites français ont montré une inversion des rapports de poids (Chapitre 1-III) en comparaison avec la distribution des poids, observée en milieu expérimental (Chapitre 1-II). L'étude des activités enzymatiques digestives n'a pas permis de mettre en évidence des différences significatives dans les performances digestives entre ces deux sites.

#### E. Conclusion

Le dosage des activités enzymatiques digestives [*i.e.* trypsine, cathepsine, et phosphatases acides (ACP) et alcalines (ALP)] et leurs ratios effectués sur les œufs de seiche n'ont pas révélé de différences liées aux sites d'origine ou à l'année de collecte. De même, pour les pré-recrues, les dosages enzymatiques dans la glande digestive [i.e. trypsine, cathepsine, ACP et ALP] n'ont pas établis une corrélation entre ces activités et les performances de croissance dans le milieu naturel. Cependant, les résultats obtenus ont permis d'avoir une description de l'évolution des activités enzymatiques digestives au-delà du premier mois post-éclosion et de développer des outils pouvant servir à déterminer l'âge et l'origine des individus pêchés. Concernant l'évolution des activités enzymatiques après le premier mois post-éclosion, nous avons pu montrer que l'activité de la trypsine augmente avec le poids des pré-recrues alors que l'activité cathepsine diminue avec le poids des individus (comparaison entre les activités des pré-recrues des sites français entre 2010 et 2011). Ces variations ne sont pas observées pour les activités ACP et ALP ou aucune corrélation avec l'évolution des poids n'a été enregistrée. L'évolution du ratio trypsine/cathepsine a montré un lien possible avec l'âge des animaux. Quant au ratio ALP/ACP, celui-ci pourrait être un indicateur spatial étant donné que ce ratio s'est révélé stable pour chaque site entre les deux années d'étude.

#### **IV.** CONCLUSION

La maturation de la glande digestive est une étape clé dans la croissance et la survie des juvéniles de seiche. Le but de ce chapitre était d'évaluer la maturation du système digestif des juvéniles de seiche en fonction de leur site de provenance tout en décrivant les profils des activités enzymatiques digestives en relation avec des observations histologiques de la glande digestive. Trois approches ont été menées pour la comparaison des performances des seiches aux premiers stades de leur vie.

La première approche concerne les œufs collectés dans les quatre sites de ponte. L'étude des activités enzymatiques digestives n'a pas révélé de différences entre les lots d'œufs (**Figure 39**). Ceci est dû à une homogénéisation des œufs de différents stades de développement embryonnaire, induisant une augmentation des variabilités au sein de chaque groupe et réduisant par conséquent les différences entre les sites.

La deuxième approche s'est intéressée aux nouveau-nés au cours du premier mois post-éclosion. Deux phases de transition existent pendant cette première période de croissance des juvéniles : une phase passant d'un mode de digestion « embryonnaire » vers un mode de digestion dit « post-embryonnaire » au cours de la première semaine d'éclosion suivie d'une seconde phase passant du mode « post-embryonnaire » vers un système digestif « juvénile-adulte » mature. Les variabilités spatiales de la maturation du système digestif sont surtout marquées au niveau de la première phase de transition (0 – 7 DAH) et visible jusqu'à 14 DAH. A l'éclosion, des différences significatives au niveau des performances digestives des juvéniles sont observées entre les différents sites de ponte étudiés. Le vitellus interne, caractéristique de la plupart des céphalopodes à l'éclosion, est plus important chez les nouveau-nés de Selsey (SE) suivi par ceux d'Agon Coutainville (AC) puis ceux de Baie de Seine (BS) et Torbay (TB) (**Figure 39**). Ces réserves vitellines sont inversement proportionnelles au développement de la glande digestive (DGD). Ces observations histologiques sont fortement corrélées aux activités enzymatiques avec des activités intracellulaires acides plus importantes chez les individus ayant plus de réserves vitellines et des ratios d'activités enzymatiques alcalines/acides plus importantes avec un DGD plus avancé.



Figure 39: Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus sur les variations spatiales des performances digestifs des œufs, des juvéniles et des pré-recrues de seiche *Sepia officinalis* en Manche. ALP/ACP : Ratio des phosphatases alcalines/acides, DAH : Jours post-éclosion.

Ces constatations sont primordiales puisqu'elles montrent des variabilités spatiales pouvant avoir un impact sur les populations locales des sites de ponte et donc sur la contribution des sites au stock de seiche en Manche. En effet, le vitellus interne permet aux nouveau-nés de survivre les premiers jours post-éclosion sans alimentation externe. Pour les individus ayant une quantité de réserves plus importante, les chances de survie au cours de ces premiers jours sont plus grandes. Cependant, si les proies sont abondantes, l'avantage est alors aux individus ayant un DGD plus avancé, qui ont ainsi de meilleures performances de croissance. Les différences dans les activités enzymatiques sont marquées à 0 DAH et restent visibles jusqu'à 14 DAH (**Figure 39**). Au cours de la deuxième phase de transition (14-35 jours), les différences spatiales des performances digestives (*i.e.* activités enzymatiques de la trypsine, cathepsine et des phosphatases acides et alcalines) disparaissent à cause de l'alimentation et des conditions d'élevage identiques (**Figure 39**).

Quant à la troisième approche, relative aux pré-recrues, les activités enzymatiques sont variables avec mise en évidence de corrélations entre les activités enzymatiques de la trypsine et des cathepsines, avec le poids des individus, mais pas pour les phosphatases acides (ACP) et alcalines (ALP). Le ratio ALP/ACP est le plus élevé à TB suivi d'AC puis de BS (**Figure 39**).

Les travaux de ce chapitre ont permis d'obtenir une description plus détaillée des évolutions enzymatiques digestives au premier mois post-éclosion (**Figure 40A**) et d'avoir une meilleure idée de l'évolution de ces enzymes sur plusieurs mois post-éclosion avec l'étude des pré-recrues (**Figure 40B**). Une importante variation des activités enzymatiques acides est constatée au cours du premier mois post-éclosion, liée d'un côté à la présence de vitellus interne et à sa digestion, et de l'autre, à la maturation du système digestif où la digestion initialement à prédominance acide va progressivement être remplacée par une digestion extracellulaire alcaline. Ces phénomènes se traduisent par une augmentation des activités enzymatiques acides (*i.e.* ACP et cathepsine) au cours de la première semaine post-éclosion puis une diminution de ces activités jusqu'à 35 jours post-éclosion (**Figure 40A**). L'étude des activités enzymatiques acides chez les pré-recrues montre que ces activités continuent à diminuer au-delà de 35 jours post-éclosion avec une diminution plus importante pour la cathepsine. Parallèlement, les activités enzymatiques alcalines (*i.e.* trypsine et ALP) augmentent. Cette augmentation, peu marquée au cours des 35 jours post-éclosion, est mieux observée avec celle des poids des pré-recrues et est surtout marquée pour l'activité trypsine (**Figure 40B**). Pour l'ALP, comme pour l'ACP, une phase de stabilisation de ces activités

enzymatiques semble se faire plus précocement dans la glande digestive des pré-recrues, comparé à celles des deux autres activités enzymatiques (i.e. trypsine et cathpesine) (**Figure 40B**).



ACP ALP ATrypsine Cathepsine



L'augmentation tardive de la trypsine avec une diminution aussi plus tardive pour la cathepsine comparé aux activités ALP et ACP confère au ratio trypsine/cathepsine une corrélation avec le poids des individus (**Figure 41A**). Mais le poids n'est pas le seul facteur en jeu. L'âge pourrait jouer un rôle sur l'évolution des enzymes de ce ratio. La relation âge-ratio trypsine/cathepsine est observée au premier mois post-éclosion où la moyenne des ratios obtenus au mois de juillet (âge des individus : 0 - 14 jours post-éclosion) est légèrement inférieure à celles des ratios obtenus au mois d'août (âge des individus : 21 - 35 jours post-éclosion). Mais ce ratio serait mieux adapté pour des tranches d'âge plus espacées (échelle des mois) (**Figure 41A**). Finalement, l'étude du ratio ALP/ACP a permis de mettre en évidence un rôle potentiel de signature spatiale de ce ratio (**Figure 41B**). Ce ratio est le plus élevé chez les pré-recrues de TB et le plus faible chez celles de BS. Les pré-recrues d'AC ayant un ratio intermédiaire.



Figure 41 : Evolution des ratios des activités enzymatiques digestives aux premiers mois de développement post-éclosion des juvéniles de seiche *Sepia officinalis*. A- Ratio trypsine/cathepsine ; B- Ratio phosphatases alcalines (ALP) /acides (ACP). Les résultats des mois de juillet et août correspondent aux données obtenus en milieu expérimental. Pour les mois suivants, les résultats ont été obtenus sur des pré-recrues récoltées en milieu naturel.

# CHAPITRE 3 :

# Etude du système immunitaire chez Sepia officinalis

#### I. INTRODUCTION

#### A. Immunité et système immunitaire

L'immunité fait référence aux mécanismes de défense d'un organisme vivant contre des agents étrangers, notamment infectieux, susceptibles de menacer son bon fonctionnement ou sa survie. L'ensemble des cellules, des tissus et des molécules qui concourent à opposer une résistance aux infections est appelé système immunitaire (www.medecine.ups-tlse.fr). Deux sortes d'immunité sont décrites formant deux systèmes de défense : l'immunité innée et l'immunité acquise ou adaptative.

#### 1. Immunité innée

L'immunité innée, connue aussi sous le nom d'immunité « non adaptative », correspond à une réponse constitutive d'action immédiate, non spécifique de l'agent pathogène. Elle repose sur une distinction globale du soi et du non-soi. Les cellules de l'immunité innée expriment un ensemble de récepteurs capables de reconnaître les motifs moléculaires associés aux pathogènes ou PAMPS (Pathogen Associated Molecular Patterns) (Smith, 2010, www.medecine.ups-tlse.fr).

#### 2. Immunité acquise

L'immunité acquise est apparue il y a environ 500 millions d'années chez les premiers vertébrés. Cette réponse est spécifique de l'antigène du fait que les cellules de l'immunité adaptative, les lymphocytes, portent un seul type de récepteur capable de reconnaître un déterminant antigénique (ou épitope). La réponse adaptative est limitée dans le temps à l'éradication de l'agresseur dont elle garde la mémoire. Elle repose sur une distinction très fine du non-soi (www.medecine.ups-tlse.fr).

Chez les céphalopodes, la seule immunité décrite est l'immunité innée.

#### B. Les principaux paramètres du système immunitaire inné

Le système immunitaire inné est un système naturel et non spécifique commun à tous les organismes pluricellulaires (Bols *et al.,* 2001). Les principaux paramètres de ce système sont : les paramètres physiques, les paramètres cellulaires et les paramètres humoraux (Magnadottir, 2006) (**Figure 42**).



Figure 42 : Schéma représentant les deux systèmes immunitaires ainsi que les différentes barrières contre les infections microbiennes. (D'après Turvey, 2010)

#### 1. Les paramètres physiques

La première barrière contre les infections microbiennes (*i.e.* bactéries, champignons, virus et protozoaires) est la membrane muqueuse, directement en contact avec le milieu extérieur (peau, branchies essentiellement et membranes des différents organes en moindre mesure) (Bols *et al.*, 2001). Cette barrière physique sécrète aussi des agents antimicrobiens. Les cellules muqueuses synthétisent le mucus qui a au moins trois rôles défensifs importants. Le mucus interrompt la fixation des microbes par une desquamation continuelle. Si l'établissement microbien est accompli, le mucus jouera le rôle de piège efficace. Le mucus de la peau et des autres surfaces contiennent une variété de molécules humorales impliquées dans l'immunité telles que des lectines, des pentraxines, des lysozymes, des protéines du complément et des peptides antimicrobiens (Bols *et al.*, 2001 ; Magnadottir, 2006).

#### 2. Les paramètres cellulaires

Les cellules du système immunitaire inné comprennent principalement les cellules phagocytaires, les cellules inflammatoires et les cellules cytotoxiques (Bols *et al.*, 2001 ; Le Bihan, 2006). Chez les poissons, les cellules du système de défense non spécifique sont les leucocytes phagocytaires (granulocytes, monocytes et macrophages), les cellules du système réticuloendothélial et les

cellules cytotoxiques non spécifiques (Bols *et al.,* 2001). Chez les invertébrés, les cellules circulantes sont les principales médiatrices de l'immunité assurant la phagocytose, l'encapsulation et les sécrétions de molécules bactéricides par exocytose (Smith, 2010) (**Figure 43**).



Figure 43 : Schéma représentant les activités des cellules immunitaires d'invertébrés à la suite de l'entrée d'agents pathogènes dans le corps. Les flèches pleines correspondent à des changements ou des comportements cellulaires, la flèche en tirets indique les possibles morts cellulaires et la flèche pointillée avec un encadrement montre un grossissement des détails de la fusion des vésicules lysosomales avec le phagosome. (D'après Smith, 2010)

Différents types de cellules ont été décrites. Les schémas de classification de ces cellules ont été basés sur des différences morphologiques entre les types cellulaires, tels que les variations de tailles, de formes, le degré de granulation, la présence de pigments ainsi que les colorations cytochimiques. Ainsi 2 types d'amoebocytes sont trouvés chez les cnidaires et 1 chez les chélicérates, 4 types de coelomocytes chez les annélides, 5 chez les ascidies et les échinodermes, 3 types d'haemocytes chez les crustacés, 2 chez les mollusques et 6 chez les insectes (Smith, 2010).

#### 3. Les paramètres humoraux

Les paramètres humoraux (mécanismes de défense non cellulaire et non spécifique) sont principalement des protéines ou des glycoprotéines qui inhibent la croissance des pathogènes microbiens et sont retrouvés au niveau du sérum, du mucus et des œufs de poissons (Bols et al., 2001). Parmi les facteurs humoraux sont retrouvés les inhibiteurs de protéases, présents dans le sérum, impliqués dans la phase de réaction aigüe et la défense contre les pathogènes. En effet, de nombreux pathogènes sécrètent des enzymes protéolytiques (Magnadottir, 2006). Ce système comprend aussi les enzymes lytiques telles que : le système prophénoloxydase, la voie lytique du complément et le lysozyme, qui sont des éléments importants de défense, principalement contre les bactéries (Le Bihan, 2006). Le système prophénoloxydase inclut une série d'enzymes activant la cascade de la phénoloxydase. Cette succession enzymatique a le pouvoir d'encapsuler les bactéries et les pathogènes, provoquant ainsi leur mort. La coagulation est aussi induite par cette voie enzymatique (Petranyi, 2002). Le système du complément représente une famille de plus de 35 protéines sériques et de récepteurs cellulaires de surface qui agissent en cascade, menant à des fonctions innées, telles que l'inflammation, et pouvant améliorer l'immunité adaptative (Boshra et al., 2006; Carroll, 2008). Ce système peut être activé par trois voies (i.e. classique, lectine ou alternative) qui ne sont pas distinctes l'une de l'autre mais pouvant se chevaucher. Par exemple, la voie alternative amplifie les deux autres voies (i.e. lectine et classique) (Carroll, 2008). Cependant, le déclenchement se fait différemment selon le type de voie. La voie classique est généralement initiée par le complexe antigène-anticorps quand l'immunité « acquise » est présente, la voie alternative correspond à une activation spontanée du complément et la voie des lectines requiert l'interaction de lectines avec les sucres de la paroi des microbes (Boshra et al., 2006). Quant au lysozyme, cette enzyme fragilise les parois cellulaires des bactéries en coupant des liaisons glycosidiques dans les couches peptidoglycanes. Le lysozyme agit directement sur la paroi des bactéries Gram positives ainsi que sur les couches internes des peptidoglycanes des bactéries Gram négatives après que le complément et d'autres enzymes aient préalablement fragilisé les couches externes (Bols et al., 2001). Cette enzyme est un paramètre essentiel de la défense immunitaire chez les vertébrés et les invertébrés et est connue pour activer le système du complément et les phagocytes (Magnadottir, 2006).

Tous ces composants de l'immunité innée constituent la première défense immunitaire des invertébrés et des vertébrés contre les pathogènes. Les systèmes immuns innés, en particulier les activités lysozomales et lytiques, sont utilisés en tant qu'indicateurs de l'impact des facteurs externes sur le système immunitaire et la résistance aux maladies (Magnadottir, 2006).
#### C. Immunobiologie des céphalopodes et de la seiche

Les céphalopodes possèdent un système circulatoire clos. Un seul type de cellules libres se trouve dans le sang (ou haemolymphe), les haemocytes (ou leucocytes ou amoebocytes) (Mangold et Bidder, 1989b). Le noyau de ces cellules est grand, bilobé ou en forme de croissant (**Figure 44**).



Figure 44 : Haemocytes de juvéniles de seiche *Sepia officinalis* (< 30 jours post-éclosion) observées en microscopie optique (objectif x 100). (Photos personnelles)

Les haemocytes sont formés dans un organe lymphoïde, le corps blanc, situé de chaque côté dans le sinus sanguin de l'orbite, entourant le lobe et les nerfs optiques. La taille de cet organe varie selon les espèces et selon l'état physiologique des animaux (Mangold et Bidder, 1989b). Claes (1996) a décrit les cellules qui composent le corps blanc chez *S. officinalis*. Cet auteur observe une population cellulaire morphologiquement hétérogène mais ces différences cytologiques

représentent en effet différents stades de développement d'une seule lignée cellulaire (**Figure 45**). Quatre stades de développement ont été reconnus : les haemocytoblastes (stade initial), les leucoblastes primaires et secondaires (stades intermédiaires) et haemocytes (cellule mature). Ces auteurs notent également que la transition entre les stades implique une réduction de la taille des cellules et une réorganisation du matériel nucléaire avec une condensation de la chromatine. Finalement, les caractéristiques ultra-structurelles de ces cellules (phagosomes, inclusions lysosomales et abondance des vesicules) indiquent que ces cellules phagocytaires sont actives.



## Figure 45 : Schéma proposé par Claes (1996) des différentes étapes de la maturation des haemocytes de seiche *Sepia officinalis*.

Ces cellules phagocytaires vont donc jouer un rôle important dans la protection de l'organisme contre les agents pathogènes. Cependant, Beuerlein et Schipp (1998) *ont* montré que les cellules ovoïdes des cœurs branchiaux de *S. officinalis* pouvaient aussi phagocyter des substances nocives en même temps que les haemocytes circulants et adhésifs des cœurs branchiaux.

Les paramètres humoraux sont aussi retrouvés chez les céphalopodes. Malham *et al.* (1998) *ont* montré la présence de lysozymes et d'antiprotéases (inhibiteurs de protéases) dans les haemocytes et dans l'haemolymphe de la pieuvre *Eledone cirrhosa* mais aussi au niveau de différents organes de cet animal. Lacoue-Labarthe *et al.* (2009a) ont mis en évidence une activation du complexe phénoloxydase chez les embryons de *S. officinalis*. Toutefois, les études chez les céphalopodes, portant sur les enzymes du système humoral, restent rares.

Les céphalopodes n'ont pas de coagulation sanguine. Pour éviter les saignements après une blessure, une vasoconstriction du muscle entourant la plaie est observée puis un agrégat

d'haemocytes (cellules sanguines) vient obstruer la blessure en formant un bouchon (Malham, 1996).

#### D. Infections, parasitisme et pollution

Les parasites et symbiontes des céphalopodes sont très diversifiés et sont en majeure partie connus des poissons marins (Hochberg, 1989). Parmi eux sont retrouvés les virus, les bactéries et les champignons mais aussi des protozoaires, des dicyémides (propres aux céphalopodes), des ciliés, des plathelminthes, des nématodes, des annélides et des arthropodes. Mais depuis le développement et l'expansion des activités industrielles humaines, d'autres paramètres sont rentrés en jeu pouvant affecter la santé des animaux marins : les polluants. Ces substances écotoxicologiques sont diverses (toxines, métaux lourds), et ont deux propriétés générales : elles sont déversées dans l'environnement et peuvent impacter les écosystèmes à des concentrations relativement faibles (Bols et al., 2001). Les infections bactériennes induisent des modifications chez les céphalopodes au niveau du nombre d'haemocytes circulants mais aussi au niveau du système humorale (i.e. lysozyme, antiprotéase) (Malham et al., 1998). Les polluants sensibilisent la stimulation du métabolisme oxydatif des phagocytes, altèrent la production de mucus externe et modulent le niveau d'activité de certaines enzymes (i.e. lysozyme) qui peuvent être stimulées ou inhibées chez le poisson (Bols et al., 2001). Chez la seiche, il a été montré une accumulation de métaux lourds dans les œufs de Sepia (Lacoue-Labarthe et al., 2008a, 2009b, 2010a) et un transfert de ces métaux de la mère dans les œufs (Lacoue-Labarthe et al., 2008b). Ces métaux peuvent perturber l'activité des enzymes immunitaires humorales comme décrit par Lacoue-Labarthe et al. (2009a) chez l'embryon de S. officinalis.

#### E. But de l'étude

Les bio-marqueurs sont définis comme étant des mesures effectuées sur des fluides corporels, des cellules, des tissus ou sur des animaux entiers, pouvant indiquer la présence de perturbations ou de contaminants par des approches biochimiques, cellulaires, physiologiques, comportementales ou énergétiques (Luna-Acosta *et al.,* 2010b). Les enzymes (*i.e.* antiprotéases, lysozymes et phénoloxydases) peuvent être utilisées en tant que bio-marqueurs pour détecter les signaux

sensibles des effets délétères des contaminations environnementales (Luna-Acosta *et al.,* 2010b). Ces contaminations peuvent être d'origine naturelle ou anthropique.

Le but de cette étude était d'étudier différentes enzymes importantes dans le système immunitaire (*i.e.* antiprotéases, lysozymes et phénoloxydases) pour améliorer la connaissance de la distribution de ces facteurs humoraux chez *S. officinalis*. Ensuite, adapter ces méthodes de dosages enzymatiques aux jeunes stades de cette espèce. Enfin, appliquer ces dosages aux œufs, aux juvéniles et aux pré-recrues collectées pour l'étude de la variabilité spatio-temporelle du système immunitaire.

Ce chapitre s'articulera autour de deux axes :

- La répartition des activités des antiprotéases, des lysozymes et des phénoloxydases dans les principaux tissus de la seiche commune *Sepia officinalis* L.
  (Cette première partie a fait l'objet d'une publication soumise dans le journal « Comparative Biochemistry and Physiology : Part B »)
- Etude de l'activité lysozomale dans les œufs, les juvéniles et les pré-recrues de seiche.

## II. ACTIVITES ANTIPROTEASE, LYSOZYME ET PHENOLOXIDASE DANS LES PRINCIPAUX TISSUES DE LA SEICHE SEPIA OFFICINALIS L.

#### <u>Résumé:</u>

Cette étude a porté sur trois activités enzymatiques (*i.e.* antiprotéase, lysozyme-like et phénoloxydase) dans treize des principaux organes de la seiche commune *Sepia officinalis*. Ces organes ont été prélevés sur 10 individus puis les activités enzymatiques ont été mesurées afin de décrire leur distribution dans ces différents organes.

L'activité antiprotéasique est principalement localisée dans les organes du système digestif de la seiche (*i.e.* glande digestive, appendices de la glande digestive, caecum et estomac) où cette activité serait essentiellement régulatrice des protéases endogènes présentes dans ces organes. Les activités des phénoloxydases (PO) et des prophénoloxydases (pro-PO) sont réparties différemment. En effet, à l'exception du manteau, l'activité PO est omniprésente dans l'ensemble des tissus prélevés chez *Sepia* alors que l'activité pro-PO est principalement associée aux organes jouant un rôle important dans le système immunitaire et circulatoire (*i.e.* cœurs branchiaux, appendices des cœurs branchiaux, cœur central, branchies, corps blanc et lobes optiques). L'activité lysozymale est localisée, comme pour la pro-PO, dans les organes des systèmes circulatoire et immunitaire mais aussi au niveau des tissus en contact avec le milieu extérieur [i.e. peau, manteau et glandes salivaires postérieures (dont les sécrétions sont évacuées dans la cavité buccale)].

Cette étude met en évidence, pour la première fois, la distribution des activités des lysozymes, des antiprotéases et des PO/pro-PO dans les tissus de *S. officinalis* et fournit ainsi la base fondamentale pour une meilleure compréhension du fonctionnement du système immunitaire chez cette espèce.

# Antiprotease, lysozyme and phenoloxidase activities in main tissues of cuttlefish *Sepia officinalis* L.

Le Pabic Charles<sup>a,b,\*</sup>, Safi Georges<sup>a,b,\*</sup>, Serpentini Antoine<sup>a,b</sup>, Lebel Jean-Marc<sup>a,b</sup>, Robin Jean-Paul<sup>a,b</sup>, Koueta Noussithé<sup>a,b</sup>

\*Contributed equally to this work

<sup>a</sup> Université de Caen Basse-Normandie, FRE3484 CNRS BioMEA, Esplanade de la Paix, BP 5186, 14032 Caen cedex, France

<sup>b</sup> Université de Caen Basse-Normandie, Centre de Recherches en Environnement Côtier, 54 rue du Docteur Charcot, 14530 Luc-sur-Mer, France

#### Abstract

This study investigated 3 enzymatic activities (antiprotease, lysozyme-like and phenoloxidase (PO)like) in 13 main tissues of the European common cuttlefish *Sepia officinalis*. Antiprotease activity was mainly localized in cuttlefish digestive organs where it was thought to regulate endogenous proteases that are secreted for digestion. PO-like and activated phenoloxidase (APO)-like activities were distributed differently. Indeed, with the exception of the mantle, PO-like activity was found to be ubiquitous within sampled *Sepia* tissues, whereas APO-like activity was mainly associated with organs playing important roles in both the immune and circulatory systems. Lysozyme-like assay revealed an important presence of this enzyme activity in tissues exposed to the external environment such as the skin and mantle, and in the posterior salivary gland (PSG) which secretions are discharged in the buccal mass. Our study reports lysozyme, antiprotease and phenoloxidase/prophenoloxidase distributions in *S. officinalis* tissues for the first time, and thus provides the fundamental basis for a better understanding of immune system function in this species.

#### A. Introduction

Most marine organisms inhabit environments that are relatively rich in bacteria and other microorganisms along with anthropic contaminants. In these environments, seawater may function as a medium for both transport and growth of microbes, in contrast to air, which is thought to function only as a transport medium. Thus marine organisms share their ecosystem with health-threatening microorganisms and the principal function of their immune system is to mediate interactions between the host and the microbiotic world (McFall-Ngai *et al.,* 2010; Hansen and Olafsen, 1999). This finding helps to understand the need for marine species to have a powerful immune system.

In invertebrates, innate cellular and humoral mechanisms are the major lines of defence limiting microbial invasions and mediating the clearance or killing of the invading microbes from blood and tissues. Lysozyme-like family, protease inhibitors and phenoloxidase (PO) system are constituents of this humoral line of defence (Armstrong, 2006; Hikima et al., 2003). Lysozyme, an antimicrobial protein, is an enzyme that cleaves the  $1,4-\beta$ -glycosidic linkage between N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid of Gram-positive bacterial cell walls (Fiolka et al., 2012). Most organisms have the genetic capacity to produce multiple lysozymes of different types (chicken-type, goosetype, invertebrate-type), and it is presumed that these may have complementary or even different functions such as antibacterial or digestive enzymes (Callewaert and Michiels, 2010). The POs, a family of copper proteins, catalyse the first step of melanin production i.e. the oxidation or hydroxylization of phenols to produce quinones. Melanisation is an important immune mechanism among many invertebrate taxa, involved in non-self recognition, toxic compounds production against pathogens, wound healing process, and stimulating cellular-defence factor synthesis (Luna-Acosta et al., 2011a, 2011b, 2010a; Cerenius et al., 2010, 2008; Lacoue-Labarthe et al., 2009a; Hellio et al., 2007; Siddiqui et al., 2006; Luna-González et al., 2003). Specifically involved in invertebrate non-self recognition and already described in arthropods (Masuda et al., 2012; Cerenius et Söderhall, 2004), a zymogenic form of POs called prophenoloxidase (proPO) has begun to be studied in molluscs. This system consists in the activation of the inactive proenzyme proPO to PO by proteolytic cleavage via an endogenous activator or exogenous agents (Hellio et al., 2007)

such as lipopolysaccharides or peptidoglycans from bacteria (Cerenius et al., 2008). Finally, antiproteases or protease inhibitors aid in the defence of various organisms by regulating and inhibiting protease activities, which can be endogenous or secreted by bacteria, after interacting with their reactive sites or by entrapping the target protease and blocking access of protein substrate to the enzyme. Antiproteases can regulate protease activities involved in the coagulation of haemolymph, the activation of proPO system and the synthesis of cytokines and antimicrobial peptides (Xue *et al.*, 2009). In marine molluscs, PO/ProPO system, lysozyme-like and antiproteases have been mainly studied in haemolymph and haemocytes of bivalves such as Crassostrea gigas (Thomas-Guyon et al., 2009; Hellio et al., 2007; Itoh et al., 2007; Luna-González et al., 2003; Faisal et al., 1998), C. virginica (Xue et al., 2010, 2009; Jordan et al., 2005; Faisal et al., 1998), Mytillus edulis (Coles and Pipe, 1994; Pipe, 1990), M. galloprovincialis (Li et al., 2008; Carballal et al., 1997), Nodipecten subnodosus (Ramírez-Castillo et al., 2011; Luna-Gonzalez et al., 2003), Perna viridis (Sharma et al., 2009; Asokan et al., 1997), Ruditapes decussatus (López et al., 1997) and Saccostrea glomerata (Newton et al., 2004), or in gastropods such as Haliotis cracherodii (Martello and Tjeerdema, 2001), H. diversicolor supertexta (Cheng et al., 2004a, 2004b, 2004c; Suhong et al., 2004), H. rufescens (Martello and Tjeerdema, 2001) and H. tuberculata (Latire et al., 2012).

In the cephalopod class, which possesses anatomical peculiarities within the mollusc phylum as having a closed circulatory system with a central systemic heart and two branchial hearts (Wells, 1983), defence against pathogens involves both humoral and cellular responses. Agglutinins, lectins, lysozymes and antiproteases, are important components of humoral immunity while cellular responses involve haemocytes in haemolymph and tissues (Malham *et al.*, 2002). In *Sepia officinalis*, antiproteases were found in adult plasma (Armstrong, 2006) and the PO/proPO system was studied during embryonic development (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2009a). Furthermore, cephalopod PO studies have focused on tyrosinase activity found in the ink gland which is involved in melanogenesis (Derby, 2007; Fiore *et al.*, 2004; Naraoka *et al.*, 2003; Palumbo *et al.*, 1997). Amidst a growing scientific interest toward immune enzyme function, antiproteases, lysozyme-like and PO-/proPO-system remain poorly studied in cephalopods. Thus the purpose of this work is to describe the distribution of these enzymes in the main cuttlefish tissues in order to localise their maximum activities and to better understand their roles in *S. officinalis*.

#### **B.** Material and methods

#### 1. Animals and tissue samples

European common cuttlefish (*S. officinalis*, n = 10, DML =  $21.3 \pm 3.5$  cm, Weight =  $1.03 \pm 0.38$  kg) were obtained from traps deployed in front of the marine station at Luc-sur-Mer (Normandy, France). Prior to experimentation, the animals were maintained in 4500 liter tank and starved for 48h at 15°C.



Figure 46 : Internal anatomy of cuttlefish *Sepia officinalis* L., with studied tissues. BH: branchial hearts, BHA: branchial heart appendages, SH: systemic heart, DG: digestive gland, DGA: digestive gland appendages, OL: optic lobes, PSG: posterior salivary glands, Stc: stomach, WB: white body (Boyle and Rodhouse, 2005).

Animals were anesthetized through placement for 2 min in seawater containing 2 % ethanol and quickly killed by decapitation. Then, the digestive gland (DG) and their appendages (DGA), posterior salivary glands (PSG), stomac (Stc), cecum, optic lobes (OL), white body (WB), systemic heart (SH), gills, branchial hearts (BH) and their appendages (BHA) were removed. In addition, pieces of mantle and skin were sampled (**Figure 46**) and placed on ice. At the end of the dissection, tissues were transferred and kept at -80°C until analysed.

#### 2. Enzyme extraction and measurements

#### Enzyme extraction

Tissue samples were weighed and ground in liquid nitrogen. Once a fine powder was obtained, the sample was homogenised in a known amount (0.1 g to 10 ml) of Tris buffer pH 8 (10 mM Tris-HCl and 150 mM NaCl) for lysozyme-like and antiprotease-like assays or Tris buffer pH 7 (0.1 M Tris-HCl, 0.45 M NaCl, 26 mM MgCl<sub>2</sub> and 10 mM CaCl<sub>2</sub>) for phenoloxidase assay (Luna-Acosta *et al.*, 2010a). The mixture was stored at 4°C for 1 hour, and then centrifuged for 10 minutes at 4°C at 15000 g. The supernatant contained the Tris soluble protein used for the enzyme assays. The protein content was assayed according to the Bradford method (1976) using Serum albumin (Sigma-Aldrich, France) as standard.

#### Enzymatic assays

As described by Malham *et al.* (1998) and Thompson *et al.* (1995), antiprotease activity was measured by transferring 20  $\mu$ l of sample in sterile 96-well flat bottom plates (BD, USA) and 10  $\mu$ l of trypsin (100  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> of 0.05 M Tris buffer pH 8) and mixed at room temperature for 5 minutes In parallel, intrinsic trypsin activity was measured by replacing 10  $\mu$ l of trypsin by Tris buffer pH 8 described below (section 2.2.1.). Two hundred  $\mu$ l of N $\alpha$ -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (BAPNA, Sigma) substrate solution (5.2 mg BAPNA.ml<sup>-1</sup> dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma) in 10 ml of 0.01 M Tris buffer pH 7.4) was added to each well and incubated for 15 minutes at room temperature. A positive control was used by replacing the sample with Tris buffer pH 8. Absorbance was read at 405 nm using Mithras LB 940 luminometer (Berthold, Thoiry, France), and antiprotease activity was expressed as the percentage of trypsin sample inhibition (TI) compared to the positive control. The final activity was expressed as antiprotease activity. $\mu$ g of protein<sup>-1</sup>.

PO-like activity was measured spectrophotometrically by recording the formation of oquinones, as described by Luna-Acosta *et al.* (2010a). PO assays were conducted in 96-well flat bottom plates (BD, USA). 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA, C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>, Sigma) was used as a substrate, at a final concentration of 10 mM (Luna-Acosta *et al.*, 2011c). L-DOPA was prepared extemporaneously in Tris buffer pH 7 described below (section 2.2.1.). Following the method of Luna-Acosta *et al.* (2010a), 10 µl of sample was incubated at 25°C with 80 µl of L-DOPA and 50 µl of Tris buffer pH 7. Several control wells were systematically used: 'buffer control' containing only buffer, 'sample control' containing only sample and buffer, and 'non-enzymatic control' containing only substrate and buffer. Immediately after L-DOPA addition, PO-like activity was monitored for 5h using Mithras LB 940 luminometer (Berthold, Thoiry, France) at 490 nm.

Results were systematically corrected for non-enzymatic autoxidation of the substrate and were expressed in enzyme unit (1 U) per mg of total protein. One U corresponded to an increase of 0.001 in the absorbance per min, per mg of protein at 25°C.

Tropolone (10 mM) and trypsin TPCK (1 g.l<sup>-1</sup>) were used respectively as PO inhibitor and activator (Lacoue-Labarthe *et al.*, 2009a). PO inhibition/activation assays were performed by pre-incubating 10  $\mu$ l of PO inhibitor/activator (prepared in Tris buffer pH 7) with 10  $\mu$ l of sample for 20 minutes, at 25°C (Luna-Acosta *et al.*, 2010a). Then, the PO assay was carried out with L-DOPA at final concentration of 10 mM, given with tropolone and trypsin TPCK, inhibited phenoloxidase (IPO)-like and activated phenoloxidase (APO)-like activities, respectively. ProPO-induced activity was measured by subtracting APO-like activity from PO-like activity. Enzymatic oxidation (in the presence of an inhibitor or activator) was systematically corrected for non-enzymatic autoxidation of the substrate.

Lysozyme activity was quantified according to Malham *et al.* (1998). Fifty µl of hen egg white lysozyme (Sigma) (85 µg/ml in Tris buffer pH 8 described in section 2.2.1.) standard was serially diluted in triplicate in sterile 96-well flat bottom plates (BD, USA). Fifty µl of each sample was added in triplicate to the 96 well plates as well as fifty µl of Tris buffer pH 8, as blanks. One hundred and fifty µl of the substrate, freeze dried, *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) (0.075 g/100 ml of phosphate/citrate buffer pH 5.8 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 4.45 g/250 ml distilled H<sub>2</sub>O; citric acid, 2.1 g/100 ml distilled H<sub>2</sub>O; NaCl, 0.09 g/100 ml buffer)), was added to each well. The reductions in turbidity in the wells were read on Mithras LB 940 luminometer (Berthold, Thoiry, France) at 25°C for 5 minutes at 30 second intervals at 450 nm using negative kinetics. Lysozyme concentrations were calculated from the standard curve (µg equivalent of lysozyme from hen egg white (HEW).ml<sup>-1</sup>). This concentration was divided afterwards by the protein concentration in the sample. Final

lysozyme-like activity was thus expressed as concentration of HEW lysozyme equivalent in  $\mu$ g.mg protein<sup>-1</sup>.

#### 3. Data analysis

Each organ was tested in triplicate wells and average rates were calculated. Organ assays were repeated 10 times to have a final result of 10 mean values/tissue. Results are given as mean  $\pm$  standard error (SE) for adult organs. Values were tested for normality (Shapiro test) and homogeneity of variances (Levene's test). Normal data were compared with an ANOVA followed by a Tukey's HSD test when significant differences (p < 0.05) were found. Differences between PO-like activities were tested for each organ with a Student's *t*-test. R software was used for statistics and graphics.

#### C. Results

#### 1. Antiprotease assay

Antiprotease activity was detected in all samples of *S. officinalis*, excepting for the OL (**Figure 47**). The digestive system organs presented significantly higher activities (p < 0.05) than other tissues. The DG had the highest protease inhibitor activity ( $2.2 \pm 0.2 \text{ TI } \%.\mu\text{g prot}^{-1}$ ) followed by the DGA ( $1.8 \pm 0.2 \text{ TI } \%.\mu\text{g prot}^{-1}$ ), the Stc ( $1.6 \pm 0.4 \text{ TI } \%.\mu\text{g prot}^{-1}$ ) and the cecum ( $1.6 \pm 0.4 \text{ TI } \%.\mu\text{g prot}^{-1}$ ). The PSG ( $0.7 \pm 0.1 \text{ TI } \%.\mu\text{g prot}^{-1}$ ) activity was significantly lower (p > 0.05) than values found in DG and DGA. In the circulatory system organs (BH, BHA and SH) as in white body (WB), gills, mantle and the skin, antiprotease activities were significantly lower (p < 0.05) than activities found in the digestive system (excepting PSG).



Figure 47 : Antiprotease activity (Trypsin Inhibition %  $\mu$ g prot<sup>-1</sup>) in studied tissues of cuttlefish *Sepia* officinalis L. (n = 10). BH: branchial hearts, BHA: branchial heart appendages, SH: systemic heart, DG: digestive gland, DGA: digestive gland appendages, OL: optic lobes, PSG: posterior salivary glands, Stc: stomach, WB: white body. The bars represent the means ± standard error (SE) of 10 animals. Graphs not bearing the same subscript letter are significantly different (p<0.05).

#### 2. Phenoloxidase assay



Figure 48: PO-like and APO-like activities (U mg prot<sup>-1</sup>) in studied tissues of cuttlefish *Sepia officinalis* L. (n = 10). BH: branchial hearts, BHA: branchial heart appendages, SH: systemic heart, DG: digestive gland, DGA: digestive gland appendages, OL: optic lobes, PSG: posterior salivary glands, Stc: stomach, WB: white body. The bars represent the means (± SE) of 10 animals. Graphs not bearing the same subscript letter are significantly different (p<0.05). Statistical differences between PO-like and APO-like activities for p<0.05 and p<0.01, are represented as \* and \*\*, respectively.

Excepting the mantle, PO-like activity was detected in all sampled cuttlefish tissues. Tropolone totally (or almost totally) inhibits PO-like activity in all tissues (data not shown). When an IPO-like activity was measured, this value was systematically subtracted from APO and PO-like activity. Highest values of PO-like activities were measured in the skin ( $23.2 \pm 2.8 \text{ U} \text{ mg prot}^{-1}$ ), followed by DG and BH. A pool of organs presented similar activities of about 5 U mg prot <sup>-1</sup> (PSG, Stc, DGA, Gills, SH, BHA and WB). The lowest activities were detected in OL ( $2.2 \pm 1.3 \text{ U} \text{ mg prot}^{-1}$ ) and cecum ( $2.0 \pm 1.1 \text{ U} \text{ mg prot}^{-1}$ ) (**Figure 48**). Trypsin TPCK stimulated PO-like activity (APO-like activity) in most of the tissues except in the skin and the DG. The increase in PO-like activity was significant in seven organs i.e. in DGA, OL, WB, SH, BHA and gills. Highest APO-like activity was

measured in gills. Then, DGA, SH, BH and BHA presented similar APO-like activity. Finally, the lowest APO-like activity was measured in WB and OL. After comparison between PO-like activities and APO-like activities, it appeared that highest proPO-induced activities were localized in SH and gills, and lowest in BH (**Table 19**).

Table 19: PO-like, APO-like and proPO-induced activities (mean ± SE, IU.mg prot<sup>-1</sup>, n=10) in organs of *Sepia officinalis* which showed significantly differences (i.e. DGA: digestive gland appendages, OL: optic lobes, WB: white body, SH: systemic heart, BH: branchial hearts, BHA: branchial heart appendages, Gills). Statistical differences between PO-like and APO-like activity for p<0.05, p<0.01 and p<0.001, are represented as \*,\*\*,\*\*\* respectively. Letters indicate groups significantly different amongst themselves (p<0.05).

Tissue	PO-like activ	ity	APO-like	APO-like activity			proPO-induced activity	
DGA	6.11 ± 1.19	ab	$13.44 \pm 0.77$	***	ab	$7.33 \pm 1.35$	ab	
Gills	$4.94 \pm 2.11$	ab	$15.84 \pm 0.96$	***	а	$10.90 \pm 1.87$	а	
SH	$4.22 \pm 1.57$	ab	$13.87 \pm 0.98$	***	ab	$9.78 \pm 2.04$	а	
BH	$9.04 \pm 0.25$	а	$11.47 \pm 0.74$	*	abc	$2.43 \pm 0.75$	ъ	
BHA	$4.79 \pm 1.24$	ab	$12.21 \pm 1.01$	***	abc	$7.43 \pm 1.85$	ab	
WB	$3.84 \pm 1.56$	ab	$10.24 \pm 1.59$	*	bc	$6.40 \pm 0.78$	ab	
OL	$2.23 \pm 1.26$	ъ	$7.92 \pm 1.62$	*	с	$5.70 \pm 1.19$	ab	

#### 3. Lysozyme assay

All tissue samples of cuttlefish *S. officinalis* indicated variable amounts of lysozyme-like activity, except for the DGA (**Figure 49**). The highest activity was detected in the skin (2.0  $\pm$  0.9 µg.mg protein<sup>-1</sup>). This activity was significantly (p < 0.05) higher than lysozyme-like activity in the gills, BH, OL, DG, DGA and cecum. The mantle, which is beneath the skin, also presented some activity (0.9  $\pm$  0.3 µg.mg protein<sup>-1</sup>). Furthermore, BHA and SH (organs of the circulatory system), together with the WB and the PSG presented all lysozyme-like activities. As for the digestive system, the Stc had the highest lysozyme-like activity compared to cecum, DG and DGA.



Figure 49: Lysozyme-like activity ( $\mu$ g HEW Lysozyme eq. mg prot<sup>-1</sup>) in studied tissues of cuttlefish *Sepia* officinalis L. (n = 10). BH: branchial hearts, BHA: branchial heart appendages, SH: systemic heart, DG: digestive gland, DGA: digestive gland appendages, OL: optic lobes, PSG: posterior salivary glands, Stc: stomach, WB: white body. The bars represent the means (± SE) of 10 animals. Graphs not bearing the same subscript letter are significantly different (p<0.05).

#### D. Discussion

In general, antiprotease, lysozyme and PO activities are measured in serum or haemolymph and also on cultured blood cells such as haemocytes (Siddiqui *et al.*, 2006; Gollas-Galvan *et al.*, 1999; Malham *et al.*, 1998; Thompson *et al.*, 1995). Malham *et al.* (1998) worked on determining whether lysozyme and antiprotease activities also existed in various tissues of *Eledone cirrhosa*. However, little is known about the localization of these activities in *S. officinalis*. The purpose of this study was to demonstrate the presence of these activities in different organs of *S. officinalis* in order to better understand their distribution and potential role.

#### 1. Antiprotease activity

Protease inhibitor activity was mainly found in the digestive system organs (DG, Stc, cecum and DGA) with the highest activities being found in the DG and DGA. The PSG had significantly (p<0.05) lower activity but it was still clearly present. This detected activity could be involved in the regulation of proteases present in the saliva (Malham et al., 1998). In the digestive organs, several authors have described the presence of protease inhibitors in the hepatopancreas and the visceral tissues of squid (Kishimura et al., 2001; Sofina et al., 1988). The protease inhibitors are used as the major form of control once a protease has been activated. In this study, the ability of cuttlefish antiproteases to inhibit trypsin activity was measured as described by several authors (Kishimura et al., 2001; Malham et al., 1998; Thompson et al., 1995). In cephalopods, proteolytic enzymes play a major role in the digestive system (Balti et al., 2012; Jellouli et al., 2009) and a strong proteolytic activity is also found in the digestive system of *S. officinalis* among which are the serine proteases (e.g. trypsin). Furthermore, these activities are highly concentrated in DG and DGA (Boucaud-Camou, 1974) and this high activity implies the presence of protease regulator (protease inhibitors). The presence of trypsin inhibitor activity in the digestive organs of Sepia seems thus quite normal. Results obtained here are consistent with the descriptions made by Boucaud-Camou (1974).

In parallel, antiprotease plays an important role in immunity. It helps in the defence of various organisms by regulating and inhibiting the activities of various mechanistic classes of proteases (i.e. aspartic proteases, cysteine proteases, metalloproteases and serine proteases) (Xue *et al.*, 2009). This study showed the presence of protease inhibitor activities in gills, BH, BHA and SH. These organs play an important role in the circulatory system. The gills are responsible for haemolymph oxygenation before its circulation to other organs and the hearts ensure distribution of haemolymph to the entire body. Beuerlein *et al.* (2002) and Beuerlein and Schipp (1998) showed the importance of the BH in the circulatory system of *S. officinalis*. These authors proposed that this organ played an important role in the defence and detoxification of haemolymph and thus prevented the contamination of the whole organism. Activity found in BH, BHA and in the SH may reflect a regulation, in those organs, of potentially destructive proteases and thus preventing the entire body contamination. Antiprotease activity was also found in the

mantle, which is one of the first barriers to the surrounding environment. This activity could thus be explained by the necessity of having immune enzymes against pathogen infection when injuries occur.

#### 2. Phenoloxidase activity and ProPO activation

To our knowledge, this study details for the first time PO and proPO distribution in the major part of cephalopod tissues. Highest PO-like activity was found in the skin of *S. officinalis* highlighting two roles that POs probably play specifically in this tissue i.e. first as defence barrier against exogenous invaders and also in the wound healing process (Cerenius *et al.*, 2008; Söderhäll and Cerenius, 1998; Asokan *et al.*, 1997). However, it is surprising that, unlike previously reported, activity measured in the skin is only PO-like but not APO-like. Moreover, our assays seem to indicate that PO synthesis is local i.e. in the skin, because of the lack of PO-like and APO-like activities in the mantle, the only body part in direct contact with the skin. This underlines a constant and direct secretion of POs in this tissue to continually resist foreign invaders and quickly react to wounds.

Second highest PO-like activity was found in the DG. Recent studies (Luna-Acosta *et al.*, 2011a, 2011b) described a laccase PO-type activity in the bivalve mollusc *C. gigas* DG without addressing its potential local function. The important detoxification role of cephalopod DG and the potential various reactions induced by compounds produced from the melanisation cascade (Cerenius *et al.*, 2010) underline the potential detoxification role of PO enzymes in *S. officinalis* in this tissue, but further tissue-specific analysis will have to be undertaken to validate this hypothesis. Like in the skin, APO-like activity was not measured in DG. However, a high APO-like activity has been registered in DGA, highlighting a potential reservoir function for DG. Indeed, DG holds and synthesizes high levels of powerful proteases (Boucaud-Camou, 1974), which can potentially activate proPO and cause unwanted deleterious effects on the host by toxic melanisation intermediates (Cerenius *et al.*, 2008). This reservoir function could explain this high proPO content in DGA that has only been described as a food absorption organ (Mangold and Bidder, 1989b). Other tissues presented quite constant PO-like activity (i.e. PSG, Stc, DGA, WB, SH, BH, BHA, and Gills), with lowest activities measured in cecum and OL. PO-like activities measured in organs

involved in the immune system (i.e. WB, SH, BH, BHA, and Gills) highlighted the significance of PO activity in the immunity of *S. officinalis*. It is more surprising to find PO-like activities in organs involved in the digestive system (i.e. PSG, Stc and DGA). However, Bailey and Worboys (1960) described in lamellibranch bivalve molluscs, a PO activity located in the cristallin style, and Blaschko and Hawkins (1952) reported strong amine oxidase enzymatic activity in PSG and DG of both cephalopods *Octopus vulgaris* and *S. officinalis*, but without a clear role. Even if cephalopods do not possess cristallin style or an equivalent in their DG, PO activity could be conserved and play a role in marine molluscs digestive systems directly or indirectly with compounds produced from the melanisation cascade (Cerenius *et al.*, 2010).

Concerning APO-like activities, significant increase have been measured in organs involved in the immune system (at the exception of DGA and OL), underlining the already described non-self recognition role of the proPO system (Söderhäll and Cerenius, 1998). The highest proPO-induced activities were in SH and gills. This elevated content of the proPO zymogenic form is probably linked to the position of these organs e.g. at the center of the arterial system and as first circulatory organ next to the gills for SH, and as the main entrance way for foreign organisms and toxic compounds into the gills. These localizations highlighted proPO involvement in non-self recognition mainly described in arthropods (Cerenius and Söderhall, 2004; Luna-González *et al.*, 2003; Söderhall and Cerenius, 1998). WB APO-like activity mean value could be explained by the well-described role of this organ in circulating-cell (haemocyte) synthesis (Claes, 1996). In regard to the APO-like activity found in the OL, to our knowledge, no immune role of OL was previously highlighted, but haemocyte infiltration is often described (personal observation) in the outer layer of this organ. These data underline the potential income of proPO and PO in this organ to protect it from infection in view of its essential role in the nervous system and more particularly in locomotor control (Chichery and Chanelet, 1976).

Similar coupling activities to those described above with DG and DGA were observed in BH and BHA. The BH, involved in the detoxification process (Beuerlein *et al.*, 2002), presents a high level of PO-like activity (the third highest measured in the studied tissues) and the lowest proPO-induced activity (significantly increased). In contrast BHA, which has a haemolymph filter role (Malham *et al.*, 1998), presents a medium level of PO-like activity and a level of proPO-induced activity similar

to DGA, OL and WB. This highlights the potential reservoir function of the BHA to BH, ready to be activated and released into the circulatory system in case of bacterial infection for example. To the best of our knowledge, this is the first time that organ localization of POs could play a role in the proPO-activation regulation process. These data highlight the tissue–specific heterogeneity of PO activities as already described in *C. gigas* by Luna-Acosta *et al.* (2011a), and the need to increase coupled PO/proPO studies in invertebrates. In the present study, we did not assay individual phenoloxidase family members (i.e. tyrosinases, laccases and catecholases) because of the lack of knowledge on function and repartition of POs in cephalopods. Further studies could differentiate these three types of POs distribution in cuttlefish organs in order to better understand the melanisation process and its role in cephalopods and more widely in molluscs.

#### 3. Lysozyme-like activity

In fish, high lysozyme-like activity (Saurabh and Sahoo, 2008) and mRNA expression (Hikima *et al.*, 2001) were found in the skin. The important expression and activity in fish tissues such as the skin exposed to external environment was proposed to represent an adaptation to the constant exposure of fish to high numbers of opportunistic pathogens in the water (Hikima *et al.*, 2001). In bivalve molluscs, as for fish, high expression of lysozyme was also found in tissues directly exposed to the external environment. The scallop *Chlamys farreri* had a high lysozyme expression in the gills that are constantly flushed with water and thus exposed to infectious agents (Callewaert and Michiels, 2010).

Lysozyme-like activity was mainly found in the cuttlefish skin and in the mantle with lower activity (**Figure 49**). These tissues are the first barriers between cuttlefish organs and the external environment where lysozyme-like activity has an important role in protection against bacteria. This localization is thus consistent with author descriptions on fish and bivalve molluscs and may reflect its action in neutralizing pathogens after injuries or bacterial infection. This enzymatic activity was also found in the cuttlefish WB and the adjacent OL. In *S. officinalis* these organs are richly vascularised and especially the optic glands bonded to the OL where lysosomal inclusions were described by Mangold (1989). The important vascularisation of these organs could explain the presence of lysozyme-like activity in the OL which could be due to the presence of circulating

haemocytes in the capillary system. But this activity could also be due to the presence of lysosomal inclusions that may contain lysozyme. Claes (1996) described the cyto-morphological aspects of the WB cells, where circulating blood haemocytes are synthesised. This author observed the presence of lysosome-like vesicles in the four categories of the WB cells with the highest density of lysosomal inclusions in the haemocyte ones. The ultrastructural characteristics of the WB described by this author indicated that these cells are endocytotically active. Lysozymelike activity in the WB and in the OL is thus possibly due to the presence of haemocytes and lysosomal inclusions.

Assays were subsequently conducted on the organs of the circulatory system. Lysozyme-like activities were found in SH, BH and BHA. These results emphasise the role of these organs in purifying the haemolymph as described by Beuerlein *et al.* (2002) and Beuerlein and Schipp (1998) in *Sepia* BH and BHA. Antibacterial lysozyme activity is important in neutralizing bacterial infections in the circulatory system. It is interesting also to highlight the difference in lysozyme-like activity between the BH and BHA. Higher activity was found in the BHA than in BH as already observed for proPO, which emphasises the hypothesis of potential reservoir function of the BHA compared to BH.

In the digestive system, activities were detected mainly in the Stc and the PSG and were significantly (p < 0.05) lower in the cecum, DG and DGA (**Figure 49**). The presence of the lysozymelike activity in the anterior parts of the digestive system in *Sepia* is nevertheless interesting. Activity in cuttlefish PSG indicates the presence of lysozyme in the oral cavity as a first barrier for food microbes. Activity found in the Stc has never been described in cephalopods. Lysozyme recruited as a digestive enzyme has been described in vertebrates as well as in invertebrates, enabling them to use bacteria as a food source (Callewaert and Michiels, 2010). In ruminants, for example, one of the factors contributing to the success of their development is the acquisition of digestive lysozymes that contribute to the digestion of bacteria in the Stc (Dobson *et al.*, 1984). As discussed for ruminants, the same mechanism of gene duplication possibly allowed *Drosophila* to recruit lysozyme for a digestive function (Callewaert and Michiels, 2010). Furthermore, the digestive function of lysozyme has been described in bivalve molluscs. To benefit from large amounts of bacteria ingested as a food source, bivalve molluscs need a digestive system capable of breaking down prokaryotic cells. Lysozyme activities detected in the digestive systems of many bivalve molluscs have triggered speculation about a possible digestive role for these lysozymes (Xue et al. 2010; Itoh and Takahashi 2007; Matsumoto et al., 2006; Takeshita et al., 2004; Bachali et al., 2002; Nilsen et al., 1999). Thus many invertebrates from different phyla have lysozymes that show adaptations to a digestive profile. In addition, the food accumulation in early digestive stages in Sepioidae takes place in the Stc, which can expand considerably and thus accumulate food (Mangold and Bidder, 1989a). It is conceivable that this accumulation in the Stc, as described in ruminants, could be prone to severe degradation of the food bacteria by digestive lysozyme before absorption. Bacteria may play an important role for marine animals by providing cells with substances or micronutrients such as essential fatty acids, vitamins, minerals or even enzymes (Hansen and Olafsen, 1999). However this adaptation has not been described in mollusc cephalopods. Results obtained here show the presence of lysozyme-like activity mainly in PSG and Stc of S. officinalis without being able to confirm their specificity. These preliminary results may suggest the presence of digestive lysozymes in this species of cephalopod. Confirming such enzyme adaptation, as described in other species, will require the study of lysozyme expression in the Stc along with the characterization of lysozymes present in cuttlefish tissues. Lysozymes contributing to antibacterial defence are generally expressed in tissues and body fluids exposed to the environment or involved in bacterial clearance, while high expression levels of lysozyme in the Stc or gut rather point to a digestive function (Callewaert and Michiels, 2010).

#### 4. Lysozyme, antiprotease and prophenoloxidase distribution

After individual examination of enzyme distribution in cuttlefish tissues, a principal component analysis (PCA) was performed in order to get a generalized distribution pattern of these enzymes within the cuttlefish *S. officinalis* body. Because of the ubiquitous PO-like and APO-like activities, only proPO-induced activity was used in our analysis. PCA related tissues and enzymatic activities measured (**Figure 50**) allowed the formation of three tissue groups with three corresponding enzymes. Lysozyme-like activity was correlated with the skin, mantle and PSG highlighting the importance of this enzyme in tissues that are in contact with the external environment. Antiprotease activity was mainly correlated with digestive system organs (Stc, cecum and DG) and this activity was thought to be a regulating activity of endogenous proteases that are secreted for digestion and potentially detoxification. In contrast, the proPO-induced activity, which is the PO activity provided from zymogenic form, was associated to organs playing an important role in immune and circulatory systems (BH, BHA, SH, Gills, WB and OL) and in DGA as well, which could have a PO reservoir role towards DG detoxification process as described above (section 4.2.).



Figure 50 : Principal component analysis of antiprotease, lysozyme-like and proPO induce activities in studied tissues of cuttlefish *Sepia officinalis* L. BH: branchial hearts, BHA: branchial heart appendages, SH: systemic heart, DG: digestive gland, DGA: digestive gland appendage, OL: optic lobes, PSG: posterior salivary glands, Stc: stomach, WB: white body.

#### Acknowledgments

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

## *III. ETUDE DE L'ACTIVITE LYSOZYME DANS LES ŒUFS, LES JUVENILES D'ELEVAGE ET LES PRE-RECRUES DE SEICHE*

#### A. Introduction

Dans l'étude précédente, nous avons montré que certains bio-marqueurs (*i.e.* lysozyme et prophénoloxydase) sont essentiellement localisés au niveau des organes jouant un rôle dans l'immunité (organes du système circulatoire et tissus en contact avec le milieu extérieur). Ces enzymes sont donc prometteuses pour une application chez les juvéniles de seiche aux premiers stades de leur vie. Etant difficile de séparer les organes chez les embryons et les nouveau-nés, le dosage de ces enzymes a été réalisé sur les œufs et juvéniles entiers.

La possibilité d'adapter l'activité lysozymale aux premiers stades de vie de la seiche a été investiguée. Le but de ce travail est de valider ce bio-marqueur aux jeunes stades et voir si ce dernier peut être utilisé pour la description des variations spatio-temporelles du système immunitaire dans les œufs, chez les juvéniles et chez les pré-recrues.

#### B. Matériel et méthodes

#### 1. Matériel biologique

#### Les œufs de seiche

Les œufs de seiche ont été collectés au niveau des quatre sites de ponte et acheminés jusqu'à la station marine de Luc sur mer, tel que décrit dans le chapitre 1-II-B2. Les œufs sont ensuite acclimatés pendant une semaine (à l'exception des œufs de TB 2009) puis congelés (chapitre 2-III-B1) pour les analyses biochimiques.

#### Les juvéniles d'élevage

Les juvéniles de seiche ont été élevés en milieu expérimental puis échantillonnés de façon hebdomadaire, tel que décrit dans le chapitre 1-II-B3 et le chapitre 2-II-B1 pour les analyses biochimiques.

#### Les organes des pré-recrues de seiche

Après collecte dans les sites de ponte, les pré-recrues sont congelées à -80°C jusqu'aux analyses biochimiques (Chapitre 1-III-B1). Les animaux sont ensuite disséqués (Chapitre 2-III-B1) et les branchies, cœurs branchiaux, appendices des cœurs branchiaux et le cœur central sont utilisés pour le dosage des lysozymes. Après dissection à froid, les différents organes sont congelés au -80°C jusqu'aux analyses biochimiques.

#### 2. Extraction et essai enzymatique

Les échantillons d'œufs (30 œufs/site/année répartis en 6 réplicats de 5 œufs/dosage), de juvéniles (10 juvéniles/site/âge/année répartis en 5 réplicats de 2 juvéniles/dosage) ou d'organes de pré-recrues (n = 10/site/année) sont broyés avec de l'azote liquide jusqu'à obtenir une poudre fine. L'extraction enzymatique est faite ensuite dans du tampon Tris pH 8 (Chapitre 2-II-B2) et le surnageant obtenu est utilisé pour le dosage des lysozymes et le contenu protéique.

Le contenu protéique du surnageant a été déterminé et le dosage des lysozymes, tel que décrit dans le chapitre 3-II-B2.

#### 3. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard. Pour les tests statistiques, les tests préliminaires de normalité et d'homoscédasticité ont permis l'utilisation des méthodes de comparaison paramétrique. Les activités enzymatiques ont été comparées avec l'analyse des variances (ANOVA à deux facteurs pour la comparaison des sites et des années) en utilisant le logiciel « R statistical software ». Quand des différences étaient présentes, un test post hoc Tukey était réalisé pour déterminer les différences entre les groupes (p<0.05). Pour comparer l'évolution des activités lysozymales entre années, les données de lysozyme ont été transformées en utilisant le logarithme népérien pour chaque activité à un âge donné. Ensuite, les pentes d'évolution des activités sur 35 jours ont été déterminées grâce aux modèles linéaires, et les significativités entre les pentes déterminées avec une ANCOVA (p < 0.05) en utilisant le logiciel « R statistical software ».

#### C. Résultats

#### 1. Les œufs et les juvéniles d'élevage

Le dosage des lysozymes a été effectué sur les œufs (**Figures 51A, 51C et 51E**) et les juvéniles (**Figures 51B, 51C et 51F**) de seiches élevés sur 35 jours en milieu expérimental. La comparaison des activités lysozymes des œufs de 2009 (**Figure 51A**) et des œufs de 2010 (**Figure 51C**) n'a pas révélé de différence significative (p > 0.05) entre les sites et les deux années. Les œufs de Torbay (TB) (**Figure 51E**) ont une activité lysozymale inférieure (p < 0.05) à celle des œufs de Baie de Seine (BS) et d'Agon Coutainville (AC) en 2011, mais aussi inférieure à celles des œufs de tous les lots de 2010 et de TB en 2009.

Le profil des activités lysozymales chez les juvéniles de seiche est décroissant entre le jour d'éclosion et 35 jours post-éclosion pour l'année 2009 (Figure 51B), 2010 (Figure 51D) et 2011 (Figure 51F). Cette diminution d'activité est significative (p < 0.05) pour les trois années et pour l'ensemble des sites à l'exception des juvéniles du site d'AC en 2009 où la diminution ne s'est pas révélée significative (p > 0.05) (Tableau 20). La comparaison des activités entre sites en fonction de l'âge des individus (jours post-éclosion) n'a pas montré de différence significative (p > 0.05) en 2009 et 2010. En 2011, les juvéniles de TB ont montré des activités inférieures (p < 0.05) au jour d'éclosion ainsi qu'à 7 jours post-éclosion (Figure 51F et Tableau 20).

Année	Sites			Age (jours p	ost-éclosion)		
		0	7	14	21	28	35
~	BS	а	ab	ab	ab	ab	b
000	AC	ab	ab	ab	b	ab	b
7	ТВ	а	ab	ab	ab	ab	b
	BS	ab	bc	cd	d	cd	d
10	AC	а	cd	bc	d	cd	d
20	тв	а	cd	cd	d	cd	d
	SE	а	с	cd	d	d	d
2011	BS	ab	ab	de	de	de	de
	AC	ab	bc	de	e	de	e
	тв	с	de	de	e	e	e
	SE	а	cd	e	e	e	е

Tableau 20: Etude des significativités sur l'évolution des activités des lysozymes (équivalent de blanc d'œuf de poule/mg de protéine) chez les juvéniles de seiche en fonction de l'âge et du site (ANOVA à deux facteurs, p < 0.05). Les sites étudiés sont : AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine, SE : Selsey et TB : Torbay. Aucune comparaison entre années dans ce tableau.

a,b,c,d,e: les lettres différentes indiquent une différence significative (p < 0.05)



Figure 51: Activité lysozymale (Eq. HEWL/mg prot<sup>-1</sup>: équivalent lysozyme de blanc d'œufs de poule/mg de protéine) dans les œufs de seiches (Graphes A, C et E) et les juvéniles dans leurs premiers stades de développement post-éclosion (35 jours, Graphes B, D et F) et en fonction de différents sites de ponte en Manche. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  se pour n = 6 (œufs) et n = 5 (juvéniles). Les années de suivi : 2009 (Graphe A et B), 2010 (Graphes C et D) et 2011 (Graphes E et F). Les sites étudiés sont : AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine, SE : Selsey et TB : Torbay. Les tests de significativité ont été effectués séparément sur les œufs et les juvéniles. Les barres ne portant pas la même lettre sont significativement différentes (p < 0.05). Une (\*) indique la présence d'une différence significative (p < 0.05) entre sites à un âge donné (cf. tableau 1).

La comparaison des profils d'évolution de l'activité lysozymale sur 35 jours post-éclosion, en fonction des sites et des années étudiées, a montré une décroissance significativement (p < 0.05) plus importante des pentes d'évolution en 2010 et 2011, comparé à celles obtenues en 2009 (**Tableau 21**), à l'exception de la pente de TB 2011 (pas significative).

Tableau 21: Comparaison des pentes d'évolution de l'activité lysozymale, sur 35 jours d'élevage des juvéniles de seiche, entre les sites et entre les années. Les sites étudiés sont : AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine, SE : Selsey et TB : Torbay.

Annéa	Sites						
Annee	BS	AC	ТВ	SE			
2009	-0.007 $\pm$ 0.005 <sup>b</sup>	-0.006 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>	-0.007±0.005 b	-			
2010	-0.022±0.005 <sup>a</sup>	-0.023 ± 0.006 <sup>a</sup>	-0.023±0.006 <sup>a</sup>	-0.033±0.005 <sup>a</sup>			
2011	-0.020 ± 0.006 <sup>a</sup>	-0.026±0.005 <sup>a</sup>	$-0.014 \pm 0.005$ <sup>ab</sup>	-0.031±0.05 <sup>a</sup>			

a,b: les lettres différentes indiquent une différence significative (p < 0.05)

#### 2. Les pré-recrues de seiche

L'activité lysozymale au niveau des organes du système circulatoire (cœurs branchiaux, appendices des cœurs branchiaux, cœur central et branchies) était supérieure (p < 0.05) chez les pré-recrues de BS, comparé à celle trouvée chez les pré-recrues d'AC et de TB en 2010 (**Figure 52A**). Aucune différence significative (p > 0.05) n'a été observée au niveau de l'activité lysozymale des pré-recrues d'AC et TB en 2010, de même pour les pré-recrues de 2011 (**Figure 52B**). L'activité lysozymale des pré-recrues de BS en 2011 avait une moyenne supérieure à celle des pré-recrues deux autres sites mais cette différence n'était pas significative (p > 0.05).



Figure 52 : Activité lysozymale chez les pré-recrues de seiche provenant de différents sites de ponte en Manche en 2010 (Graphe A) et 2011 (Graphe B). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± se pour n = 10 individus. Eq. HEWL : équivalent lysozyme de blanc d'œufs de poule. Les sites étudiés sont : AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine et TB : Torbay. Les barres ne portant pas la même lettre sont significativement différentes (p < 0.05) (ANOVA à 2 facteurs).

#### **D.** Discussion

## 1. Activité lysozymale des œufs de seiche et évolution de cette activité chez les juvéniles au premier mois post-éclosion

Il est connu depuis plusieurs décennies que les œufs de poissons, ainsi que toute surface submergée, sont facilement colonisés par des bactéries (Hansen and Olafsen, 1999). Il est donc primordial aux organismes vivants marins d'avoir une protection contre ces développements bactériens. L'activité lysozymale trouvée au niveau des œufs de seiche est entre 10 et 25 µg d'équivalent lysozyme de blanc d'œuf de poule/mg de protéine. Cette activité est égale voir supérieure à celle retrouvée chez les juvéniles. Ceci souligne l'importance de cette activité au cours du développement embryonnaire, quelque soit l'année ou le site étudié, à l'exception des œufs collectés à TB en 2011. En effet, la seule différence est enregistrée pour ce lot d'œufs qui a une activité significativement inférieure (< 5 µg d'équivalent lysozyme de blanc d'œufs de poule/mg de protéine). Mais cette faible activité n'affecte pas le taux d'éclosion des œufs (Chapitre 1-II).

Une faible valeur a aussi été relevée par la suite chez les juvéniles de ce même site, de l'éclosion à 7 jours post-éclosion. Donc, le faible taux de lysozyme au niveau des œufs de TB en 2011 a affecté le taux de lysozyme chez les juvéniles au cours de la première semaine post-éclosion. Ces œufs ont subi le stress du transport du site de TB jusqu'à la station marine en France. Le stress mécanique a un effet modulateur sur l'activité lysozymale (activateur ou inhibiteur). En effet, une augmentation de l'activité lysozymale est observée dans le plasma des truites arc-en-ciel (Oncorhynchus mykiss) après un stress dû à la manipulation des animaux (Demers et Bayne, 1997) alors qu'une diminution de cette activité est observée dans le plasma de Limanda limanda (Hutchinson et Manning, 1995) après un stress de transport. La réponse de l'activité lysozymale est donc variable en fonction des espèces. Mais cette activité varie aussi selon le tissu étudié et le moment d'échantillonnage. En effet, Malham et al. (1997) observent une diminution de l'activité lysozymale dans les haemocytes d'Eledone cirrhosa après 4 et 24h post-injection bactérienne mais une augmentation au niveau des cœurs branchiaux de ces céphalopodes après 48h post-injection. Cependant, les faibles activités des lysozymes dans les œufs et les juvéniles de TB en 2011 ont été notées seulement cette année là et pour ce site. Il en est de même pour l'effet post-éclosion sur les juvéniles. Etant donné que les protocoles de manipulation (prélèvement, conditionnement,

transport) des échantillons anglais sont identiques pour les différentes années et pour les deux sites étudiés (TB et SE), cette diminution n'est pas due à un problème de transport.

Le stress aurait pu accentuer un problème initialement lié à la qualité des œufs dans leur site d'incubation de cette même année rendant les juvéniles plus vulnérables. En effet, les juvéniles de TB en 2011 ont enregistré le plus fort taux de mortalité comparé aux autres sites et aux différentes années de suivi (Chapitre 1-II). Lacoste *et al.* (2001) ont montré qu'un stress physique (*i.e.* remuer les animaux dans un conteneur de 20 litres à 100 tours par minute) impose des changements physiologiques (*i.e.* augmentation des taux de neuroendocrines dans l'haemolymphe) chez l'huitre (*C. gigas*), influençant les interactions hôte-pathogène et induisant une augmentation de la vulnérabilité des animaux aux infections bactériennes (*Vibrio splendidus*). Les œufs de moins bonne qualité à la base sont plus vulnérables. Le transport aurait pu accentuer cette vulnérabilité, se traduisant par une chute des activités lysozymales dans les œufs qui fragilise ensuite les juvéniles à l'éclosion.

L'évolution de l'activité lysozymale, chez les juvéniles au premier mois post-éclosion, a montré un profil stable entre années et sites avec une importante activité à l'éclosion puis une diminution de ces activités jusqu'à 35 jours post-éclosion. La forte activité à l'éclosion est d'une grande importance, puisqu'elle est retrouvée systématiquement tous les ans et pourrait jouer un rôle dans la protection des juvéniles contre leur nouvel environnement en dehors de l'œuf. Les larves et les juvéniles des espèces marines naissent dans un environnement riche en microorganismes potentiellement pathogènes. Ceci supporte l'hypothèse que ces jeunes larves doivent « reconnaître » et savoir se défendre contre les pathogènes dès les premiers stades de vie ainsi que de protéger leur homéostasie (Hansen and Olafsen, 1999). La diminution par la suite de l'activité lysozymale chez les jeunes seiches se fait naturellement puisqu'elle n'induit pas d'augmentation des mortalités chez les juvéniles. Cette diminution pourrait être liée aux modifications physiologiques que subissent ces animaux au cours de leurs premiers stades de vie post-éclosion. En effet, certaines fonctions ne sont pas encore pleinement matures. Le système nerveux n'est pas complètement développé comme le montre Dickel et al. (2001) dans son étude sur la mémoire. L'appareil reproducteur en est juste à une ébauche dont la différenciation cellulaire débute à l'éclosion (Lemaire et Richard, 1970), et le système digestif ne mature qu'après 1 mois post-éclosion (Yim et Boucaud-Camou, 1980). Chez les salmonidés (Salmo salar et Salmo trutta), une diminution de l'activité lysozymale a été observée parallèlement à une diminution du

nombre de leucocytes et de lymphocytes dans le sang au cours de la smoltification (Muona and Soivio, 1992). Chez les céphalopodes, les haemocytes sont les principales cellules immunitaires (McFall-Nigai et al., 2010) et ces cellules évoluent chez la seiche en fonction de l'âge (Claes, 1996). En effet, Claes (1996) a montré que le nombre d'haemocytes décroit entre les stades embryonnaires, juvéniles, sub-adultes et adultes. La diminution de l'activité lysozymale pourrait donc être en partie liée à la diminution des haemocytes en fonction de l'âge, tel que décrit chez les salmonidés (Muona and Soivio, 1992). Cependant, le dosage de l'activité lysozymale a été fait sur l'individu entier et pas uniquement sur un extrait d'haemolymphe. La forte activité à l'éclosion peut être aussi due à une évolution de cette activité dans les tissus ou les parties muqueuses (Stabili et Pagliara, 1994). Le mucus forme typiquement un revêtement glissant contenant des activités antibactériennes, telles que l'activité des lysozymes. Le taux basal de cette activité au niveau du mucus protège l'organisme des populations bactériennes vivant dans le même environnement. Par conséquent, une réduction de cette activité antibactérienne dans le mucus augmente la vulnérabilité des animaux aux infections bactériennes (Stabili et al., 2009). L'hypothèse du mucus appuierait les résultats retrouvés dans le Chapitre 3-II où l'activité lysozymale est essentiellement retrouvée au niveau de la peau, par rapport aux autres organes. De plus, les faibles valeurs d'activité retrouvées chez les juvéniles de TB en 2011 sont suivies de fortes mortalités pendant les 35 jours post-éclosion.

Une diminution plus importante de l'activité lysozymale en 2010 et 2011 a été mise en évidence, comparé à l'année 2009. Deux facteurs sont différents entre 2009 et les deux autres années. La température d'élevage qui est plus importante en 2009 (proche de 20°C) que lors des deux autres années (proche de 19°C) et la densité de population dans les structures d'élevage avec 600 seiches utilisées en 2010 et 2011 (4 sites, 150 seiches/site) contre 450 seiches en 2009 (3 sites). La température influence l'activité lysozymale (Hutchinson et Manning, 1995 ; Wolthaus *et al.*, 1984) et la densité affecte l'état de stress des animaux avec des animaux plus stressés quand la densité est trop élevée (Domingues *et al.*, 2003 ; Sykes *et al.*, 2003 ; Correia *et al.*, 2005). L'augmentation du stress indique une diminution plus rapide de l'activité lysozymale mais sans impact sur le taux de mortalité (Chapitre 1-II).

2. Variabilité spatio-temporelle de l'activité lysozymale chez les pré-recrues de seiche Le dosage des lysozymes a été effectué sur les organes du système circulatoire (*i.e.* cœurs branchiaux et appendices des cœurs branchiaux, cœur central et branchies) des pré-recrues

récoltées. Une activité lysozymale plus forte a été observée chez les pré-recrues de BS en septembre 2010 comparativement à celle des pré-recrues d'AC du même mois et à celle des prérecrues de TB (décembre 2010). La même distribution des activités des lysozymes est retrouvée en 2011 pour ces sites mais sans différence significative entre les lots de BS et des deux autres sites. Luna-Acosta et al. (2010b) ont montré que des variabilités spatiales existaient dans les activités de différents bio-marqueurs, dont les lysozymes, et ces variabilités sont liées à la différence des teneurs en polluants. Le bulletin annuel de la surveillance de la qualité du milieu marin littoral (Rapport IFREMER, 2012) montre qu'en Baie de Seine (BS), la concentration des polluants tels que les métaux lourds (plomb, mercure, cadmium) est supérieure à la moyenne nationale en France et aux concentrations retrouvées dans l'Ouest Cotentin (AC). Ces concentrations sont plus élevées près de l'embouchure de la Seine. De plus, la Baie de Seine est impactée par plusieurs bassins versants qui influencent sa salinité (Chapitre 1-II). Chu et al. (1995) ont trouvé que la concentration de lysozyme, dans l'haemolymphe de C. virginica était plus élevée dans les zones de plus faible salinité. Ces apports d'eau douce augmentent aussi les apports de polluants, de nutriments et de microorganismes tels que les bactéries dues au lessivage des sols. L'activité des lysozymes plus importante, chez les pré-recrues de BS, semble donc être la résultante de cet environnement plus impacté par les pressions anthropiques et par les apports d'eau douce comparé aux pré-recrues d'AC. La pollution induit des processus de détoxification qui se mettent en place au niveau de la glande digestive (Bustamante et al., 2002) et des cœurs branchiaux (Beuerlein et al., 2002) chez la seiche. Ces processus induisent une augmentation des activités lysozymales au-delà de la période de contamination (Luna-Acosta et al., 2011b).

En 2011, la différence n'est plus significative entre les deux sites français (AC et BS). Une diminution de l'activité des lysozymes a été observée pour les deux sites, qui est plus marquée chez les pré-recrues de BS. Cette diminution de l'activité serait due à la saison de collecte puisque les pré-recrues 2011 ont été collectées en novembre. L'activité des lysozymes est variable en fonction des saisons, due à la température de l'eau au cycle de vie de l'espèce des espèces [*C.gigas* (Luna-Acosta *et al.,* 2010b) ; *L. limanda* (Hutchinson et Manning, 1995)] Donc, la collecte des pré-recrues au mois de novembre, avec une température d'eau plus froide, aurait induit une diminution des activités des lysozymes réduisant les écarts entre les deux sites français. Quant au site de TB, aucune différence n'a été enregistrée chez les pré-recrues entre les deux années. De plus, les activités des lysozymes se rapprochent de celles trouvées chez les pré-recrues d'AC.
# E. Conclusion

L'activité des lysozymes s'est révélée être un bon bio-indicateur des perturbations affectant les œufs et les juvéniles de seiches aux premiers jours post-éclosion. Une faible activité de cette enzyme n'affecte pas le taux d'éclosion des œufs, mais augmente la vulnérabilité des animaux ce qui se traduit par une augmentation des mortalités chez les jeunes individus après éclosion.

Le profil de cette activité chez les juvéniles de seiche montre une diminution au premier mois post-éclosion liée à l'âge des individus. La forte activité à l'éclosion reflète l'importance de cette enzyme dans la protection des nouveau-nés contre les agents pathogènes de leur nouvel environnement. La diminution qui s'opère ensuite est naturelle puisqu'elle n'induit pas de mortalités. La diminution de l'activité lysozyme se fait après adaptation des juvéniles à leur nouvel environnement.

Cette activité indique la présence d'une variation spatio-temporelle chez les seiches tel que décrit chez d'autres mollusques, en relation avec la pollution du milieu et de la saison de collecte. Cette enzyme est activée au niveau des organes du système circulatoire dans les zones plus anthropisées (i.e. BS). Cette activation pourrait être le reflet des processus de décontamination mis en place par l'organisme pour lutter contre les différentes sortes de pollution.

# **IV.** CONCLUSION

Ce chapitre avait pour but l'analyse de différentes enzymes immunitaires (i.e. antiprotéases, lysozymes et phénoloxydases) pour améliorer la connaissance de la distribution de ces facteurs humoraux chez S. officinalis mais aussi, pour étudier la possibilité d'adapter ces dosages enzymatiques chez les jeunes stades de vie de cette espèce. L'étude sur les organes et tissus adultes (i.e. glandes salivaires postérieures, estomac, caecum, glande digestive, appendices de la glande digestive, branchies, cœur central, cœurs branchiaux, appendices des cœurs branchiaux, corps blanc, lobes optiques, manteau, peau), a permis d'analyser la distribution de ces enzymes chez la seiche. L'activité antiprotéasique (inhibiteur de protéase) s'est révélée être essentiellement concentrée au niveau des organes du système digestif où cette activité serait régulatrice des protéases endogènes, plus qu'une activité immunitaire, pour un dosage sur des juvéniles entiers. L'activité des phénoloxydases est ubiquiste avec une plus forte activité au niveau de la peau. Cependant, la forme activable de cette enzyme, la prophénoloxydase, est essentiellement concentrée au niveau des organes et des tissus du système circulatoire et immunitaire (i.e. cœurs branchiaux, appendices des cœurs branchiaux, cœur central, branchies, corps blanc et lobes optiques). Ce couple d'enzymes peut être utilisé sur des individus entiers puisque la soustraction de l'activité phenoloxydase de l'activité prophénoloxydases permet d'avoir l'activité spécifique prophénoloxydase, présente dans les organes du système circulatoire et immunitaire. L'activité des lysozymes s'est révélée peu présente dans les organes du système digestif (à l'exception de l'estomac). Cette activité est présente au niveau de la peau, des cœurs et du corps blanc. L'analyse en composantes principales utilisée pour discriminer les organes avec les trois activités a montré que le lysozyme est surtout associé aux tissus en contact avec le milieu extérieur, en tant que première barrière contre les agents pathogènes.



Figure 53: Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus sur les variations spatiales de l'activité lysozyme des œufs, des juvéniles et des pré-recrues de seiche *Sepia officinalis* en Manche.

A la suite de ces résultats, il a été choisi d'étudier le lysozyme chez les jeunes stades de vie de la seiche. Cette activité a montré un profil stable entre les années et les sites avec une forte activité au niveau des œufs et des juvéniles à l'éclosion puis une diminution jusqu'à 35 jours post-éclosion. Le lysozyme joue un rôle important dans la protection des embryons au cours du développement embryonnaire mais aussi à l'éclosion pour l'adaptation des juvéniles à leur nouvel environnement hors de l'œuf. Cette activité enzymatique décroit ensuite naturellement puisque cette diminution n'engendre aucune mortalité chez les juvéniles. Le lysozyme s'est montré également être un bon bio-indicateur des perturbations chez la seiche. En effet, deux phénomènes ont été observés au niveau des premiers stades de vie (de l'œuf jusqu'à 35 jours post éclosion) et au niveau des prérecrues dans le milieu naturel. Une faible activité lysozymale, au niveau des œufs se répercute au niveau des juvéniles à l'éclosion, et est accompagnée d'une diminution du taux de survie des juvéniles (Figure 53). Ceci a été observé pour le site de TB en 2011. Quant à la variabilité spatiale de cette activité, les dosages de l'activité des lysozymes effectués sur les organes du système circulatoire des pré-recrues (i.e. cœurs branchiaux, appendices des cœurs branchiaux, cœur central et branchies) a montré une activité stimulée chez les pré-recrues de BS par rapport aux deux autres sites (TB et AC). Cette activité plus importante à BS pourrait être le reflet d'un environnement plus anthropisé en BS, qui est fortement impacté par les bassins versants.

# CHAPITRE 4 :

# Etude de la composition des œufs, des juvéniles, des prérecrues et des proies de *Sepia officinalis*

# I. Introduction

L'étude de la composition biochimique englobe plusieurs éléments pouvant être étudiés tels que les contenus protéiques, lipidiques, glucidiques, les acides aminés mais aussi les contenus en vitamines, minéraux, oligoéléments ainsi que les classes de lipides et les profils d'acides gras. Ces paramètres permettent d'avoir une idée sur la qualité nutritionnelle d'un aliment selon qu'il soit riche ou pauvre en tel ou tel composant. Les indices de condition biochimique fournissent également des mesures des réserves énergétiques disponibles pour un individu. Les concentrations des constituants donnent des informations sur l'accumulation ou la mobilisation des ressources qui sont dépendantes de l'état nutritionnel de l'individu (Ferron et Legett, 1994). Parmi les différents éléments, les lipides, les protéines et les glucides sont les principaux composants biochimiques du monde vivant (Bouchaud et Galois, 1990).

Les protéines sont des macromolécules composées d'une ou de plusieurs chaînes d'acides aminés liées entre elles par des liaisons peptidiques. Ces molécules sont responsables d'une grande majorité des fonctions dans les organismes vivants puisqu'elles assurent un rôle de structure dans les exosquelettes et des rôles aussi divers que le transport d'oxygène (i.e. hémoglobine), la digestion, l'immunité (i.e. enzymes digestives et immunitaires), la régulation d'expression de gènes et l'implication dans les voies de signalisation etc. Ces molécules constituent par ailleurs l'unique source d'azote de l'organisme (www.anses.fr).

Les glucides sont synonymes des « hydrates de carbone » ou de « saccharides ». Il s'agit de polyalcools comportant une fonction aldéhyde (CHO) ou cétone (CO). Quatre classes de glucides ont été décrites par Gray (2003) qui sont les sucres (i.e. monosaccharides et disaccharides), les oligosaccharides, les polysaccharides et les glucides hydrogénés. Les principales fonctions biologiques de cette molécule portent sur l'énergie et le stockage, sous forme de glycogène dans le règne animal.

Les lipides constituent la matière grasse des êtres vivants. Ces molécules jouent trois rôles essentiels. Ils interviennent dans la constitution des membranes cellulaires. Ils prennent part aux processus de stockage et de libération d'énergie. Et une partie des lipides joue un rôle dans le métabolisme des prostaglandines et des précurseurs de stéroïdes hormonaux (Bouchaud et Galois, 1990).

Les acides gras sont des constituants des triglycérides (une classe de lipides) caractérisés par leur structure composée d'une répétition de groupements méthylènes (CH2), formant une chaîne carbonée. Les acides gras comprennent des acides gras dits « saturés » (AGS) et des acides gras dits « insaturés » (AGI). Les AGI ont une ou plusieurs doubles liaisons au niveau de leur chaîne carbonée. En présence d'une seule double liaison, il s'agit d'acides gras mono-insaturés (AGMI) et en présence de plusieurs doubles liaisons, d'acides gras poly-insaturés (AGPI). Parmi les AGPI, on retrouve les omégas 3 et 6 (n-3 et n-6), les acides eicosapentaénoïques (EPA), les acides docosahexaénoïques (DHA) ou encore les acides arachidoniques (AA). Ces composants jouent des rôles importants dans l'organisme. Les DHA interviennent dans la physiologie des cellules membranaires et les EPA, précurseurs importants des eicosanoides, sont impliqués dans un grand nombre de processus physiologiques (Almansa *et al.,* 2003, 2006). Chez les espèces marines, le contenu en AG n-6 est mineur dans la composition des lipides totaux, contrairement au n-3 (Almansa *et al.,* 2006).

L'utilisation des acides gras (AG), en tant que traceurs de sources alimentaires, a commencée depuis les années 1960, pour explorer les relations alimentaires dans un certain nombre d'organismes marins (Jackson *et al.,* 2007). Elle est basée sur l'hypothèse selon laquelle plusieurs AG du milieu marin, particulièrement les AGPI, peuvent être uniquement bio-synthétisés par certains phytoplanctons et certaines macro-algues, composants alimentaires essentiels pour les niveaux trophiques supérieurs. Les espèces de phytoplanctons et de macro-algues sont souvent caractérisées par des ratios distincts d'AG. Ces ratios influencent les profils d'AG des organismes supérieurs et sont utiles en tant qu'outils pour fournir des informations sur la chaîne alimentaire (Jackson *et al.,* 2007).

La composition biochimique a été étudiée chez différentes espèces de céphalopodes pour caractériser la qualité de la chair, les variations saisonnières des composants, les effets des aliments sur la composition des manteaux, la comparaison des contenus de différentes espèces ainsi que l'évolution des profils durant la maturation sexuelle (Moreno *et al.*, 1998; Moltschaniwskyj et Jackson, 2000; Rosa *et al.*, 2002; Rosa *et al.*, 2005; Ozyurt *et al.*, 2006; Ozogul *et al.*, 2008; Sykes *et al.*, 2009). Cependant, peu d'études se sont intéressées à la variabilité spatiale de ces composants. De plus, les outils tels que les isotopes stables, les métaux lourds et l'analyse de la signature en acides gras peuvent être utilisés comme indicateurs trophiques et comme traceurs des chaînes alimentaires (Jackson *et al.*, 2007).

202

Le but de ce chapitre est donc d'investiguer sur la composition biochimique des œufs, des juvéniles et des manteaux de pré-recrues de seiche *Sepia officinalis*, ainsi que les proies de cette même espèce dans différents sites de ponte côtiers. La composition en protéines, lipides et glucides sera étudiée de même que les profils d'acides gras aux différents stades de vie de *Sepia*. La détermination des profils d'acides gras, sur les proies d'un côté et sur le manteau des pré-recrues de l'autre, permettra de mettre la signature en acides gras du manteau en relation avec les sources alimentaires locales.

# II. Matériel et méthodes

# A. Matériel biologique

#### 1. Les œufs de seiche

Les œufs de seiche ont été collectés sur les quatre sites de ponte et acheminés à la station marine de Luc sur mer, tel que décrit dans le chapitre 1-II-B2. Les œufs sont ensuite acclimatés pendant une semaine puis congelés (chapitre 2-III-B1) pour des dosages biochimiques ultérieurs.

# 2. Les juvéniles d'élevage

Les juvéniles de seiche, issus des œufs collectés sur les 4 sites de ponte, ont été élevés en milieu expérimental puis échantillonnés de façon hebdomadaire, tel que décrit dans le chapitre 1-II-B3 et le chapitre 2-II-B1 pour des dosages biochimiques ultérieurs.

### 3. Les pré-recrues

Après collecte dans les quatre sites de ponte, les pré-recrues sont congelées à -80°C jusqu'aux analyses biochimiques (Chapitre 1-III-B1).

#### 4. Les seiches et proies du milieu

Pour pouvoir collecter de petites seiches et des proies du milieu, des pièges artisanaux ont été réalisés (**Figure 54**). Le piège consiste en une bouteille de 80 litres dont la partie apicale est coupée, retournée et fixée pour former l'entrée du piège. A l'intérieur de la bouteille, une grosse pierre est déposée pour stabiliser le dispositif dans l'eau. Des morceaux de polystyrène blanc sont également déposés pour « attirer les seichons » (technique utilisée par certains caseyeurs pour attirer les seiches). La pose de ces pièges n'a pu être faite que dans les deux sites français (BS et

AC, zones de marnage respectives de 8m et de 12 m), à marée basse. Pour les sites anglais, la pose des pièges, à marée basse, s'est avérée difficile au vu des plus faibles zones de marnage (en moyenne 4m) et de la topographie des terrains.

Trois pièges ont été posés sur chaque site durant les mois de juillet et d'août 2010. Les pièges étaient relevés une fois par semaine. Les échantillons sont récupérés grâce à l'ouverture faite en bas de la bouteille (**Figure 54B**). Pour garder les animaux vivants et frais, ces derniers sont placés dans un bac d'eau, le temps du transport jusqu'à la station marine. Une fois à la station, l'eau est changée pour la réoxygéner. Une première détermination des espèces est faite alors à l'aide de clés de détermination, avant de les grouper par famille et de les congeler à -80°C jusqu'aux analyses biochimiques.



Figure 54 : Etapes de préparation et de pose des pièges dans les sites pour la collecte de proies et de juvéniles de seiche *Sepia officinalis*. A- Bouteille de 80 L dont la partie apicale est coupée puis retournée pour former l'entrée du piège, B- Ouverture faite sur la partie basale de la bouteille pour la récupération des échantillons, C- La bouteille est fixée, grâce à des pics en fer attachés à la bouteille et plantés en biais dans le sol, D- Le dispositif est fixé à marée basse dans une zone submergée, E- Le dispositif est assuré en rajoutant des grosses pierres sur les pics et sur les files attachant la bouteille. (NB : Les objets flottants blancs dans la bouteille sont des morceaux de polystyrène afin d'attirer les seiches dans les casiers).

# B. Préparation des échantillons

### Œufs

Pour l'étude de la composition des œufs, une dissection à froid (dans un bac de la glace recouvert d'une feuille d'aluminium) est au préalable effectuée pour récupérer le vitellus avec l'embryon en formation. Les échantillons d'œufs (30 œufs/site/année répartis en 6 réplicats de 5 œufs/dosage) sont ensuite broyés dans de l'azote liquide, avant d'être répartis dans des falcons de 15 ml pour les différents dosages, puis congelés à -80°C jusqu'aux analyses. Un deuxième groupe d'œufs est aussi préparé pour les analyses d'acides gras (30 œufs/site/année répartis en 1 réplicat).

### Juvéniles d'élevage

Les juvéniles d'élevage sont broyés entiers (n= 10/site/année pour les juvéniles à éclosion et n= 5/site/année pour les juvéniles de 7 à 35 jours post-éclosion, pour autant de réplicats que de juvéniles) avant d'être répartis dans des falcons de 15 ml pour les différents dosages puis congelés à -80°C jusqu'aux analyses. Un autre groupe de juvéniles à l'éclosion (10<n<50 juvéniles/site/année pour 1 réplicat) est aussi préparé pour les analyses d'acides gras.

#### **Pré-recrues**

Les pré-recrues sont disséquées (Chapitre 2-III-B1). Le manteau est récupéré puis utilisé pour les dosages biochimiques. Après dissection à froid, les échantillons de manteau (n= 5/site/année pour 5 réplicats) sont broyés dans de l'azote liquide avant d'être répartis dans des falcons de 15 ml pour les différents dosages puis congelés à -80°C jusqu'aux analyses. Un deuxième lot d'échantillons de manteau (n= 5/site/année pour 1 réplicat) est conditionné dans un falcon de 50 ml pour les analyses d'acides gras.

#### Proies du milieu

Les proies ont été regroupées, après identification, par famille dans des sachets. Pour l'étude de la composition de ces proies, la sélection s'est portée sur les plus abondantes dans les deux sites français afin de comparer leur composition. Les familles collectées les plus abondantes sont celles des *Carcinidae*, des *Crangonidae*, des *Palaemonidae* et des *Gobidae*. L'utilisation des clés de détermination a permis d'approfondir l'identification jusqu'au genre et de conditionner ces animaux dans des sachets ou falcon de 50 ml pour les analyses d'acides gras : *Carcinus* (n= 15/site

pour 1 réplicat, 2 cm <taille<4 cm) pour les *Carcinidae, Crangon* (n= 35/site pour 1 réplicat, 2 cm <taille<4 cm) pour les *Crangonidae, Palaemon* (n= 15/site pour 1 réplicat, 3 cm <taille<5 cm) pour les *Palaemonidae* et *Pomatoschistus* (n= 15/site pour 1 réplicat, 2 cm <taille<3 cm) pour les *Gobidae*.

# C. Dosages biochimiques

L'utilisation du terme « GPL » dans le texte est un diminutif des dosages glucidiques (G), protéiques (P) et lipidiques (L).

# 1. Les protéines (P)

#### Extraction

L'extraction des protéines totales est faite en ajoutant 10 ml de NaOH 1M à 10 mg de tissu broyé (Le Bihan, 2006). Les échantillons ainsi qu'une solution de BSA (Bovine Serum Albumine) pour la gamme sont ensuite stockés pendant 1 nuit en chambre froide (4°C).

#### Dosage

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Lowry *et al.* (1951). 0.1 ml de solution H2SO4 0.5M est ajouté à 0.1 ml d'extrait pour neutraliser le mélange. 1 ml de solution C [150 ml solution A (600mg de NaOH, 3 g de Na2CO3, 150 ml d'EBD) + 3 ml solution B (15 mg de CuSO4, 30 mg de tartrate sodium potassium)] est ajoutée. Le mélange est vortexé et incubé 10 minutes à température ambiante. Ensuite, 0.1 ml de solution Folin (solution de révélation) est introduite. Le mélange final est vortexé et incubé 1h30 à température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance est lue à 750 nm au spectrophotomètre. Le contenu protéique est déterminé grâce à la gamme BSA.

# 2. Les glucides (G)

#### Extraction

L'extraction des glucides est faite d'après la méthode de Staats *et al.* (1999). 1 ml d'eau bi-distillée est ajouté à 100 mg de tissu broyé et ce mélange est vortexé puis incubé 1h à 35°C. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 1000 g pendant 10 minutes. 0.5 ml sont prélevés auxquels 2 ml d'éthanol absolu sont ajoutés. Les mélanges sont vortexés puis stockés 16h à -20°C. Les échantillons sont de nouveau centrifugés 30 minutes à 3200 g, le culot est gardé pour le dosage des glucides. Les falcons contenant les culots sont mis à l'étuve pendant une nuit à 60°C pour l'évaporation complète de l'éthanol.

#### Dosage

Le dosage des glucides est fait selon la méthode de Dubois *et al.* (1956). 1 ml d'eau bi-distillée est ajouté au culot afin de le dissoudre, puis le mélange est vortexé et centrifugé à 1000 g pendant 5 minutes. 1 ml de phénol 5% et 5 ml d'acide sulfurique 96% sont ajoutés à 0.1 ml d'extrait. Le mélange est incubé 30 minutes à température ambiante puis l'absorbance est lue à 485 nm au spectrophotomètre. La quantité de glucide est déterminée grâce à une gamme de glucose effectuée en parallèle.

# 3. Les lipides (L)

#### Extraction

L'extraction des lipides est faite selon la méthode de Bligh et Dyer (1959). 1 ml de chloroforme et 2 ml de méthanol sont ajoutés à 10 mg de tissu broyé. Le mélange est ensuite centrifugé 10 minutes à 1500 g. Le surnageant est récupéré et l'extraction est réitéré sur le culot. Sur les deux surnageant obtenus, 4 ml d'eau bi-distillée sont ajoutés puis le mélange est centrifugé de nouveau, 10 minutes à 1500 g. 2 phases se forment. Après pipetage de la phase supérieure, les falcons sont mis 1 nuit à 60°C pour évaporation et les culots sont placés dans des tubes en verre pour le dosage des lipides.

#### Dosage

Le dosage des lipides est effectué selon la méthode de Marsh et Weinstein (1966). 10 ml d'acide sulfurique 96% sont ajoutés au culot préalablement obtenu lors de l'extraction. Puis les tubes en verre sont incubés pendant 20 minutes à 200°C. Ensuite, 0.25 ml d'extrait incubé est ajouté à 0.75 ml d'eau bi-distillée. L'absorbance est lue à 360 nm au spectrophotomètre. La quantité de lipides est déterminée grâce une gamme de palmitate.

### 4. Le contenu en eau

Le taux d'humidité (ou contenu en eau) des échantillons est déterminé après avoir placé du tissu frais broyé 24h à l'étuve à 105°C. La différence de poids entre le tissu frais et le tissu sec est utilisée pour déterminer le taux d'humidité selon l'équation suivante :

207

Pourcentage d'humidité = [(Poids frais – Poids sec)/ Poids frais] x 100

# 5. Les acides gras

Les échantillons préparés sont envoyés au laboratoire départementale Franck Duncombe (St Contest, Basse-Normandie, France) pour les analyses d'acides gras. Certains échantillons n'ont pas pu être analysés car la quantité de lipides extraite était insuffisante.

# D. Les analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± erreur standard. Pour les œufs et les juvéniles à l'éclosion, les dosages biochimiques ont été comparés avec l'analyse des variances (ANOVA à deux facteurs pour la comparaison des sites et des années) en utilisant le logiciel « R statistical software ». Pour les juvéniles d'élevage de 7 à 35 jours post-éclosion, l'ANOVA à deux facteurs a été effectuée entre sites et jours post-éclosion pour chaque année séparée. Quand des différences étaient présentes, un test post hoc Tukey était réalisé pour déterminer les différences entre les groupes (p<0.05). Une ANCOVA a été utilisée pour comparer les pentes d'évolution des lipides, glucides et protéines entre sites et entre année (p<0.05).

# III. Résultats

# 1. Les proies collectées dans les sites français

Parmi les proies collectées, quelques familles étaient largement représentées dont celles des Carcinidae, Crangonidae, Palaemonidae et Gobiidae (Figure 55A). Ces quatre familles représentent à elles seules 91% des familles retrouvées sur le site d'AC et 56% des familles retrouvées sur le site BS (Figures 55B et 55C). En BS, deux autres familles représentaient pratiquement 40% des familles restantes, celles des Gammaridae et des Pleuronectidae (Figure 55C). Ces deux familles ne représentaient que 1.4% des familles retrouvées à AC. Des Syngnathidae, des Soleidae, des Clupeidae, des Ammodytidae, des Sepiidae et des Majidae ont également été retrouvés, représentant à peu près 6% des familles récoltées dans les deux sites français (Figure 55A).



Figure 55 : Liste des familles d'espèces collectées dans les deux sites français en juillet et en août 2010. A-Liste des familles avec le nombre d'individus (n) dans chaque site (AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine), B- Le pourcentage de chaque famille des espèces collectées à Agon Coutainville, C- Le pourcentage de chaque famille d'espèces collectées à Luc sur mer (Baie de Seine).

# 2. Composition GPL des œufs de seiche

Le contenu protéique, du vitellus et des embryons en formation, composait en moyenne 60 à 80% du poids sec des échantillons (**Figures 56A et 56B**). Le contenu en protéine, des œufs du site de TB en 2011 (**Figure 56B**), était plus faible de l'ordre de 40 à 45% du poids sec, ce contenu était inférieur (p < 0.05) aux contenus protéiques retrouvés sur le site de BS en 2010 (**Figure 56A**) et sur les sites de BS et AC en 2011 (**Figure 56B**).

Le contenu lipidique était très variable (**Figures 56C et 56D**). En 2010 (**Figure 56C**), aucune différence significative (p > 0.05) n'a été détectée entre les différents lots d'œufs. Leur contenu lipidique n'était pas différent (p > 0.05) du contenu retrouvé dans les œufs en 2011 (**Figure 56D**). En 2011, le contenu lipidique des œufs de TB était le plus élevé et ce dernier était supérieur (p < 0.05) au contenu lipidique des œufs d'AC (**Figure 56D**).

Le contenu glucidique des œufs n'était pas différent (p > 0.05) entre les sites en 2010 (**Figure 56E**). Et n'était pas différent (p > 0.05) de celui retrouvé dans les œufs en 2011 (**Figure 56F**). Pour cette dernière année, le contenu glucidique des œufs d'AC était (p < 0.05) supérieur à celui des œufs de BS (**Figure 56F**).

# 3. Composition GPL des juvéniles à l'éclosion

Le contenu protéique des juvéniles à l'éclosion a montré un profil similaire entre les deux années étudiées avec des différences plus marquées en 2010 (**Figures 57A et 57B**). En effet, en 2010 (**Figure 57A**), les juvéniles de SE avaient des contenus protéiques supérieurs (p < 0.05) à ceux des juvéniles de TB et de BS. Les juvéniles d'AC avaient un contenu protéique intermédiaire. En 2011 (**Figure 57B**), les juvéniles de SE avaient toujours le contenu protéique le plus élevé. Ce contenu protéique etait supérieur (p < 0.05) à celui des juvéniles de BS mais pas différent (p > 0.05) de celui des juvéniles des deux autres sites (AC et TB).

Comme décrit précédemment pour les œufs, le contenu lipidique des juvéniles à l'éclosion était très variable en 2010 (**Figure 57C**) et les valeurs retrouvées n'étaient pas différentes (p > 0.05) de celles des juvéniles en 2011 (**Figure 57D**). Cependant, en 2011 (**Figure 57D**), le contenu lipidique des juvéniles de SE était supérieur (p < 0.05) à celui des juvéniles de BS et de TB mais pas différente (p > 0.05) du contenu lipidique des juvéniles d'AC.



Figure 56 : Contenu en protéines, lipides et glucides totaux (% poids sec) des œufs de seiche (vitellus + embryon) provenant de 4 sites de ponte en Manche en 2010 (Graphes A, C et E) et 2011 (Graphes B, D et F) (n = 6/site/année). Les sites étudiés sont : AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine, SE : Selsey et TB : Torbay. ANOVA à deux facteurs : les barres ne portant pas la même lettre sont significativement différentes (p < 0.05).



Figure 57 : Contenu en protéines, lipides et glucides totaux (% poids sec) des juvéniles à l'éclosion provenant de 4 sites de ponte en Manche en 2010 (Graphes A, C et E) et 2011 (Graphes B, D et F) (n = 10/site/année). Les sites étudiés sont : AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine, SE : Selsey et TB : Torbay. ANOVA à deux facteurs : les barres ne portant pas la même lettre sont significativement différentes (p < 0.05).

Le contenu glucidique des juvéniles à l'éclosion (**Figures 57E et 57F**) était variable et n'a pas montré de différences significatives (p > 0.05) en 2010 (**Figure 57E**). En 2011 (**Figure 57F**), le contenu glucidique des juvéniles de TB était supérieur (p < 0.05) au contenu glucidique des juvéniles des deux autres sites (AC et SE) avaient des contenus intermédiaires.

# 4. Composition GPL des juvéniles d'élevage (7 à 35 jours post-éclosion)

Les valeurs de contenu protéique (% poids sec) retrouvées chez les juvéniles élevés en milieu expérimental variaient entre 36 et plus de 70% du poids sec des individus (**Tableau 22**). Très peu de différences significatives ont été enregistrées, dans les contenus protéiques, entre les sites et les stades de développement.

Tableau 22 : Dosage des protéines totales (% du poids sec) des juvéniles de seiche *Sepia officinalis* entre 7 et 35 jours post-éclosion de quatre sites de ponte différents et sur deux années différentes (2010 et 2011) (n = 5/site/jour-post-éclosion/année). Les sites étudiés sont : AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine, SE : Selsey et TB : Torbay. Les tests de significativité sont effectués entre sites et entre les différents jours post-éclosion (ANOVA à 2 facteurs, p< 0.05).

	Annóo	Jours		Sites					
	Annee	post-éclosion	BS	AC	ТВ	SE			
		7	53.4±5 <sup>abc</sup>	61.9 ± 5.7 <sup>abc</sup>	43.7±5.7 <sup>bc</sup>	40.4 ± 9.9 <sup>bc</sup>			
	0	14	63.7±5.7 <sup>abc</sup>	63 ± 7.6 <sup>abc</sup>	62.7±8.2 abc	72.4±3 <sup>a</sup>			
	201(	21	68.3 ± 3.4 <sup>ab</sup>	61.4 ± 2.1 <sup>abc</sup>	59.8 ± 7.7 <sup>abc</sup>	58.6 ± 3.2 abc			
		28	41.6±2.9 <sup>c</sup>	55.8 ± 3.6 <sup>abc</sup>	52.1 ± 2 <sup>abc</sup>	45.4 ± 4 <sup>bc</sup>			
		35	36.5±4.1 <sup>c</sup>	$43.4\pm3.1^{\rm c}$	45.1±4.6 <sup>bc</sup>	52.3 ± 7.8 <sup>abc</sup>			
		7	65.4 ± 3.3 <sup>ab</sup>	58.6±2.5 <sup>ab</sup>	69.4 ± 1.7 <sup>ab</sup>	68.8 ± 2.2 <sup>ab</sup>			
	-	14	47±6.3 <sup>ab</sup>	67.8±4.9 <sup>ab</sup>	66.3 ± 2.8 <sup>ab</sup>	58±4.4 <sup>ab</sup>			
	201:	21	45.7±0.9 <sup>b</sup>	54.8 ± 2.4 <sup>ab</sup>	65.1 ± 2.2 <sup>ab</sup>	57.3 ± 9.9 <sup>ab</sup>			
		28	72.6±2 <sup>a</sup>	70.6 ± 3.5 <sup>ab</sup>	70.7 ± 2.3 <sup>ab</sup>	$65 \pm 6.6^{ab}$			
		35	53 ± 10.2 <sup>ab</sup>	61.5±5.6 <sup>ab</sup>	57.2±6.9 <sup>ab</sup>	64.9 ± 3.5 <sup>ab</sup>			

a,b: Les chiffres ne portant pas la même lettre sont significativement différents (p < 0.05)

Le contenu lipidique variait entre 9 et 17 % du poids sec des individus (**Tableau 23**). Aucune différence significative (p > 0.05) n'a été relevée entre les sites et les stades de développement sur deux ans de suivi. Quant au contenu glucidique (**Tableau 24**), ce dernier présentait des différences (p < 0.05) mais aucune relation n'a été clairement identifiée en fonction des sites d'origine.

Tableau 23: Dosage des lipides totaux (% du poids sec) des juvéniles de seiche *Sepia officinalis* entre 7 et 35 jours post-éclosion de quatre sites de ponte différents et sur deux années différentes (2010 et 2011) (n = 5/site/jour-post-éclosion/année). Les sites étudiés sont : AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine, SE : Selsey et TB : Torbay. Les tests de significativité sont effectués entre sites et entre les différents jours post-éclosion (ANOVA à 2 facteurs, p< 0.05).

Annéo	Jours		Sites					
Annee	post-éclosion	BS	AC	ТВ	SE			
	7	16.1±3.3 <sup>a</sup>	17.6±1.7 <sup>a</sup>	12.2 ± 2.3 <sup>a</sup>	13.1±4 <sup>a</sup>			
0	14	9.1±1.6ª	10.4±0.4 <sup>a</sup>	$10.8 \pm 1.4$ <sup>a</sup>	12.7±1.7ª			
201	21	13.7±4.2 <sup>a</sup>	$10.2 \pm 2.7^{a}$	13.5 ± 1.9 <sup>a</sup>	11.4±1.5 <sup>a</sup>			
	28	12.2 ± 2.7 <sup>a</sup>	9.1±1.8 <sup>a</sup>	14.4 ± 2.1 <sup>a</sup>	13.1 ± 2.2 <sup>a</sup>			
	35	14.6±1.7 <sup>a</sup>	13±3.5ª	9.6±2.6ª	11.7±2ª			
	7	11.8±2.1 <sup>a</sup>	12.3±1.1 <sup>a</sup>	10.2±1.1 <sup>a</sup>	11.9±2.4ª			
сц.	14	13.5±1 <sup>a</sup>	9.7±1.9ª	11.7±0.4 <sup>a</sup>	11.8±1.4 <sup>a</sup>			
201	21	12.3±1.6ª	11.9±0.8ª	9.4±0.9 <sup>a</sup>	12.2±1 <sup>a</sup>			
	28	10.5±1.2 <sup>a</sup>	10.7±1.7 <sup>a</sup>	10.3±1.1 <sup>a</sup>	13.3±2.2 <sup>a</sup>			
	35	13.1±1 <sup>a</sup>	13.6±4.8 <sup>a</sup>	15.8±4 <sup>a</sup>	15.1 ± 2.1 <sup>a</sup>			

a,b: Les chiffres ne portant pas la même lettre sont significativement différents (p < 0.05)

Tableau 24: Dosage des glucides totaux (% du poids sec) des juvéniles de seiche *Sepia officinalis* entre 7 et 35 jours post-éclosion de quatre sites de ponte différents et sur deux années différentes (2010 et 2011) (n = 5/site/jour-post-éclosion/année). Les sites étudiés sont : AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine, SE : Selsey et TB : Torbay. Les tests de significativité sont effectués entre sites et entre les différents jours post-éclosion (ANOVA à 2 facteurs, p< 0.05).

Annéo	Jours		Sites					
Annee	post-éclosion	BS	AC	ТВ	SE			
	7	1.9±0.2 <sup>fg</sup>	$2\pm0.1^{efg}$	1.9±0.19 <sup>fg</sup>	$2.1\pm0.5$ defg			
0	14	3.8±0.7 <sup>bcde</sup>	3.7±0.4 bcde	$1.8\pm0.1^{\rm g}$	2±0.2 <sup>fg</sup>			
2010	21	$2.5\pm0.5$ defg	$2.2\pm0.08$ defg	$4.6 \pm 0.4^{ab}$	6±0.2 <sup>a</sup>			
	28	3.7±0.2 bcde	$4.5\pm0.3$ abc	$3.4\pm0.3$ bcdefg	$3.3 \pm 0.1$ bcdefg			
	35	$3.9\pm0.4$ bcd	3.5 ± 0.3 bcdef	5.1±0.5 <sup>ab</sup>	5±0.5 <sup>ab</sup>			
	7	$2.7\pm0.1^{abc}$	3.1±0.3 <sup>abc</sup>	$2.8\pm0.1$ abc	3.9±0.5 <sup>a</sup>			
-	14	1.7±0.3 <sup>c</sup>	$3.3\pm0.5$ abc	$2.6\pm0.3$ abc	$3.1\pm0.4$ abc			
201	21	1.7±0.3 c	$2.5\pm0.3$ abc	$2.7 \pm 0.05 \frac{abc}{c}$	$3.4\pm0.3$ abc			
	28	$3.8 \pm 0.9^{ab}$	$3.8\pm0.3$ <sup>a</sup>	3±0.6 abc	$3.1\pm0.6$ abc			
	35	$3.4 \pm 0.2^{abc}$	$3.5\pm0.3$ abc	$3.3\pm0.4$ abc	$2.5\pm0.1$ abc			

a,b,c,d,e,f,g: Les chiffres ne portant pas la même lettre sont significativement différents (p < 0.05)



Figure 58: Profils généraux de l'évolution des protéines, des lipides et des glucides chez les juvéniles de seiche *Sepia officinalis* au premier mois post-éclosion. Les données correspondent à l'ensemble des données des différents sites (AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine, SE : Selsey et TB : Torbay) et des deux années (2010 et 2011).

Les profils généraux des composants protéiques, lipidiques et glucidiques (**Figure 58**) ont ensuite été réalisés avec l'ensemble des données de l'éclosion jusqu'à 35 jours post-éclosion. Le profil général du contenu protéique montre une tendance stable au premier mois post éclosion. La comparaison des pentes d'évolution entre sites et entre années (**Tableau 25**) montre en effet que le contenu protéique en 2010 avait plus tendance à diminuer avec l'âge. A contrario, les pentes du contenu protéique, en 2011, étaient plutôt positives. Au cours des jours post-éclosion, le profil du

contenu lipidique des juvéniles était stable et celui des glucides tendait vers une légère augmentation en fonction de l'âge (**Figure 58**). Les pentes de ces composantes variaient peu entre les sites et entre les années (**Tableau 25**).

Tableau 25: Comparaison des pentes d'évolution des protéines, lipides et glucides chez les juvéniles de seiche *Sepia officinalis* au premier mois post-éclosion entre les sites étudiés (AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine, SE : Selsey et TB : Torbay) et entre les années 2010 et 2011.

Composanto	Annóo	Site				
composante	Annee -	BS	AC	ТВ	SE	
Protéines	2010	-0.32±0.33 <sup>ab</sup>	-0.50 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.11±0.31 <sup>ab</sup>	-0.51±0.31 <sup>ab</sup>	
totaux	2011	0.31±0.28 <sup>b</sup>	0.19 ± 0.28 <sup>ab</sup>	0.27±0.28 <sup>ab</sup>	-0.17±0.28 <sup>ab</sup>	
Lipides	2010	0.01 ± 0.11 <sup>ab</sup>	-0.06±0.08 <sup>a</sup>	0.02±0.11 <sup>ab</sup>	$-0.004 \pm 0.10^{ab}$	
totaux	2011	0.06 ± 0.11 <sup>ab</sup>	0.03±0.11 <sup>ab</sup>	0.15±0.10 <sup>b</sup>	$0.05 \pm 0.11^{ab}$	
Glucides	2010	0.03 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.04 ± 0.02 <sup>ab</sup>	$-0.009 \pm 0.02$ <sup>b</sup>	$0.04 \pm 0.02 ab$	
totaux	2011	-0.01 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.07 ± 0.02 <sup>a</sup>	$0.05 \pm 0.02$ <sup>ab</sup>	$0.09 \pm 0.02 a$	

a,b: les chiffres ne portant pas la même lettre sont significativement différents (p < 0.05)

# 5. Composition GPL des manteaux de pré-recrues

L'étude de la composition des manteaux de pré-recrues récoltées dans le milieu naturel n'a pas montré de différences significatives (p > 0.05) entre les pré-recrues des différents sites ni entre les pré-recrues des deux années d'échantillonnage (**Figures 59A à 59F**). Le contenu protéique des manteaux variait en moyenne entre 60 et 85% du poids sec des manteaux (**Figures 59A et 59B**). Le contenu lipidique était en moyenne de 1.5 à 2.3 % du poids sec (**Figures 59C et 59D**) et le contenu glucidique variait de 0.6 à 0.9% du poids sec des manteaux (**Figures 59E et 59F**).



Figure 59 : Dosage des contenu en protéines, lipides et glucides totaux (% poids sec) des manteaux de pré-recrues provenant de 3 sites de ponte en Manche en 2010 (Graphes A, C et E) et 2011 (Graphes B, D et F) (n = 5/site/année). Les sites étudiés sont : AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine et TB : Torbay. Les tests de significativité sont effectués entre sites et entre les deux années pour chaque dosage. Les barres ne portant pas la même lettre sont significativement différentes (p < 0.05).

# 6. Composition en acides gras des œufs, des juvéniles à l'éclosion, des manteaux de pré-recrues et des proies du milieu

#### Les œufs de seiche

La composition d'acides gras des œufs variait entre sites et entre années avec des tendances relevées pouvant discriminer les sites, les uns par rapport aux autres. Les œufs de BS et d'AC sont plus riches en acides gras saturés (AGS) comparés aux œufs des deux sites anglais (SE et TB) (**Tableau 26**). Ces derniers sont plus riches en acides gras poly-insaturés (AGPI) dont les acides eicosapentaénoïques (EPA, C20:5n3c), les omégas 3 (n-3) et le ratio oméga3/oméga6 (n-3/n-6). La teneur en acides docosahexaénoïques (DHA, C22:6n3c) n'est que légèrement supérieure dans les œufs des sites anglais. Pour le site de SE, seulement deux années ont été suivies et la composition en acides gras (AG) de œufs de ce site variaient entre les deux années. Les valeurs obtenues, en 2010, étaient proches de celles obtenues pour les œufs des sites français contrairement à 2011 où les valeurs des œufs se rapprochaient plus de celles du site TB (**Tableau 26**). Les œufs des sites français étaient plus riches en acide arachidonique (AA, C20:4n6c) et en oméga 6 (n-6), qui sont des AGPI, mais leur pourcentage par rapport à l'ensemble des AG reste plus faible. Les ratios AA/EPA et AA/DHA étaient aussi plus élevés dans les œufs des sites français. Finalement, le ratio EPA/DHA était variable entre les sites et entre les années tout comme pour les omégas 9 (n-9).

#### Les juvéniles de seiche à l'éclosion

En 2010, les juvéniles à l'éclosion étaient plus riches en AGS dans les sites français, et moins riches en AGI comparé aux sites anglais (**Tableau 27**). Ces résultats ressemblent à ceux observés précédemment dans les œufs. Les différences sont surtout marquées entre les juvéniles des sites de TB (UK) et de AC (FR). Les juvéniles du site d'AC sont plus riches en AA et en n-6 alors que les juvéniles du site de TB sont plus riches en EPA, DHA, n-3 et n-3/n-6 (**Tableau 27**). Les composants majeurs des acides gras, chez les juvéniles à l'éclosion, confirment les tendances observées au niveau des œufs pour les sites de TB et d'AC. Pour les juvéniles des deux autres sites, les valeurs des AG sont proches. La comparaison de la composition des juvéniles des sites anglais, entre l'année 2010 et l'année 2011, montre que les rapports AGS/AGI changent entre ces deux années, néanmoins les juvéniles du site TB gardent toujours un contenu supérieur en AGI, particulièrement en AGPI.

Année		2009			201	0	1		201	1	15 II
Site	BS	AC	TB	BS	AC	TB	SE	BS	AC	TB	SE
Composition											
C14:0	3,32	3,22	2,87	4,02	3,12	3,07	3,20	3,40	2,91	2,79	2,67
C16:0	23,63	23,24	22,99	26,41	24,41	23,88	24,78	23,90	23,25	23,08	21,67
C16:1n7c	0,46	0,53	0,52	0,47	0,51	0,38	0,46	0,48	0,40	0,38	0,34
C17:0	1,05	76'0	1,04	1,08	1,08	1,14	1,09	1,08	1,19	1,07	1,00
C18:0	9,14	9,37	8,50	8,64	9,98	8,92	9,33	9,25	9,56	8,67	8,56
C18:1n9c	2,85	2,60	2,72	2,18	2,59	2,44	2,50	2,51	2,57	2,52	2,45
C18:1n7c	1,30	1,40	1,26	1,17	1,43	1,19	1,36	1,40	1,38	1,25	1,25
C18:2n6t	0,21	0,15	0,24	0,23	0,20	0,27	,	0,23		0,27	
C18:2n6c	0,28	0,14	0,15	<b>60'0</b>	0,12	0,13	60'0	0,13	0,15	0,22	0,24
C20:1n9c	3,16	2,96	3,68	2,90	2,88	3,54	3,04	3,14	3,25	3,60	3,87
C20:2n6c	0,19	0,18	0,21	0,09	0,15	0,20	0,14	0,19	0,19	0,28	0,30
C20:4n6c	3,54	4,06	3,11	4,09	4,75	3,24	4,63	3,85	4,35	2,86	3,19
C20:5n3c	18,06	17,72	19,11	17,00	16,59	18,64	16,99	17,83	17,39	18,10	19,01
C22:4n6c	0,19	0,17	0,12		0,18	0,11	0,16	0,15	0,15	0,13	0,16
C22:5n3c	1,31	1,27	1,14	0,70	1,17	96'0	1,01	1,28	1,11	1,18	1,26
C22:6n3c	28,53	29,69	29,99	29,24	28,46	29,67	29,24	28,62	29,85	30,45	30,75
C24:0	0,58	0,56	0,42	0,42	0,55	0,36	0,57	0,47	0,54	0,35	0,44
Total											
AGS	38,62	38,15	36,62	41,60	40,17	38,26	39,85	39,09	38,40	36,85	35,08
AGI	61,38	61,85	63,38	58,40	59,83	61,74	60,15	60,91	61,60	63,15	64,92
AGMI	8,58	8,25	8,92	6,96	8,06	8,29	7,83	8,35	8,14	8,82	9,06
AGPI	52,80	53,60	54,47	51,44	51,78	53,45	52,32	52,57	53,46	54,34	55,86
n-3	48,38	48,90	50,63	46,93	46,38	49,51	47,29	48,01	48,61	50,57	51,96
n-6	4,20	4,55	3,60	4,27	5,20	3,67	5,03	4,33	4,85	3,49	3,90
6-u	6,01	5,60	6,40	5,08	5,47	5,97	5,54	5,64	5,82	6,13	6,32
n-3/n-6	11,51	10,74	14,08	10,98	8,91	13,48	9,40	11,09	10,03	14,48	13,34
EPA/DHA	0,63	0,60	0,64	0,58	0,58	0,63	0,58	0,62	0,58	0,59	0,62
AA/EPA	0,20	0,23	0,16	0,24	0,29	0,17	0,27	0,22	0,25	0,16	0,17
AA/DHA	0,12	0,14	0,10	0,14	0,17	0,11	0,16	0,13	0,15	60'0	0,10

Tableau 26: Composition en acides gras (%) des œufs (vitellus et embryon en formation) de seiche prélevés entre 2009 et 2011 sur différents sites de ponte anglo-normands. Les sites de ponte étudiés sont : AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine, SE : Selsey et TB : Torbay. AGS : Acides Gras Saturés, AGI : Acides Gras Insaturés, AGMI : Acides Gras Mono-Insaturés, AGPI : Acides Gras Poly-Insaturés, n-3 : Omega 3, n=6 : Omega 6, n-9 : Omega 9, EPA : Acide EicosaPentaenoique (C20 :5n-3), DHA : Acide DocosaHexaenoique (C22 :6n-3), AA : Acide Arachidonique (C20 :4n-6).

Année	2010		2011			
Site	BS	AC	ТВ	SE	ТВ	SE
Composition						
C14:0	2,32	2,24	1,95	1,75	2,62	2,87
C16:0	20,07	20,22	19,58	20,15	21,98	22,76
C16:1n7c	0,35	0,37	0,25	0,29	0,32	0,36
C17:0	1,01	1,02	1,10	1,07	1,02	1,09
C18:0	9,42	9,69	9,72	9,67	9,72	9,93
C18:1n9c	2,67	2,76	2,40	2,67	2,16	2,19
C18:1n7c	1,35	1,29	1,19	1,28	1,14	1,12
C18:2n6t	0,25	-	-	0,03	0,33	0,28
C18:2n6c	0,33	0,34	0,40	0,45	0,17	0,17
C20:1n9c	4,19	3,92	4,44	4,34	4,10	3,87
C20:2n6c	0,31	0,36	0,39	0,45	-	-
C20:3n3c	1,03	1,10	1,59	1,91	0,44	0,41
C20:4n6c	2,92	3,63	2,64	2,78	3,17	3,41
C20:5n3c	20,13	19,17	20,03	20,15	18,94	18,95
C22:4n6c	0,19	0,26	0,17	0,18	0,18	0,18
C22:5n3c	1,45	1,51	1,35	1,31	1,20	1,27
C22:6n3c	29,92	29,99	30,56	28,92	30,52	29,16
C24:0	0,31	0,41	0,24	0,33	0,40	0,39
Total						
AGS	33,62	34,07	32,98	33,44	36,50	37,80
AGI	66,38	65,93	67,02	66,56	63,50	62,20
AGMI	9,78	9,55	9,72	10,28	8,48	8,33
AGPI	56,61	56,38	57,30	56,28	55,03	53,87
n-3	52,57	51,77	53,59	52,34	51,13	49,80
n-6	3,78	4,61	3,71	3,92	3,57	3,79
n-9	6,86	6,68	6,84	7,00	6,26	6,06
n-3/n-6	13,90	11,24	14,44	13,36	14,31	13,13
EPA/DHA	0,67	0,64	0,66	0,70	0,62	0,65
AA/EPA	0,15	0,19	0,13	0,14	0,17	0,18
AA/DHA	0,10	0,12	0,09	0,10	0,10	0,12

Tableau 27: Composition en acides gras (%) des juvéniles de seiche à l'éclosion issus d'œufs prélevés en 2010 et 2011 sur différents sites de ponte anglo-normands. Les sites de ponte étudiés sont : AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine, SE : Selsey et TB : Torbay. AGS : Acides Gras Saturés, AGI : Acides Gras Insaturés, AGMI : Acides Gras Mono-Insaturés, AGPI : Acides Gras Poly-Insaturés, n-3 : Omega 3, n=6 : Omega 6, n-9 : Omega 9, EPA : Acide EicosaPentaenoique (C20 :5n-3), DHA : Acide DocosaHexaenoique (C22 :6n-3), AA : Acide Arachidonique (C20 :4n-6).

Année		2010			2011	
Site	BS	AC	тв	BS	AC	тв
Composition						
C14:0	4,50	2,45	3,75	4,19	3,56	3,53
C16:0	21,61	18,63	21,89	20,18	22,26	22,62
C16:1n7c	0,82	0,53	0,78	0,77	0,76	0,76
C17:0	0,95	0,91	1,33	0,84	0,85	1,39
C18:0	7,28	8,42	6,88	6,34	6,58	6,79
C18:1n9c	4,52	3,35	3,98	3,74	3,70	4,23
C18:1n7c	1,87	1,65	2,17	1,82	1,60	2,31
C18:2n6c	0,66	0,44	0,65	0,67	0,66	0,74
C18:3n6c	0,06	0,02	0,05	0,04	0,05	0,08
C18:3n3c	0,08	0,06	0,09	0,08	0,09	0,12
C20:1n9c	3,35	3,29	3,31	3,48	3,02	3,92
C20:2n6c	0,26	0,35	0,25	0,23	0,26	0,30
C20:4n6c	1,16	4,52	1,63	1,19	2,48	1,15
C20:5n3c	20,40	17,18	17,02	20,65	17,55	12,19
C22:4n6c	0,18	0,45	0,17	0,19	0,48	0,22
C22:5n3c	2,57	1,65	1,50	2,65	2,70	1,96
C22:6n3c	27,26	34,15	31,71	30,93	30,68	34,87
C24:0	0,20	0,58	0,43	0,31	0,57	0,53
Total						
AGS	35,63	31,71	35,42	32,70	34,73	36,04
AGI	64,37	68,29	64,58	67,30	65,27	63,96
AGMI	11,30	9,11	10,95	10,34	9,83	11,86
AGPI	53,07	59,18	53,63	56,95	55,44	52,10
n-3	50,60	53,40	50,66	54,63	51,35	49,61
n-6	2,32	5,78	2,75	2,32	3,93	2,49
n-9	7,87	6,64	7,30	7,22	6,72	8,16
n-3/n-6	21,83	9,23	18,40	23,55	13,06	19,92
EPA/DHA	0,75	0,50	0,54	0,67	0,57	0,35
AA/EPA	0,06	0,26	0,10	0,06	0,14	0,09
AA/DHA	0,04	0,13	0,05	0,04	0,08	0,03

Tableau 28: Composition en acides gras (%) des manteaux de pré-recrues de seiche prélevées en 2010 et 2011 dans différents sites de ponte anglo-normands. Les sites de ponte étudiés sont : AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine et TB : Torbay. AGS : Acides Gras Saturés, AGI : Acides Gras Insaturés, AGMI : Acides Gras Mono-Insaturés, AGPI : Acides Gras Poly-Insaturés, n-3 : Omega 3, n=6 : Omega 6, n-9 : Omega 9, EPA : Acide EicosaPentaenoique (C20 :5n-3), DHA : Acide DocosaHexaenoique (C22 :6n-3), AA : Acide Arachidonique (C20 :4n-6).

Site	Baie de Seine (BS)			Agon Coutainville (AC)		
Genre	Carcinus	Crangon	Palaemon	Carcinus	Crangon	Palaemon
Composition						
C14:0	1,35	2,15	1,86	1,48	2,02	1,88
C16:0	20,43	20,63	20,35	25,64	24,11	21,21
C16:1n7c	2,36	6,10	5,68	3,11	4,56	5,24
C17:0	0,90	0,78	0,99	1,22	1,53	0,78
C18:0	11,24	5,02	8,55	11,39	7,74	7,67
C18:1n9c	8,60	12,37	10,47	10,94	9,05	11,83
C18:1n7c	9,11	6,44	7,76	3,52	6,12	8,15
C18:2n6c	0,56	1,22	1,85	0,71	0,99	2,18
C18:3n3c	0,60	1,16	2,26	0,39	0,25	0,98
C20:1n9c	0,59	0,46	0,30	0,48	0,14	0,27
C20:2n6c	0,83	0,37	0,42	0,73	0,20	0,32
C20:4n6c	3,94	2,16	2,01	6,93	4,18	3,39
C20:5n3c	23,86	20,19	20,58	20,30	17,61	18,89
C22:4n6c	0,24	0,72	0,19	-	0,45	0,13
C22:5n3c	1,86	2,83	1,41	1,51	1,44	0,71
C22:6n3c	10,80	12,79	11,46	10,01	15,67	14,67
C24:0	0,33	0,18	0,40	-	0,80	0,25
Total						
AGS	35,63	30,08	33,50	41,12	37,76	32,66
AGI	64,37	69,92	66,50	58,88	62,24	67,34
AGMI	21,37	27,50	25,20	18,30	21,28	25,69
AGPI	43,00	42,42	41,30	40,57	40,96	41,66
n-3	37,43	37,57	36,56	32,21	34,98	35,43
n-6	5,56	4,64	4,74	8,37	5,98	6,22
n-9	9,18	13,00	10,83	11,42	9,19	12,22
n-3/n-6	6,73	8,10	7,72	3,85	5,85	5,70
EPA/DHA	2,21	1,58	1,80	2,03	1,12	1,29
AA/EPA	0,16	0,11	0,10	0,34	0,24	0,18
AA/DHA	0,36	0,17	0,18	0,69	0,27	0,23

Tableau 29: Composition en acides gras (%) des proies prélevées en 2010 sur deux sites de ponte français. AGS : Acides Gras Saturés, AGI : Acides Gras Insaturés, AGMI : Acides Gras Mono-Insaturés, AGPI : Acides Gras Poly-Insaturés, n-3 : Omega 3, n=6 : Omega 6, n-9 : Omega 9, EPA : Acide EicosaPentaenoique (C20 :5n-3), DHA : Acide DocosaHexaenoique (C22 :6n-3), AA : Acide Arachidonique (C20 :4n-6).

#### Les manteaux des pré-recrues

La composition des manteaux des pré-recrues récoltées à TB en 2010 et en 2011 a montré que ces derniers étaient moins riches en AGI que ceux des sites français, à l'exception des pré-recrues du site de BS récoltées en 2010 (**Tableau 28**). Concernant les deux sites français (AC et BS), la teneur en AGI, des manteaux des pré-recrues d'AC, était plus élevée que dans ceux des pré-recrues de BS en 2010, mais moins élevée que dans ceux des pré-recrues de BS en 2010, mais moins élevée que dans ceux des pré-recrues de BS en 2011. Ces variations, entre les trois sites, sont retrouvées dans les composants (i.e. AA, EPA, DHA, n-3, n-6). L'étude des ratios de ces composants indique des signatures stables dans le temps pour chacun des sites. Les ratios n-3/n-6 et EPA/DHA sont les plus élevés au niveau des manteaux des pré-recrues de BS, suivis de ceux de TB, puis ceux de AC (excepté pour EPA/DHA – TB en 2011), alors que les ratios AA/EPA et AA/DHA ont un profil inverse (i.e. AC>TB>BS) (**Tableau 28**). La signature de ces ratios dans le manteau des pré-recrues pourra servir à discriminer les individus des trois sites.

### Proies récoltées dans les sites français

Les espèces *Carcinus* et *Crangons* du site BS sont plus riches en AGI qu'au site AC. A l'inverse, les *Palaemons* sont plus riches en AGI au site AC qu'au site BS (**Tableau 29**). L'étude des ratios montre une meilleure discrimination des deux sites. En effet, les ratios n-3/n-6 et EPA/DHA sont supérieurs, chez les proies provenant du site BS, comparé à ceux d'AC. Et inversement, les ratios AA/EPA et AA/DHA sont supérieurs, chez les proies du site supérieurs du site d'AC, comparé à ceux de BS (**Tableau 29**). Ceci est en accord avec les observations faites sur les manteaux des pré-recrues (**Tableau 28**).

# **IV.** Discussion

# 1. Composition des œufs issus des différents sites étudiés et des juvéniles de seiche provenant du milieu expérimental

Le contenu GPL (% poids sec) des œufs (vitellus et embryon) est composé essentiellement de protéines (60 à 80% du poids sec), entre 10 et 20% de lipides et moins de 5% de glucides. Les seiches ont un métabolisme énergétique basé sur la disponibilité et le catabolisme des protéines et des acides aminés (O'Dor *et al.*, 1984 ; Lee, 1994). Une importante quantité de protéines dans les œufs est primordiale pour une bonne croissance embryonnaire. Le contenu lipidique des œufs est aussi élevé, comparé à celui retrouvé dans le manteau des pré-recrues (< 2% poids sec). Ce composant est important au cours de l'embryogenèse puisqu'il représente une part importante de la composition du vitellus (Bouchaud et Galois, 1990) et est probablement utilisé en tant que composant structurel de l'organogenèse mais pas en tant que source énergétique. Sykes *et al.* (2008) ont montré que le contenu en lipides des œufs du milieu naturel était stable au cours du développement embryonnaire, ce qui indiquerait que les fractions protéines et/ou glucidiques assureraient l'énergie nécessaire au développement. L'importance des protéines et des glucides a aussi été indiquée par O'Dor *et al.* (1984) en tant qu'énergie mobilisée pour la croissance.

Des différences significatives en contenu GPL ont été relevées en 2011 entre les sites étudiés. En effet, le contenu protéique des œufs de TB était inférieur à celui des autres sites, et leur contenu lipidique étaient plus riches. Il est peu probable, au vu de la méthodologie utilisée, que le faible taux protéique soit dû au mélange des différents stades de développement embryonnaire puisque des œufs de toutes tailles avaient été sélectionnés, comme pour les autres sites et dans les mêmes proportions. Ce faible taux serait lié davantage au site d'origine. Ce faible contenu protéique n'a pas affecté le taux d'éclosion des œufs (Chapitre 1-II). En 2011, une forte mortalité a été observée chez les juvéniles de TB au cours de leur croissance post-éclosion (Chapitre 1-II). De même, l'étude du système immunitaire a montré que les activités lysozymales dans ces œufs étaient particulièrement faibles (Chapitre 3-III), engendrant ainsi une plus forte vulnérabilité des juvéniles aux maladies et aux infections, et donc de fortes mortalités. Le faible contenu protéique confirme l'hypothèse d'un problème au niveau de la qualité de ce lot d'œufs. Toutefois, le problème serait plus de nature qualitative que de nature quantitative. Le faible contenu en protéines n'a pas empêché le bon déroulement de la croissance embryonnaire, étant donné le taux d'éclosion élevé (93%). La quantité et la qualité du vitellus sont d'une importance primordiale pour le succès du

développement embryonnaire mais aussi post-embryonnaire (Sykes et al., 2008). La qualité des protéines et des acides aminés, composant le vitellus, est importante. En effet, parmi les acides aminés, certains sont particulièrement importants et peuvent être limitant comme les lysines, leucines et arginines. Ces trois acides aminés représentent à eux seuls la moitié des acides aminés essentiels (Villanueva et al., 2004). Quant aux protéines, celles-ci englobent les enzymes, essentielles à la digestion du vitellus au cours de l'embryogenèse, telles que les phosphatases acides et les cathepsines (Lacoue-Labarthe, 2010b), mais aussi des enzymes immunitaires aidant à la protection de l'embryon. La qualité des œufs peut aussi être évaluée par leur composition en acides gras (AG) (Almansa et al, 2006). Le contenu lipidique et les composants lipidiques des œufs sont transmis par la mère et ces réserves sont issues des lipides stockés et de l'alimentation des femelles (Sykes et al., 2008). Mais la composition en AG des œufs et des juvéniles à l'éclosion (issus de ces œufs) n'a pas révélé de différences marquées en considérant les différentes années étudiées. La qualité concernerait certaines activités enzymatiques (Chapitre 3-III) et ce problème pourrait survenir lors du transfert maternel du vitellus dans l'œuf. Théoriquement, les œufs dans la nature possèdent tous les nutriments nécessaires pour une bonne croissance et une bonne homéostasie des individus en formation jusqu'au début de leur alimentation exogène (Sykes et al., 2008). Il serait de même pour les enzymes protectrices telles que les phénoloxydases (Lacoue-Labarthe, 2009a) ou les lysozymes (Chapitre 3-III). Le faible taux d'activité lysozymale et la faible quantité de protéines dans les œufs seraient dû à un problème de quantité et de qualité de vitellus transféré par la mère. L'alimentation des femelles se reflète dans la composition des œufs (Sykes *et al.*, 2008) et donc peut influencer leur qualité aussi.

L'étude de la composition des acides gras (AG) dans les œufs a montré que les acides gras saturés (AGS) étaient essentiellement formés par les C16:0 et les C18:0, les acides gras mono-insaturés (AGMI) par les omégas 9 (n-9) et les acides gras poly-insaturés (AGPI) par les acides arachidoniques (AA, C20:4n6c), les acides eicosapentaénoiques (EPA, C20:5n3c) et les acides docosahexaénoiques (DHA, C22:6n3c) faisant partis des omégas 3 (n-3) et 6 (n-6). Ce profil est en accord avec ceux de Sykes *et al.* (2008) qui trouvent les mêmes répartitions. Parmi tous ces composants, les EPA et les DHA représentent une importante part. Parmi les AGPI, les DHA et les EPA ont des rôles physiologiques importants (Almansa *et al.*, 2006). Ces n-3 sont cruciaux pour les jeunes stades de vie des céphalopodes puisqu'ils rentrent dans la synthèse des membranes et stimulent la croissance des jeunes stades (Navarro et Villanueva, 2000 ; Koueta *et al.*, 2002). La

225

distribution des différentes classes d'AG décrite dans les œufs, est retrouvée au niveau des juvéniles à l'éclosion ainsi qu'au niveau du manteau des pré-recrues. Ceci indiquerait que la proportion de ces différents AG est importante aux différents stades de vie de la seiche. Des signatures différentes des AG dans les œufs ont néanmoins été observées entre sites. L'analyse en composantes principales a permis une visualisation de ces différences (**Figure 60**).



Figure 60: Analyse en composantes principales de la composition en acides gras des œufs de seiche *Sepia officinalis* issus de quatre sites de ponte anglo-normands et de trois années d'étude (2009, 2010 et 2011). Les sites représentés sont : AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine, SE : Selsey et TB : Torbay. Les acides gras étudiés sont : AA (Acide Arachidonique), EPA (Acide EicosaPentaénoïque), DHA (Acide DocosaHexaénoïque), n-3 (Oméga 3), n-6 (Oméga 6), n-9 (Oméga 9) et les ratios AA/EPA et AA/DHA.

Les signatures des AG des œufs montrent trois groupes dont deux proches, les deux sites français (AC et BS) d'un côté et le site de TB de l'autre. La signature de TB est principalement due aux EPA, n-3 et ratio n-3/n-6 alors que les sites français ont une signature marquée par les AA, n-3 et ratios AA/EPA et AA/DHA. Quant aux œufs de SE, la signature des œufs est différente selon l'année étudiée (2010 et 2011). Les œufs de 2010 ont une signature proche de celle des œufs français. Les œufs de 2011 ont une signature proche de celle des œufs de TB. Ceci pourrait indiquer un changement d'alimentation des femelles de ce site entre les années modifiant alors la signature du vitellus de l'œuf (Sykes *et al.,* 2008). Un autre point a été noté au niveau de la composition des œufs dans le contenu total en AGS/AGI où les œufs anglais étaient toujours plus riches en AGI et particulièrement les AGPI. Ces œufs avaient en parallèle le meilleur taux d'éclosion sur l'ensemble des années de suivi (Chapitre 1-II). Plusieurs études ont mis en évidence l'importance des AGPI dans la nutrition des céphalopodes et particulièrement durant les jeunes stades de

développement (Navarro et Villanueva, 2000 ; Koueta *et al.*, 2002 ; Almansa *et al.*, 2006). Le fait que les œufs anglais soient plus riches en AGPI pourrait donc être une des raisons de leur meilleur taux d'éclosion.

Les juvéniles à l'éclosion ont des profils protéiques similaires au contenu du vitellus interne (Chapitre 2-II). Les contenus en protéines totales (% poids sec) à l'éclosion reflètent donc les réserves vitellines internes. Un dosage de protéines totales pourrait ainsi être envisagé pour estimer les réserves vitellines remplaçant toutes les étapes histologiques nécessaires à l'estimation des contenus. Les réserves de vitellus interne plus importantes pourraient favoriser la survie des juvéniles lorsque la disponibilité des aliments est mauvaise dans les premiers jours post-éclosion (Chapitre 2-II). Ce dosage simple pourrait donc être développé en tant qu'indice pour une estimation de la survie des juvéniles. Quant à la composition des juvéniles en AG à l'éclosion, les valeurs des différents composants étaient en accord avec celles trouvées par Navarro et Villanueva (2000) sur des nouveau-nés de seiche.

L'élevage des juvéniles des différents sites de ponte dans les mêmes conditions biotiques et abiotiques et avec le même aliment a induit la disparition des différences de composition en GPL des juvéniles. Les différences observées à l'éclosion étaient essentiellement dues au contenu vitellin. Or, ces différences ont disparu entre 7 et 35 jours d'élevage. Les profils généraux des protéines et des lipides montrent des contenus stables entre 0 et 35 jours post-éclosion. Ceci indiquerait que les juvéniles ne stockent pas ces composants au cours du premier mois de vie. Durant cette phase, la croissance est exponentielle et d'importantes modifications physiologiques ont lieu, telles que la formation d'organes avec le développement de la glande digestive (Yim et Boucaud-Camou, 1980) et les modifications au niveau du système nerveux central (Dickel *et al.,* 1997 ; Dickel *et al.,* 2002). Quant aux glucides, la légère tendance à l'augmentation observée pourrait indiquer un stockage de ce composant.

# 2. Composition du manteau des pré-recrues et des proies récoltées dans différents sites de ponte

L'étude de la composition biochimique du manteau des seiches est d'une grande importance, non seulement pour déterminer les processus métaboliques impliqués mais aussi pour fournir des données sur la qualité des aliments ingérés (Almansa et al., 2006). Le contenu GPL des manteaux des pré-recrues des différents sites n'a pas montré de différences significatives. Le contenu protéique était entre 60 et 80% du poids sec, les lipides en moyenne à moins de 2% et les glucides à moins d'1%. Le manteau des céphalopodes est principalement composé de protéines (75 à 85% du poids sec) alors que les lipides représentent moins de 2% du poids sec (Lee, 1994). Sykes et al. (2009) ont travaillé sur la composition du manteau des seiches et trouvent un contenu protéique de l'ordre de 80% du poids sec et un contenu lipidique de l'ordre de 0.4 % du poids sec. Nos résultats sont du même ordre de grandeur que ceux décrits par Lee (1994) et Sykes et al. (2009). La variabilité observée est liée aux valeurs de contenu en eau oscillantes entre 70 et 90% du poids frais alors que Sykes et al. (2009) ont trouvé une faible variabilité dans le taux d'humidité des manteaux (79.55 ± 0.14 %). Quant au faible taux de glucides, ceci semble normal chez les céphalopodes. Les muscles des céphalopodes contiennent une faible concentration en glycogène, ce composant n'étant pas un produit de stockage chez ces animaux (Moltschaniwskyj et Jackson, 2000).

L'étude de la composition en AG du manteau a révélé des différences intéressantes. En effet, le manteau des pré-recrues du site de TB était moins riche en AGI que celui des pré-recrues des sites français, avec néanmoins une différence moins marquée avec BS. Le ratio n-3/n-6 et les EPA marquent plus le manteau des pré-recrues de BS alors que le contenu en n-9 marque ceux de TB. Quant aux pré-recrues du site d'AC, le manteau est plus riche en AA et les ratios AA/DHA et AA/EPA (**Figure 61-A**). La différence la plus marquée est entre AC et les deux autres sites.

L'étude de la composition des proies, collectées dans les deux sites français, renforce les observations faites sur les manteaux des pré-recrues. En effet, la signature des proies est similaire à celle trouvée dans les manteaux des seiches (**Figure 61-B**).

228


Figure 61: Analyse en composante principales de la composition en acides gras des manteaux de seiche *Sepia officinalis* (A) et des proies récoltées dans les sites côtiers (B) sur deux ans de suivi (2010 et 2011). Les sites représentés sont : AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine et TB : Torbay. Les acides gras étudiés sont : AA (Acide Arachidonique), EPA (Acide EicosaPentaénoïque), DHA (Acide DocosaHexaénoïque), n-3 (Oméga 3), n-6 (Oméga 6), n-9 (Oméga 9) et les ratios AA/EPA et AA/DHA.

Les *Palaemons,* les *Carcinus* et les *Crangons* de BS sont plus riches en ratio n-3/n-6 et en EPA que ceux d'AC alors que ces derniers sont plus riches en AA, AA/DHA et AA/EPA. La forte signature de *Carcinus* à AC en AA, AA/EPA et AA/DHA, semblable à celle des manteaux de seiches de ce site, pourrait indiquer une alimentation des pré-recrues de ce site fortement représentée par ce genre de proies. Cette observation est soutenue par le fait que l'étude des contenus stomacaux des pré-

recrues d'AC (Léonard *et al.*, 2012) a révélé qu'au niveau de ce site, les petites seiches avaient une alimentation essentiellement basée sur la consommation des décapodes (84%) alors qu'en BS, l'alimentation était plus variée (38% poissons, 31% de décapodes, 8% d'amphipodes etc) (Léonard *et al.*, 2012). De plus, l'étude des isotopes stables du carbone et de l'azote réalisée sur le manteau des pré-recrues et des proies du milieu, indique la présence des mêmes sources alimentaires dans les deux sites français. Les proportions des proies sont différentes avec les pré-recrues d'AC ayant une forte représentation de crabes dans leur régime alimentaire (Grangeré, 2012).

La teneur en acides gras poly-insaturés (AGPI) du manteau des seiches était en moyenne 5 fois plus importante que leur teneur en acides gras mono-insaturés (AGMI). En comparaison, les proies récoltées avaient un rapport AGMI/AGPI d'1/2. Almansa *et al.* (2006) avaient déjà observé une telle différence de signature entre le manteau des seiches et celle des proies et ces auteurs avaient suggéré que ce faible taux indiquerait que les AGMI sont peu stockés dans le manteau de *S. officinalis.* Nos résultats confirment les observations faites par ces auteurs. De plus, un rapport 1/5 (AGMI/AGPI) était non seulement présent dans le manteau des seiches mais aussi dans les œufs et chez les juvéniles post-éclosion. Ces résultats indiquent que les AGMI sont peu stockés dans l'ensemble des jeunes stades de vie de la seiche (*i.e.* développement embryonnaire, juvéniles post-éclosions et pré-recrues) et la forte représentation des AGPI montre que ces AG sont essentiels aux différents stades de vie de *S. officinalis*.

#### V. Conclusion

L'étude de la qualité des œufs, des juvéniles à l'éclosion, des manteaux des pré-recrues et des proies du milieu a permis d'avoir des informations essentielles concernant le contenu protéique et le profil des acides gras.

Le contenu protéique des œufs a montré un faible contenu pour le site de TB en 2011. Les juvéniles issus de ces œufs avaient un fort taux de mortalité ainsi qu'une faible activité lysozymale, reflétant une qualité inférieure de ce lot. Le profil d'acides gras n'a pas révélé de différences dans la qualité des œufs entre les différents groupes d'œufs.

Ensuite, le contenu protéique des juvéniles à l'éclosion était quant à lui similaire au contenu en vitellus interne des nouveau-nés (**Tableau 30**). Le profil des protéines, des glucides et des lipides était stable au cours des élevages jusqu'à 35 jours post-éclosion.

Tableau 30: Tableau récapitulatif des réserves vitellines (vitellus interne) et du contenu protéique (% poids sec) des juvéniles de seiche *Sepia officinalis* à l'éclosion. Les sites étudiés sont : AC : Agon Coutainville, BS : Baie de Seine, SE : Selsey et TB : Torbay.

	BS	AC	тв	SE
Réserves vitellines	+	++	+	+++
Contenu protéique (% poids sec)	+	++	+	+++

Enfin, l'étude des acides gras a montré des différences, dans leurs composants, entre les sites de collecte des œufs et des pré-recrues. Ceci a permis de discriminer les œufs et les pré-recrues en fonction de leur origine et de voir que la signature des manteaux des pré-recrues se rapprochait de celles des proies du milieu d'origine. Ces résultats sont à confirmer en augmentant le nombre d'échantillons. De plus, il serait intéressant de voir comment ces signatures évolueraient après la migration des pré-recrues vers le large.

# CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

# **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

# I. Principaux résultats obtenus au cours de ce travail

La compréhension des fluctuations d'abondance des populations marines implique la recherche des mécanismes affectant le renouvellement des classes exploitées par l'entrée dans la pêcherie de juvéniles appelés recrues. Le recrutement au sens halieutique désigne à la fois le phénomène de l'arrivée des juvéniles dans le stock et l'effectif des recrues (Laurec et Leguen, 1981). Les conditions rencontrées par les œufs et les juvéniles affectent le recrutement de la population adulte et cette influence pourrait se révéler plusieurs mois après dans une zone complètement différente (Pierce *et al.*, 2008). Jusqu'à présent, la variabilité spatio-temporelle des premiers stades de vie de la seiche, dits stades « de pré-recrues », a été très peu étudiée. L'objectif de ce travail était d'une part, de développer de nouveaux outils biochimiques afin de décrire les performances physiologiques des jeunes seiches, et d'autre part d'améliorer la connaissance des caractéristiques des pré-recrues dans différents sites de ponte en Manche présentant des conditions environnementales contrastées.



Dans ce but, la collecte d'œufs sur les sites de ponte français (Agon-Coutainville AC et Baie de Seine BS) et anglais (Torbay TB et Selsey SE) a été réalisée dans un premier temps. Les axes de recherche développés au cours de cette thèse ont permis de mettre en évidence l'existence de variabilités spatiale et temporelle dans le taux d'éclosion et dans la qualité des œufs. Le taux d'éclosion des œufs anglais est supérieur à ceux des sites français et ce taux varie d'une année à l'autre au sein d'un même site et entre les sites. Ces taux d'éclosion supérieurs sont liés à deux facteurs importants que sont les températures d'incubation plus faibles dans les sites anglais ainsi que la composition des œufs anglais, plus riches en acides gras poly-insaturés, comparé aux œufs des sites français. Un décalage dans la période des éclosions a été également observé avec des éclosions plus tardives pour les sites anglais. Au niveau de la qualité des œufs, des changements interannuels ont été relevés. En effet, les œufs du site de TB en 2011 ont montré une qualité

inférieure (*i.e.* faible contenu protéique du vitellus et faible activité des lysozymes) à celle des œufs collectés les années précédentes (*i.e.* 2009 et 2010), augmentant la fragilité de ce lot.



Après la collecte des œufs des différents sites, des suivis de croissance expérimentaux sur 35 jours post-éclosion ont été réalisés dans un deuxième temps afin d'étudier les caractéristiques des juvéniles (**Figure 62**). Trois périodes ont été distinguées :

- 1- A l'éclosion (0 DAH),
- 2- La première semaine de croissance (0-7 DAH),
- 3- La croissance entre 7 et 35 jours (7-35 DAH).

Les caractéristiques des nouveau-nés à l'éclosion (0 DAH) et au cours de la première semaine (0-7 DAH) sont sous l'influence directe des conditions d'incubation des œufs dans le milieu naturel. La dernière période (7-35 DAH) reflète l'influence croissante des conditions expérimentales.

A l'éclosion (0 DAH), les nouveau-nés de BS sont toujours plus gros que ceux d'AC (suivis sur 4 ans). Les seiches de SE disposent d'une plus grande quantité de vitellus interne et de contenu protéique (% poids sec), suivies des seiches d'AC puis de celles de TB et de BS. Le développement de la glande digestive est inversement corrélé au contenu vitellin (suivi sur 2 ans) (**Figure 62**). De plus, la signature en acides gras des juvéniles est similaire à celle observée dans les œufs. Les juvéniles des sites anglais ont une signature plus riche en acides gras insaturés, comparé à celle des juvéniles des sites français. Ces constatations montrent la présence d'une stabilité spatiotemporelle concernant plusieurs caractéristiques des juvéniles à l'éclosion. Les réserves vitellines des seiches de SE indiquent que ces juvéniles ont de meilleures chances de survie dans le milieu naturel en cas de faible disponibilité des sources alimentaires.

Les poids des juvéniles observés entre chaque site sont différents d'une année à l'autre. Par rapport à la distribution des poids des juvéniles des sites français, celle des poids des juvéniles des sites anglais est intermédiaire en 2009 et 2010 mais supérieure en 2011. Ces évolutions montrent l'existence de variabilités interannuelles au sein d'une même zone géographique et entre les différentes zones étudiées.

		Eng	gland	52/35	~
	At a l	Отр	and a	SE	
	and a starter				
50°0'0'N		Engli	sh Channel		/
		7	Cotentin Peningula	2. <u>BS</u>	-
			End of		
49°0'0'N		- AND	<u>AC</u>	1	
	" Engli	the start	marine 2	France	
	and the second	19 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 - 1 -		<u>-</u>	
48*0'0''N	· Sata			0 15 30 60	90 120
	5°0'0'W 4°0'0'W	3°0'0'W	2°00'W	1°0'0'W 0°0'0	**
Période					
étudiée	Caractéristiques	BS	AC	ТВ	5
<del>963</del>			10.00		
	Poids	+++	+	++	
	Vitellus interne	+	++	+	-
0 DAH	Contenu	+	44	+	50
U DAII	protéique	1			
	Développement	+++	++	+++	
	glande digestive				
	Activitós				
	digestives acides	+	++	+	
	Ratios activités				
	digestives	+++	++	+++	
	Alcalines/acides				
	Activité				
0-7	immunitaire 2009-	++	++	++	
DAH	2010				
	Activitó				
i	immunitaire 2011	++	++	+	
	ininiunitaire 2011				
	Taux de survie	++	++	+	
	2011			•	
	Taux do	4	4		
	Taux d'ingestion	T	- -	Ţ	
	Taux de	т +	т +	т +	
	Performances				
14-35	digestives	+	+	+	
DAH	Activité				
	immunitaire (i.e.	+	+	+	
	lysozyme)			10.00	
	Contenu GPL	+	+	+	
	Taux de survie		5-10-10-10-10-10-10-10-10-10-10-10-10-10-		
0-35	2009	+++	+++	+++	
DAH	2010	+++	+++	++++	
	2011	+++	+++	+	8

GPL: Glucides, protéines, lipides

Figure 62 : Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus sur les variations spatiales et temporelles des caractéristiques des juvéniles de seiche *Sepia officinalis* en Manche. Les sites étudiés sont : AC : Agon Coutainville (FR), BS : Baie de Seine (FR), SE : Selsey (UK) et TB : Torbay (UK).

Au cours de la première semaine de développement post-embryonnaire (0-7 DAH), l'influence des conditions d'incubation est encore visible (**Figure 62**). Les activités enzymatiques digestives acides, supérieures chez les seiches de SE et d'AC, sont encore sous l'action des réserves vitellines. Parallèlement, les ratios des enzymes digestives alcalines/acides sont supérieurs chez les juvéniles de BS et TB en relation avec le développement de la glande digestive. L'étude du système immunitaire des juvéniles a permis d'observer que la faible qualité des œufs de TB en 2011 se traduisait par une faible activité lysozymale chez les nouveau-nés de ce site au cours de leur première semaine de vie. Ces faibles activités immunitaires sont associées à une augmentation des mortalités chez les seiches (**Figure 62**).

Au cours de la croissance des juvéniles (14-35 DAH), les répercussions des conditions expérimentales sont plus visibles. Durant cette période, les performances de croissance, de digestion et d'immunité (*i.e.* taux de croissance, taux d'ingestion, taux de conversion des aliments, performances digestives et activité immunitaire) ont été similaires pour l'ensemble des individus, tous sites confondus. Les conditions biotiques et abiotiques étant les mêmes, les performances des juvéniles s'homogénéisent et l'on constate une croissance parallèle. Tous les juvéniles ont donc les mêmes capacités et performances de croissance, quand ils sont élevés dans les mêmes conditions, quelque soit le site d'origine. Toutefois, les différences spatiales observées durant la première semaine (au niveau de la distribution des poids et de l'activité lysozymale) affectent les juvéniles jusqu'à 35 jours post-éclosion (*i.e.* poids à 35 jours et taux de mortalité). La faible qualité des œufs de TB de 2011 ainsi que les faibles activités des lysozymes se traduisent par de fortes mortalités des juvéniles de ce site jusqu'à la fin de l'élevage.



Enfin, nous avons étudié des pré-recrues récoltées à l'automne dans différents sites de ponte avant leur migration vers la Manche Centrale. Les résultats des deux années de collecte indiquent que les pré-recrues d'AC ont des poids similaires voire supérieur à ceux des pré-recrues de BS. La distribution des poids entre ces deux sites est corrélée à la température de l'eau qui peut influencer le taux de croissance des juvéniles. Concernant le site de TB, le poids des pré-recrues est constant entre les années pour une même période (date de collecte début décembre pour les deux années). L'étude du système immunitaire a permis de mettre en évidence des activités lysozymales supérieures, comparé aux deux autres lots, chez les pré-recrues de BS. Ce constat peut s'expliquer par les pressions anthropiques plus marquées dans ce site, notamment à cause des bassins versants augmentant les apports de divers polluants en BS. Les pré-recrues de ce site peuvent être fragilisées par ces pressions.

Les différentes études menées ont permis d'améliorer les connaissances sur les performances physiologiques des juvéniles de seiches ainsi que de développer de nouveaux outils avec une possibilité d'application sur des échantillons du milieu naturel. Nos travaux donnent une description détaillée des évolutions enzymatiques digestives au cours du premier mois postéclosion chez la seiche et ces dosages sont mis en relation avec les observations histologiques de la glande digestive. De même, l'étude du système immunitaire a consisté tout d'abord, en une description de la distribution de trois activités immunitaires (*i.e.* Lysozyme-like, antiprotéase et phénoloxydase) dans les organes adultes de S. officinalis ensuite, en une adaptation du dosage de l'activité lysozymale aux premiers stades de vie (*i.e.* œufs et juvéniles). Au niveau des outils, l'utilisation des activités enzymatiques sous forme de ratios enzymatiques est plus pertinente. Les ratios ALP/ACP (enzymes phosphatasiques) et trypsine/cathepsine (enzymes protéolytiques) ont montré une meilleure description de la mise en place de la digestion alcaline avec la maturation du système digestif des juvéniles au premier mois post-éclosion. De plus, l'application de ces ratios au niveau de la glande digestive des pré-recrues collectées en milieu naturel indique une possible application de ces ratios dans la détermination de l'âge des individus (trypsine/cathepsine) et de leur origine (ALP/ACP). L'application du dosage de l'activité des lysozymes sur les organes du système circulatoire des pré-recrues apporte des indications sur des potentielles perturbations dans le milieu naturel. Les dosages des acides gras sur les œufs, les juvéniles à l'éclosion et sur les manteaux des pré-recrues du milieu naturel sont très prometteurs afin de discriminer les échantillons selon leur site d'origine. La signature des acides gras est affectée par la signature des proies du milieu, même sur une petite échelle spatiale, comme nous avons pu le montrer sur les proies des deux sites français.

239

#### II. Intégration des résultats dans le projet CRESH

Le projet CRESH avait plusieurs objectifs parmi lesquels l'amélioration de la connaissance des habitats favorables à la reproduction, l'étude de l'impact des facteurs environnementaux locaux sur la croissance et la survie des premiers stades ainsi que l'estimation de la contribution des différentes aires de ponte sur le recrutement global de la seiche en Manche.

L'observation des supports naturels utilisés pour la ponte sur trois sites anglais (TB, SE et Poole) et deux sites français (AC et BS) a permis de révéler une plus grande diversité des supports sur les côtes françaises (Bloor et al., 2012a). Nos résultats ont montré également plusieurs différences marquées entre les deux côtes (e.g. taux d'éclosion, période des éclosions, profil en acides gras des œufs). Par ailleurs, la densité des œufs sur ces supports est variable en fonction des zones étudiées et des années (Bloor et al., 2012a). Ces résultats montrent la nécessité de combiner l'estimation de densité des œufs dans un site donné avec celle du pourcentage d'éclosion puisque ces deux approches représentent le potentiel de contribution du site à un moment donné. Bloor et al. (2012b) ont utilisé le modèle MaxEnt pour prédire la distribution des grappes d'œufs en utilisant différentes variables (e.g. profondeur, distance à la côte, chlorophylle a, salinité de surface). Les variables de profondeur et de distance à la côte sont parmi les facteurs les plus déterminants de la distribution spatiale des œufs. Ainsi, une large portion des zones côtières françaises et anglaises est prédite comme adéquate pour les pontes. La proportion de ces sites est plus grande dans la zone Est de la Manche, comparé à la zone Ouest. De plus, plusieurs zones, françaises et anglaises, de la zone Ouest sont prédites comme non adéquates. La zone Est Manche prédite par le modèle englobe le site anglais de SE et le site français de BS. Ces deux sites ont le plus fort (*i.e.* SE) et le plus faible (*i.e.* BS) taux d'éclosion. De plus, les juvéniles à l'éclosion du site de SE disposent d'une plus grande réserve de vitellus interne, ce qui pourrait indiquer de meilleures chances de survie. Ces constatations montrent que le site de SE (et cette portion de la côte anglaise) serait important dans la contribution au stock de seiche en Manche et ainsi ferait parti des sites clés pour le renouvellement du stock. Concernant le site de BS, ayant le plus faible taux d'éclosion, des variations interannuelles de ce taux ont été observées. Les années favorables peuvent donc donner à ce site une part de contribution importante au stock. Grangeré (2012) et Gras et al. (2012) ont utilisé respectivement les isotopes stables et les éléments traces combinés à la forme des statolithes pour estimer la contribution des sites de TB, AC et BS au stock de seiches en Manche Centrale. Ces auteurs rencontrent une importante contribution des sites de TB et d'AC

240

et une faible contribution du site de BS au stock et ce, sur deux ans de suivi des seiches en Manche Centrale. Ces résultats sont en accord avec les faibles taux d'éclosion relevés en BS indiquant une faible contribution de ce site.

L'utilisation des isotopes stables a permis de discriminer les seiches issues de BS de celles de TB et d'AC (Grangeré, 2012). Mais l'utilisation de la signature en isotopes stables des tissus mous n'a pas permis de discriminer le lot de TB de celui d'AC. Les éléments traces combinés à la forme des statolithes permettent une meilleure discrimination de l'origine (Gras *et al.*, 2012). La combinaison de ces différentes méthodes a permis d'améliorer les estimations de contribution des différents sites. Gras *et al.* (2012) montrent que le site de TB est le premier contributeur sur les trois sites étudiés. Dans nos résultats, la signature des acides gras ainsi que le ratio ALP/ACP indiquent des signatures liées à des sites d'origine. Ces trois études, utilisant des approches différentes, vont dans le même sens. Il serait intéressant de pouvoir confirmer ces tendances en testant les différentes méthodes (isotopes stables, éléments traces, acides gras et le ratio ALP/ACP) sur plusieurs années.

Morritt et Shaw (2012) ont travaillé sur les analyses de différenciations génétiques au sein des différentes sous-populations pondeuses côtières de la seiche en Manche. Ces auteurs ont étudié la variabilité génétique sur des œufs et des juvéniles à l'éclosion des différents sites ainsi que sur des prélèvements de manteaux d'adultes dans ces sites. Après analyse de l'ensemble des échantillons, ces auteurs concluent qu'il n'y a qu'une seule population génétique de seiches en Manche. Nous avons montré que les différents lots de seiches élevées dans les mêmes conditions biotiques et abiotiques ont les mêmes performances de croissance. Nos résultats sont en accord puisqu'en l'absence de différents sites. Les seules variables observées dans les caractéristiques sont au niveau des œufs, des juvéniles à l'éclosion et des pré-recrues du milieu naturel qui ont tous subi l'influence des facteurs environnementaux locaux.

Nos travaux complètent les différentes études effectuées dans le cadre du projet CRESH et permettent de proposer de nouveaux outils à combiner avec ceux des autres tâches. Les résultats de ce projet forment un ensemble d'une grande cohérence permettant d'apporter une connaissance plus pointue des sites de ponte et du rôle que ces derniers peuvent jouer sur le stock de seiche en Manche.

241

# III. Perspectives

L'ensemble de ces travaux débouchent sur de nombreuses perspectives de recherche.

#### Au niveau des œufs

- Les taux d'éclosion enregistrés sur plusieurs années de suivi ont montré des taux supérieurs dans les sites anglais sur des prélèvements qui ont toujours eu lieu au mois de juillet. Il est nécessaire d'effectuer des suivis sur plusieurs mois (*e.g.* de mai à septembre) de ces taux pour voir si les éclosions optimales ne sont pas différées d'un site à l'autre ou entre les côtes françaises et anglaises. Pour les œufs anglais, les années de suivi ont mis en évidence un décalage dans le début des éclosions, ce qui implique un décalage de la période suivie pour ces sites (*e.g.* de juillet à septembre).
- Etudier les taux d'éclosion dans différentes zones d'un même site et au cours de la même année peut fournir une information locale sur la variabilité des taux d'éclosion dans un site donné. Ceci peut être appliqué dans une même zone (*e.g.* zone subtidale) ou sous forme de transecte entre zone intertidale et zone subtidale (*e.g.* dans le site d'AC).
- Il est important également de continuer les travaux d'estimation de la densité des œufs, combinée au taux d'éclosion. Ces études, appliquées au site d'AC, dans lequel on trouve des œufs en zone intertidale et subtidale, permettraient d'évaluer la contribution de chaque zone.

#### Au niveau des suivis expérimentaux

- Les juvéniles de SE ont une plus grande réserve vitelline, ce qui peut indiquer de meilleures chances de survie. Pour confirmer cette hypothèse, il faut effectuer une expérience comparative du taux de survie des juvéniles issus des différents sites mis à jeûn dès leur éclosion. Parallèlement, des prélèvements de ces juvéniles sont effectués au fur et à mesure afin d'étudier l'évolution de leur contenu protéique (% poids sec) ainsi que l'évolution de leurs performances digestives et immunitaires.
- L'étude des contenus stomacaux des pré-recrues d'AC et de BS a révélé un régime alimentaire qui différait dans les proportions des proies ingérées entre les deux sites (*i.e.*

les pré-recrues de BS ont une alimentation plus variée, comparée à celles d'AC qui ont une alimentation formée à 80% de décapodes et essentiellement de crabes). Pour mettre en évidence l'impact de ces proportions sur le taux de croissance, il faut envisager un dispositif expérimental où les juvéniles des deux sites sont mis dans les mêmes conditions abiotiques avec un régime alimentaire plus diversifié pour BS [*e.g.* 50% de poissons et 50% de décapodes (25% de crabes et 25% de crevettes)] et moins diversifié pour AC [*e.g.* 25% poissons et 75% de décapodes (50% de crabes et 25% de crevettes)].

- Nous avons relevé une possible corrélation entre le ratio trypsine/cathepsine et l'âge des individus. Pour confirmer cette hypothèse, il est nécessaire de faire un suivi expérimental de la croissance des juvéniles, de l'éclosion jusqu'à plusieurs mois d'âge (*e.g.* 4 ou 6 mois). Parallèlement, des échantillonnages sont faits tous les 15 jours pour doser les activités enzymatiques digestives. L'évolution du ratio trypsine/cathepsine sera corrélée ensuite avec l'âge précis des animaux.
- Pour vérifier l'évolution de la signature en acides gras (dans le manteau des seiches) et du ratio ALP/ACP (dans la glande digestive), un élevage de juvéniles doit être réalisé avec une source alimentaire différente en fonction de l'âge.

#### Au niveau des analyses biochimiques

- L'étude menée sur la distribution des activités enzymatiques immunitaires dans les organes adultes de seiches a montré que les activités lysozymales et prophénoloxydases peuvent être adaptées pour des dosages effectués sur des juvéniles entiers. L'activité des lysozymes s'est avérée être un bon bio-indicateur de l'immunité chez les jeunes seiches et son profil a montré une grande importance de cette activité au premier jour d'éclosion. Il serait donc intéressant d'étudier le profil de la prophénoloxydase et de sa forme activée, la phénoloxydase au cours du premier mois post-éclosion chez les juvéniles de seiche.
- L'activité des lysozymes est importante dans les œufs et souvent supérieure à l'activité trouvée chez les juvéniles à l'éclosion. Il serait utile d'étudier l'évolution de cette activité au cours du développement embryonnaire, de la ponte jusqu'à l'éclosion.

#### Au niveau des pré-recrues

Il est primordial de pouvoir effectuer un échantillonnage plus intensif des différents sites.
Ces prélèvements devraient être fait sur plusieurs mois, de la fin de l'été (août – septembre) jusqu'à la fin de l'automne (novembre – décembre) pour calculer des taux de croissance sur ces périodes là. Ce travail devrait être fait sur plusieurs années pour décrire la variabilité interannuelle du taux de croissance.

#### Au niveau de la contribution des sites de ponte

- Des prélèvements de la glande digestive et du manteau des pré-recrues doivent être réalisés pour confirmer la signature du ratio ALP/ACP (sur la glande digestive) et la signature des acides gras (sur le manteau) en relation avec le site d'origine. Ces résultats doivent être corrélés aux analyses des isotopes stables et des éléments traces.
- Nous avons souligné, au cours des travaux de cette thèse, l'importance potentielle que peut représenter le site de SE avec un fort taux d'éclosion des œufs et un contenu vitellin riche des juvéniles à l'éclosion. Mais les juvéniles de ce site n'ont pas été pris en compte dans les comparaisons entre pré-recrues. Il est donc crucial de pouvoir prélever des prérecrues de ce site et élargir les zones de prélèvement en Manche Centrale pour avoir une meilleure estimation de la contribution des différents sites côtiers en intégrant la zone du site de SE.

# BIBLIOGRAPHIE

# **BIBLIOGRAPHIE**

# A

- Aguila J, Cuzon G, Pascual C, Domingues PM, Gaxiola G, Sánchez A, Maldonado T, Rosas C, 2007. The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss and Solis) diet: Digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance. Aquaculture 273, 641-655.
- Almansa E, Sánchez JJ, Cozzi S, Rodríguez C, Díaz M, 2003. Temperature-activity relationship for the intestinal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase of *Sparus aurata*. A role for the phospholipid microenvironment?. Journal of Comparative Physiology part B 173, 231-237.
- Almansa E, Domingues P, Sykes A, Tejera N, Lorenzo A, Andrade JP, 2006. The effects of feeding with shrimp or fish fry on growth and mantle lipid composition of juvenile and adult cuttlefish (*Sepia officinalis*). Aquaculture 256, 403-413.
- Armstrong PB, 2006. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. Immunobiology 211, 263-281.
- Asokan R, Arumugam M, Mullainadhan P, 1997. Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus. Developmental and Comparative Immunology 21, 1-12.

# B

- Bachali S, Jager M, Hassanin A, Schoentgen F, Jollès P, Fiala-Medioni A, Deutsch, JS, 2002. Phylogenetic analysis of invertebrate lysozyme and the evolution of lysozyme function. Journal of Molecular Evolution 54, 652-664.
- Baeza-Rojano, E, Garcia S, Garrido D, Guerra-Garcia JM, Domingues P, 2010. Use of Amphipods as alternative prey to culture cuttlefish (*Sepia officinalis*) hatchlings. Aquaculture 300, 243-246.
- Bailey K, Worboys BD, 1960. The lamellibranch crystalline style. Biochemical Journal 76, 487–491.
- Balti R, Hmidet N, Jellouli K, Nedjar-Arroume N, Guillochon D, Nasri M, 2010. Cathepsin D from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): purification and characterization. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58,10623–10630.
- Balti R, Bougherra F, Bougatef A, Hayet BK, Nedjar-Arroume N, Dhulster P, Guillochon D, Nasri M, 2012. Chymotrypsin from the hepatopancreas of cuttlefish (*Sepia officinalis*) with high activity in the hydrolysis of long chain peptide substrates: purification and biochemical characterisation. Food Chemistry 130, 475-484.

- Barri A, 2008. Effects of incubation temperature and transportation stress on yolk utilization, small intestine development, and post-hatch performance of high-yield Broiler Chicks. Thesis, Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, 201 pp.
- Basuyaux O, Mauduit F, Prouvost G, Henry N, Delabarre J, 2010. *Sepia officinalis*. Influence de la température et de l'hydrodynamisme sur le développement des œufs. SMEL report, 16 pp.
- Beuerlein K, Schipp R, 1998. Cytomorphological aspects on the response of the branchial heart complex of *Sepia officinalis* L. (Cephalopoda) to xenobiotics and bacterial infection. Tissue and Cell 30, 662-671.
- Beuerlein K, Löhr S, Westermann B, Ruth P, Schipp R, 2002. Components of the cellular defense and detoxification system of the common cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca, Cephalopoda). Tissue and Cell 34, 390-396.
- Blanc A, 1998. Recherches bio-écologique et écophysiologique de la phase juvénile de la seiche *Sepia officinalis* Linné (Mollusque, Céphalopode, Sepiidae) dans le Golfe du Morbihan (Sud Bretagne). Thèse, Université de Rennes 1, 308 pp.
- Blaschko H, Hawkins J, 1952. Observations on amine oxidase in cephalopods. Journal of Physiology 118, 88– 93.
- Bligh EG, Dyer WJ, 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology 37, 911-917.
- Bloor I, Robin JP, Jackson E, 2012a. *In situ* observations of natural substrate where cuttlefish *Sepia officinalis* spawning females attach their eggs. Final Report, CRESH project, 13 pp.
- Bloor I, Jackson E, 2012b. Spatial analysis of potential spawning areas of cuttlefish *Sepia officinalis* L.. Final Report, CRESH project, 17 pp.
- Boletzky SV, 1975. A contribution to the study of yolk absorption in the Cephalopoda. Zeitschrift für Morphologie der *Tiere* 80, 229-246.
- Boletzky SV, 1983. Sepia officinalis. In Boyle PR (Ed) Cephalopod Life Cycle. Academic Press 1, 31-52.
- Boletzky SV, 1989. Elevage de céphalopodes en aquarium : acquis récents. Bulletin de la Société Zoologique de France 114, 57-66.
- Boletzky SV, 1997. Developmental constraints and heterochrony: a new look at offspring size in cephalopod mollusks. Geobios 21, 267-275.
- Boletzky SV, 1999. Biologie et biogéographie des céphalopodes actuels. Bulletin de la Société Géologique de France 170, 205-215.
- Boletzky SV, 2003. Biology of early life stages in Cephalopod Molluscs. Advances in Marine Biology 44, 143-203.
- Boletzky S, Erlwein B, Hofmann D, 2006. The *Sepia* egg: a showcase of cephalopod embryology. Vie et Milieu 56, 191-201.

- Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC, Lee LE, 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. Developmental and Comparative Immunology 25, 853-73.
- Bonete MJ, Manjon A, Llorca F, Lborra JL, 1984. Acid proteinase activity in Fish Comparative study of extraction of cathepsins B and D from *Mujil auratus*. Comparative Biochemistry and Physiology 78, 203-206.
- Boshra H, Li J, Sunyer JO, 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. Fish and Shellfish Immunology 20, 239-62.
- Boucaud-Camou E, 1973. Etude de l'appareil digestif de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). Essai d'analyse expérimentale des phénomènes digestifs. Thèse de doctorat, Université de Caen, 208 pp.
- Boucaud-Camou E, 1974. Localisation d'activités enzymatiques impliquées dans la digestion chez *Sepia* officinalis L. Archives de Zoologie Expérimentale et Générale 115, 5-27.
- Boucaud-Camou E, Yim M, 1980. Fine structure and function of the digestive cell of *Sepia officinalis* (Mollusca: Cephalopoda). Journal of Zoology (London) 191, 89-105.
- Boucaud-Camou E, 1982. Localisation of some hydrolytic enzymes in digestive organs of juvenile *Sepia officinalis* L. (Mollusca, Cephalopoda). Malacologia 22, 685-690.
- Boucaud-Camou E, Boucher-Rodoni R, 1983. Feeding and digestion in cephalopods. The Mollusca Physiology 5, 149-187.
- Boucaud-Camou E, Yim M, Tresgot A, 1985. Feeding and digestion of young *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda) during post-hatching development. Vie et Milieu 35, 263-266.
- Boucaud-Camou E, Boismery J, 1991. The migrations of the cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) in the English Channel. In "The Cuttelfish". Centre de publication de l'Université de Caen, France, pp. 179-189.
- Boucaud-Camou E, Koueta N, Boismery J, Medhioub A, 1991. The sexual cycle of *Sepia officinalis* L. from the Bay of Seine. In "The Cuttlefish". Centre de publication de l'Université de Caen, France, pp. 141-151.
- Boucaud-Camou E, Roper CFE, 1995. Digestive enzymes in paralarval cephalopods. Bulletin of Marine Science 57, 313-327.
- Bouchaud O, Daguzan J, 1989. Etude du développement de l'œuf de *Sepia officinalis* L. (Céphalopode, Sepiidae) en conditions expérimentales. Haliotis 19, 189-200.
- Bouchaud O, Galois R, 1990. Utilization of egg-yolk lipids during the embryonic development of *Sepia* officinalis L. in relation to temperature of the water. Comparative Biochemistry and Physiology 97, 611-615.
- Bouchaud O, 1991. Recherches écophysiologiques sur la reproduction de la seiche, *Sepia officinalis* Linné (Mollusque, Céphalopode, Sepiidae), dans le secteur MorBraz-Golfe du Morbihan (Sud Bretagne). Thèse de doctorat, Université de Rennes, 242 pp.
- Boucher-Rodoni R, 1981. Etude de la glande digestive de deux céphalopodes, au cours du cycle de vie. Thèse de doctorat, Université de Paris-Sud, 176 pp.

- Boucher-Rodoni R, Boucaud-Camou E, Mangold K, 1987. Feeding and digestion. In Boyle PR (ed), Cephalopod Life Cycles Vol 2, Academic Press, London, pp. 85-108.
- Boyle P, Rodhouse P, 2005. Cephalopods: Ecology and Fisheries. Blackwell Science, Oxford. 452 pp.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248-254.
- Budelmann B, Schipp R, Boletzky SV, 1997. Cephalopoda. In Harrison FW, Kohn AJ (Eds.), Microscopic anatomy of invertebrates, Vol. 6A. Wiley-Liss, Inc, New York, pp. 119-414.
- Bustamante P, Cosson RP, Gallien I, Caurant F, Miramand P, 2002. Cadmium detoxification processes in the digestive gland of cephalopods in relation to accumulated cadmium concentrations. Marine Environmental Research 53, 227–41.

# C

- Caddy JF, 1991. Daily rings on squid statoliths: an opportunity to test standard population models? In Jereb P, Ragonese S, Boletzky SV (Eds) Squid Age Determination Using Statoliths, NTR-ITPP Special Publication, Mazarra de Vallo, 53-66.
- Cahu CL, Zambonino-Infante JL, 1995. Maturation of the pancreatic and intestinal digestive functions in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of weaning with different protein sources. Fish Physiology and Biochemistry 14, 431-437.
- Callewaert L, Michielis CW, 2010. Lysozymes in the animal kingdom. Journal of Biosciences 35, 127-160.
- Carballal MJ, Lopez C, Azevedo C, Villalba A, 1997. Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. Journal of Invertebrate Pathology 70, 96-105.
- Cardenas-Lopez JL, Haard NF, 2009. Identification of a cysteine proteinase from Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas as cathepsin L. Food Chemistry 112, 442-447.
- Cartron ML, 2012. Perception de la polarisation de la lumière chez la seiche *Sepia officinalis* : développement, fonction et approche comparative. Thèse de doctorat, Université de Caen, pp. 177.
- Caruso G, Genovese L, Greco S, 1996. Preliminatory investigation on the digestive enzymes of reared *Pagellus acarne* (Risso, 1826) juveniles in relation to two different diets. Oebalia XXII, 3-13.
- Cerenius L, Söderhäll K, 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. Immunological Reviews 198, 116-126.
- Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K, 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. Trends in Immunology 29, 263-271.
- Cerenius L, Babu R, Söderhäll K, Jiravanichpaisal P, 2010. *In vitro* effects on bacterial growth of phenoloxidase reaction products. Journal of Invertebrate Pathology 103, 21-23.

- Challier L, Royer J, Robin JP, 2002. Variability in age-at-recruitment and early growth in English Channel *Sepia officinalis* described with statolith analysis. Aquatic Living Resources 15, 303-311.
- Challier L, 2005. Variabilité de la croissance des céphalopodes juvéniles (*Sepia officinalis, Loligo forbesi*) et relation avec les fluctuations du recrutement, en Manche. Thèse de doctorat, Université de Caen, 311 pp.
- Challier L, Dunn M, Robin JP, 2005a. Trends in age-at-recruitment and juvenile growth of cuttlefish, from the English Channel. ICES Journal of Marine Science 62, 1671-1682.
- Challier L, Royer J, Pierce GJ, Bailey N, Roel B, Robin JP, 2005b. Environmental and stock effects on recruitment variability in the English Channel squid *Loligo forbesi*. Aquatic Living Resources 360, 353-360.
- Challier L, Orr P, Robin JP, 2006a. Introducing inter-individual growth variability in the assessment of a cephalopod population: application to the English Channel squid *Loligo forbesi*. Oecologia 150, 17-28.
- Challier L, Pierce G, Robin JP, 2006b. Spatial and temporal variation in age and growth in juvenile *Loligo forbesi* and relationships with recruitment in the English Channel and Scottish waters. Journal of Sea Research 55, 217–229.
- Cheng W, Hsiao IS, Chen JC, 2004a. Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. Fish and Shellfish Immunology 17, 193-202.
- Cheng W, Hsiao IS, Chen JC, 2004b. Effect of nitrite on immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. Disease of Aquatic Organisms 60, 157-164.
- Cheng W, Hsiao IS, Hsu CH, Chen JC, 2004c. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. Fish and Shellfish Immunology 17, 235-243.
- Chichery R, Chanelet J, 1976. Motor and behavioural responses obtained by stimulation with chronic electrodes of the optic lobe of *Sepia officinalis*. Brain Research 105, 525-532.
- Chu FLE, Volety AK, La Peyre JF, 1995. Annual variation of hemolymph components and *P. marinus* infection in oysters sampled from Deep Water Shoal, James River, Virginia. Journal of Shellfish Research, 14–263.
- Claes MF, 1996. Functional morphology of the white bodies of the cephalopod mollusc *Sepia officinalis*. Acta Zoologica 77, 173-190.
- Clarke A, Rodhouse PG, Holmes LJ, Pascoe PL, 1989. Growth rate and nucleic acid ration in cultured cuttlefish *Sepia officinalis* (Mollusca Cephalopoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 133, 229-240.
- Coles JA, Pipe RK, 1994. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. Fish and Shellfish Immunology 4, 337-352.

- Cope S, 2005. Predicting overwashing and breaching of coarse-clastic barrier beaches and spits Application to Medmerry, West Sussex. In Coastal Dynamics, American Society of Civil Engineers, ASCE Library, pp. 1-14.
- Correia M, Domingues PM, Sykes A, Andrade JP, 2005. Effects of culture density on growth and broodstock management of the cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758). Aquaculture 245, 163-173.
- Correia M, Palma J, Andrade JP, 2008. Effects of live prey availability on growth and survival in the early stages of cuttlefish *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758) life cycle. Aquaculture Research 39, 33-40.

#### D

- Dauvin J, 2012. Are the eastern and western basins of the English Channel two separate ecosystems? Marine Pollution Bulletin 64, 463-471.
- Dauvin J, Ruellet T, Desroy N, Janson A, 2007. The ecological quality status of the Bay of Seine and the Seine estuary: Use of biotic indices. Marine Pollution Bulletin 55, 241-257.
- De Fraipont M, Clobert J, John-Alder H, Meylan S, 2000. Increased pre-natal maternal corticosterone promotes philopatry of offspring in common lizards *Lacerta vivipara*. Journal of Animal Ecology 69, 404-413.
- Demers NE, Bayne CJ, 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. Developmental and Comparative Immunology 21, 363-73.
- De Moreno JEA, Moreno VJ, Ricci L, Roldán M, Gerpe M, 1998. Variations in the biochemical composition of the squid *Illex argentinus* from the South Atlantic Ocean. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 119, 631-637.
- Denis V, Lejeune J, Robin JP, 2002. Spatio-temporal analysis of commercial trawler data using General Additive models: patterns of Loliginid squid abundance in the north-east Atlantic. ICES Journal of Marine Science 59, 633-648.
- Denis V, Robin JP, 2001. Present status of the French Atlantic fishery for cuttlefish (*Sepia officinalis*). Fisheries Research 52, 11-22.
- Derby CD, 2007. Escape by inking and secreting: marine molluscs avoid predators through a rich array of chemicals and mechanisms. Biological Bulletin 213, 274-289.
- Dickel L, Chichery MP, Chichery R, 1997. Postembryonic maturation of the vertical lobe complex and early development of predatory behavior in the cuttlefish (*Sepia officinalis*). Neurobiology of Learning and Memory 67, 150-160.
- Dickel L, Chichery MP, Chichery R, 2001. Increase of learning abilities and maturation of the vertical lobe complex during postembryonic development in the cuttlefish, *Sepia officinalis*. Developmental Psychobiology 39, 92-98.

- Dobson DE, Prager EM, Wilson AC, 1984. Stomach lysozyme of ruminants. The Journal of Biological Chemistry 259, 11607-11616.
- Domingues P, Kingston T, Sykes A, 2001. Growth of young cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus 1758) at the upper end of the biological distribution temperature range. Aquaculture 32, 923-930.
- Domingues P, Sykes A, Andrade J, 2002. The effects of temperature in the life cycle of two consecutive generations of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758), cultured in the Algarve (South Portugal). Aquaculture International 10, 207-220.
- Domingues P, Bettencourt V, Guerra A, 2006. Growth of *Sepia officinalis* in captivity and in nature. Vie et Milieu 56, 109-120.
- Dunn M, 1999. Aspects of the stock dynamics and exploitation of cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758), in the English Channel. Fisheries Research 40, 277-293.

# E

Eising CM, Eikenaar C, Schwabl H, Groothuis TG, 2001. Maternal androgens in black-headed gull (*Larus ridibundus*) eggs: consequences for chick development. Proceedings Royal Society London B 268, 839-846.

#### F

- Fabris C, Smirne C, Toniutto P, Colletta C, Rapetti R, Minisini R, Falleti E, Pirisi M, 2006. Assessment of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C and normal alanine aminotransferase values: the role of AST to the platelet ratio index. Clinical Biochemistry 39, 339-343.
- Fagotto F, 1990. Yolk degradation in tick eggs. Evidence that cathepsin L-Like proteinase is stored as a latent, acid-activable proenzyme. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 14, 237-252.
- Fagotto F, 1991. Yolk degradation in tick eggs. Developmentally regulated acidification of the yolk spheres. Development Growth and Differentiation 33, 57-66.
- Faisal M, Mac Intyre EA, Adham KG, Tall BD, Kothary MH, La Peyre JF, 1998. Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. Comparative Biochemistry and Physiology – Part B 121, 161-168.
- FAO, 2012. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. Food and Agriculture Organisation 2012, Rome, 241 pp.
- Ferron A, Legget WC, 1994. An appraisal of condition measures for marine fish larvae. Advances in Marine Biology 30, 217-303.

- Fiolka MJ, Zagaja MP, Hulas-Stasiak M, Wielbo J, 2012. Activity and immunodetection of lysozyme in earthworm *Dendrobaena veneta* (Annelida). Journal of Invertebrate Pathology 109, 83-90.
- Fiore G, Poli A, Di Cosmo A, d'Ischia M, Palumbo A, 2004. Dopamine in the ink defence system of *Sepia officinalis*: biosynthesis, vesicular compartimentation in mature ink gland cells, nitric oxide (NO)/cGMP-induced depletion and fate in secreted ink. Biochemical Journal 378, 785-791.
- Forster G, 1955. Underwater observations on rocks off Stoke Point and Dartmouth. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 34 (2), 197-199.
- Forsythe J, Lee P, Walsh L, Clarck TC, 2002. The effects of crowding on growth of the European cuttlefish, *Sepia officinalis* Linnaeus, 1758 reared at two temperatures. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 269, 173-185.
- Fukuda Y, Miura S, Tsuchiya Y, Inoue-Sumi Y, Kubota K, Takamiya Y, Kuwano T, Ohishi H, Ike A, Mori K, Yanagi D, Nishikawa H, Shirai K, Saku K, Urata H, 2011. Lower frequency of non-target lesion intervention in post-successful percutaneous coronary intervention patients with an LDL to HDL cholesterol ratio below 1.5. International Journal of Cardiology 149, 120-122.

#### G

Gabe M, 1968. Techniques histologiques. Paris: Masson et Cie 1113 4 pp.

- Gildberg A, 1988. Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 91, 425-435.
- Gollas-Galvan T, Hernandez-Lopez J, Vargas-Albores F, 1999. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 122, 77-82.
- Govoni JJ, Boehlert GW, Watanabe Y, 1986. The physiology of digestion in fish larvae. Environmental Biology of Fishes 16, 59-77.
- Grangeré K, Lefebvre S, Lepoittevin J, Robin JP, 2012. Trophic relationships in cuttlefish egg-juvenile stages. Final Report, CRESH project, 7 pp.
- Gras M, Caplat C, Robin JP, 2012. Tracking cuttlefish juvenile origin with trace elements and stable isotope analysis. Final Report, CRESH project, 8 pp.
- Gray J, 2003. Carbohydrates: nutritional and health aspects. ILSI Europe Concise Monograph Series:1-38.
- Grigoriou P, Richardson CA, 2004. Aspects of the growth of cultured cuttlefish *Sepia officinalis* (Linnaeus 1758). Aquaculture Research 35, 1141-1148.
- Grigoriou P, Richardson CA, 2008. The effect of ration size, temperature and body weight on specific dynamic action of the common cuttlefish *Sepia officinalis*. Marine Biology 154, 1085-1095.
- Guerra A, Castro BG, 1988. On the life cycle of *Sepia officinalis* in the Ria de Vigo. Cahiers de Biologie Marine 29, 395-405.

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

- Guerra A, Allcock L, Pereira J, 2010. Cephalopod life history, ecology and fisheries: An introduction. Fisheries Research 106, 117-124.
- Gutowska MA, Melzner F, 2009. Abiotic conditions in cephalopod (*Sepia officinalis*) eggs: embryonic development at low pH and high pCO2. Marine Biology 156, 515-519.

# Η

- Halil S, 2004. A preliminary study on the effects of salinity on egg development of European squid (*Loligo vulgaris* Lamarck, 1798). Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh 56, 93-99.
- Halil S, Ugur S, 2007. Effects of Cadmium (CdCl(2)) on development and hatching of eggs in European squid (*Loligo vulgaris* Lamarck, 1798) (Cephalopoda: Loliginidae) Environmental Monitoring and Assessment 133, 371-378.
- Hansen GH, Olafsen JA, 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. Microbial Ecology 38, 1-26.
- Hellio C, Bado-Nilles A, Gagnaire B, Renault T, 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 and Shellfish Immunology 22, 433-440.
- Herbert R, Southward A, Sheader M, Hawkins S, 2007. Influence of recruitment and temperature on distribution of intertidal barnacles in the English Channel. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 87 (2), 487-499.
- Hernandez-Miranda E, Ojeda FP, 2006. Inter-annual variability in somatic growth rates and mortality of coastal fishes off central Chile: an ENSO driven process? Marine Biology 149, 925-936.
- Hikima S, Hikima JI, Hirono I, Takashi A, 2003. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. Gene 316, 187-195.
- Hirst JA, Attrill MJ, 2008. Small is beautiful: An inverted view of habitat fragmentation in seagrass beds. Estuarine Coastal and Shelf Science 78, 811-818.
- Hochberg FG, 1989. Les parasites. In Mangold K, Grassé PP (Eds) Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie. Céphalopodes. Paris Masson, pp. 589-608.
- Hutchinson T, Manning M, 1996. Seasonal trends in serum lysozyme activity and total protein concentration in dab (*Limanda limanda* L.) sampled from Lyme Bay, UK. Fish and Shellfish Immunology 6, 473-482.

# Ι

- Ifremer, 2012. Bulletin de Surveillance de la qualité du Milieu Marin Littoral 2011. Ifremer/RST/LERN/12-03/Laboratoire Environnement Ressources de Normandie, 128 pp.
- Itoh N, Takahashi KG, 2007. cDNA cloning and *in situ* hybridization of a novel lysozyme in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Comparative Biochemistry and Physiology – Part B 148, 160-166.

# J

- Jackson GD, Moltschaniwskyj N, 2002. Spatial and temporal variation in growth rates and maturity in the Indo-Pacific squid *Sepioteuthis lessoniana* (Cephalopoda: Loliginidae). Marine Biology 140, 747-754.
- Jackson GD, Bustamante P, Cherel Y, Fulton E, Grist EPM, Jackson CH, Nichols PD, Pethybridge H, Phillips K, Ward RD, Xavier JC, 2007. Applying new tools to cephalopod trophic dynamics and ecology: perspectives from the Southern Ocean Cephalopod Workshop, February 2–3, 2006. Reviews in Fish Biology and Fisheries 17, 79-99.
- Jellouli K, Bougatef A, Daassi D, Balti R, Barkia A, Nasri M, 2009. New alkaline trypsin from the intestine of Grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with high activity at low temperature: purification and characterisation. Food Chemistry 116, 644-650.
- Jereb P, Roper CFE, 2005. Cephalopods of the world: an annotated and illustrated catalogue of Cephalopod species known to date, Volume 1: Chambered Nautiluses and Sepioids. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes, No. 4, Vol. 1, Rome, FAO 2005, 262 pp.
- Jordan PJ, Deaton LE, 2005. Characterization of phenoloxidase from *Crassostrea virginica* hemocytes and the effect of *Perkinsus marinus* on phenoloxidase activity in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Geukensia demissa*. Journal of Shellfish Research 24, 477-482.
- Joyce AE, 2006. The coastal temperature network and ferry route programme: long term temperature and salinity observations. Science Series Data Report, Cefas, Lowestoft 43, 129 pp.

# K

- Kishimura H, Saeki H, Hayashi K, 2001. Isolation and characteristics of trypsin inhibitor from the hepatopancreas of a squid (*Todarodes pacificus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B 130, 117-123.
- Kjesbu OS, Witthames PR, Solemdal P, Walker MG, 1998. Temporal variations in the fecundity of Arcto-Norwegian cod (*Gadus morhua*) in response to natural changes in food and temperature. Journal of Sea Research 40, 303-321.
- Kolodziejska I, Sikorski ZE, 1996. The digestive proteases of marine dish and invertebrates. Bulletin of the Sea Fisheries Institute Gdynia 137, 51-56.

- Koueta N, Boucau-Camou E, 1999. Food intake and growth in reared early juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 240, 93-109.
- Koueta N, Castro BG, Boucaud-Camou E, 2000. Biochemical indices for instantaneous growth estimation in young cephalopod *Sepia officinalis* L. ICES Journal of Marine Science 57, 1-7.
- Koueta N, Boucau-Camou E, 2001. Basic growth relations in experimental rearing of early juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca: Cephalopoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 265, 75-87.
- Koueta N, Boucau-Camou E, 2003. Combined effects of photoperiod and feeding frequency on survival and growth of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. in experimental rearing. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 296, 215-226.
- Koueta N, Alorend E, Noel B, Boucaud-Camou E, 2006. Earlier acceptance of frozen prey by juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* in experimental rearing: effect of previous enriched natural diet. Vie et Milieu 56 (2), 147-152.

# L

- Lacoue-Labarthe T, Warnau M, Oberhänsli F, Teyssié JL, Koueta N, Bustamante P, 2008a. Differential bioaccumulation behaviour of Ag and Cd during the early development of the cuttlefish *Sepia officinalis*. Aquatic Toxicology 86, 437-446.
- Lacoue-Labarthe T, Warnau M, Oberhänsli F, Teyssié JL, Jeffree R, Bustamante P, 2008b. First experiments on the maternal transfer of metals in the cuttlefish *Sepia officinalis*. Marine Pollution Bulletin 57, 826-831.
- Lacoue-Labarthe T, Bustamente P, Hörlin E, Luna-Acosta A, Bado-Nilles A, Thomas-Guyon H, 2009a. Phenoloxidase activation in the embryo of the common cuttlefish *Sepia officinalis* and responses to the Ag and Cu exposure. Fish and Shellfish Immunology 27, 516-521.
- Lacoue-Labarthe T, Warnau M, Metian M, Oberhänsli F, Rouleau C, Bustamante P, 2009b. Biokinetics of Hg and Pb accumulation in the encapsulated egg of the common cuttlefish *Sepia officinalis*: Radiotracer experiments. Science of the Total Environment 407, 6188-6195.
- Lacoue-Labarthe T, Warnau M, Oberhänsli F, Teyssié J, Bustamante P, 2010a. Contrasting accumulation biokinetics and distribution of 241Am, Co, Cs, Mn and Zn during the whole development time of the eggs of the common cuttlefish, *Sepia officinalis*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 382, 131-138.
- Lacoue-labarthe T, Le Bihan E, Borg D, Koueta N, Bustamante P, 2010b. Acid phosphatase and cathepsin activity in cuttlefish (*Sepia officinalis*) eggs: the effects of Ag, Cd, and Cu exposure. Journal of Marine Science 67, 1517-1523.

- Larsonneur C, Bouysse P, Auffret J, 1982. The superficial sediments of the English Channel and its western approaches. Sedimentology 29 (6), 851-864.
- Latire T, Le Pabic C, Mottin E, Mottier A, Costil K, Koueta N, Lebel JM, Serpentini A, 2012. Responses of primary cultured haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata* under 10-day exposure to cadmium chloride. Aquatic Toxicology 109, 213-221.
- Laurec A, Le Guen JC, 1981. Dynamique des populations marines exploitées. Concepts et modèles. Rapport Scientifiques et Techniques. CNEXO. 45, 118 pp.
- Lazo JP, Mendoza R, Holt GJ, Aguilera C, Arnold CR, 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture 265, 194-205.
- Le Bihan E, Perrin A, Koueta N, 2004. Development of a bioassay from isolated digestive gland cells of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda): effect of Cu, Zn and Ag on enzyme activities and cell viability. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 309, 47-66.
- Le Bihan E, 2006. Valorisation des co-produits issus de la pêche des céphalopodes: application à la seiche *Sepia officinalis*. Thèse de doctor at. Université de Caen. 285pp.
- Leblond E, Daures F, Berthou P, Merrien C, Pitel M, Jezequel M, 2009. Synthèse des flottilles de pêche 2007 Flotte de Mer du Nord - Manche - Atlantique. Brest, 226 pp.
- Lee PG, 1994. Nutrition of cephalopods: fuelling the system. Marine and Freshwater Behavior and Physiology 25, 35-51.
- Lefebvre S, Harma C, Blin J, 2009. Trophic typology of coastal ecosystems based on  $\delta$ 13C and  $\delta$ 15N ratios in an opportunistic suspension feeder. Marine Ecology Progress Series 390, 27-37.
- Le Goff R, Daguzan J, 1991. Etude des déplacements de la seiche commune (*Sepia officinalis*) dans le Golfe du Morbihan au cours de la période de reproduction: premiers résultats. In Boucaud-Camou E(Ed) Acta of the first International Symposium on the cuttlefish *Sepia*. Centre de publication de l'Université de Caen, France, pp. 167-177.
- Lemaire J, 1970. Table de développement embryonnaire de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). Bulletin de la Société Zoologique de France 95, 773-782.
- Lemaire J, Richard A, 1970. Evolution embryonnaire de l'appareil génital : différenciation du sexe chez *Sepia officinalis* L. Bulletin de la Société Zoologique de France 95, 475-478.
- Lemieux H, Blier P, Dutil JD, 1999. Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the atlantic cod (*Gadus morhua*). Fish Physiology and Biochemistry 20, 293-303.
- Léonard M, Robin JP, 2012. Comparaison du régime alimentaire de seiches juvéniles (*Sepia officinalis*) récoltées dans plusieurs sites côtiers de Manche. Rapport master 1, Université de Caen, 48 pp.
- Leporati S, Pecl G, Semmens J, 2007. Cephalopod hatchling growth: the effects of initial size and seasonal temperatures. Marine Biology 151, 1375-1383.

- Li H, Parisi MG, Toubiana M, Cammarata M, Roch P, 2008. Lysozyme gene expression and hemocyte behavior in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses. Fish and Shellfish Immunology 25, 143-152.
- López C, Carballal MJ, Azevedo C, Villalba A, 1997. Enzyme characterisation of the circulating haemocytes of the carpet shell clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca:bivalvia). Fish and Shellfish Immunology 7, 595–608.
- Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. Journal of Biology and Biochemistry 193, 265-275.
- Luna-Acosta A, Rosenfeld E, Amari M, Fruitier-Arnaudin I, Bustamante P, Thomas-Guyon H, 2010a. First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Fish and Shellfish Immunology 28, 719-726.
- Luna-Acosta A, Bustamante P, Godefroy J, Fruitier-Arnaudin I, Thomas-Guyon H, 2010b. Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on the health status of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* exposed *in situ*. Environmental Science and Pollution Research International 17, 999-1008.
- Luna-Acosta A, Thomas-Guyon H, Amari M, Rosenfeld E, Bustamante P, Fruitier-Arnaudin I, 2011a. Differential tissue distribution and specificity of phenoloxidases from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Comparative Biochemistry and Physiology – Part B 159, 220-226.
- Luna-Acosta A, Kanan R, Le Floch S, Huet V, Pineau P, Bustamante P, Thomas-Guyon H, 2011b. Enhanced immunological and detoxification responses in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, exposed to chemically dispersed oil. Water Research 45, 4103-4118.
- Luna-Acosta A, Saulnier D, Pommier M, Haffner P, De Decker S, Renault T, Thomas-Guyon H, 2011c. First evidence of a potential antibacterial activity involving a laccase-type enzyme of the phenoloxidase system in Pacific oyster *Crassostrea gigas* haemocytes. Fish and Shellfish Immunology 31, 795-800.
- Luna-González A, Maeda-Martínez AN, Vargas-Albores F, Ascencio-Valle F, Robles-Mungaray M, 2003. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. Fish and Shellfish Immunology 15, 275-282.

# Μ

Magnadóttir B, 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish and Shellfish Immunology 20, 137-151.

Malham SK, 1996. Immunobiology of *Eledone cirrhosa* (Lamarck). PHD Thesis, University of Wales, 315 pp.

- Malham SK, Runham NW, Secombes CJ, 1997. Phagocytosis by haemocytes from the lesser octopus *Eledone cirrhosa*. Iberus 15, 1-11.
- Malham SK, Runham NW, Secombes CJ, 1998. Lysozyme and antiprotease activity in the lesser octopus *Eledone cirrhosa* (Lam.) (Cephalopoda). Developmental and Comparative Immunology 22, 27-37.

- Malham SK, Lacoste A, Gélébart F, Cueff A, Poulet SA, 2002. A first insight into stress-induced neuroendocrine and immune changes in the octopus *Eledone cirrhosa*. Aquatic Living Resources 15, 187-192.
- Mameli M, 2004. Nongenetic selection and nongenetic inheritance. The British Journal for the Philosophy of Science 55, 35-71.
- Mangold K, 1989. Neurosécrétion et organes endocrines, In Mangold K, Grassé PP (Eds) Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie. Céphalopodes. Paris Masson, pp. 303-320.
- Mangold K, Bidder AM, 1989a. L'appareil digestif et la digestion, In Mangold K, Grassé PP (Eds) Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie. Céphalopodes. Paris Masson, pp. 321-373.
- Mangold K, Bidder AM, 1989b. Appareils respiratoire et circulatoire : respiration et circulation, In Mangold K, Grassé PP (Eds) Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie. Céphalopodes. Paris Masson, pp. 387-434.
- Mangold K, Boletzky SV, 1989. Distribution géographique. In Mangold K, Grassé PP (Eds) Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie. Céphalopodes. Paris Masson, pp. 609-618.
- Marsh J, Weinstein D, 1966. Simple charrin method for determination of lipids. Journal of Lipid Research 7, 574-576.
- Martello LB, Tjeerdema RS, 2001. Combined effects of pentachlorophenol and salinity stress on chemiluminescence activity in two species of abalone. Aquatic Toxicology 51, 351-362.
- Martinez I, Moyano FJ, Fernandez-Diaz C, Yufera M, 1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). Fish Physiology and Biochemistry 21, 317-323.
- Martínez R, López-Ripoll E, Avila-Poveda O, Santos-Ricalde R, Mascaró M, Rosas C, 2011. Cytological ontogeny of the digestive gland in post-hatching *Octopus maya*, and cytological background of digestion in juveniles. Aquatic Biology 11, 249-261.
- Masuda T, Otomo R, Kuyama H, Momoji K, Tonomoto M, Sakai S, Nishimura O, Sugawara T, Hirata T, 2012. A novel type of prophenoloxidase from the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* contributes to the melanization of plasma in crustaceans. Fish and Shellfish Immunology 32, 61-68.
- Matsumoto T, Nakamura AM, Takahashi KG, 2006. Cloning of cDNAs and hybridization analysis of lysozymes from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 145, 325-330.
- Mazorra MT, Rubio JA, Blasco J, 2002. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: kinetic characteristics and effects of heavy metals. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 131, 241-249.
- McBreen F, Askew N, Cameron A, Connor D, Ellwood H, Carter A, 2011. UK-seamap 2010: Predictive mapping of seabed habitats in UK waters. Technical Report 446, Joint Nature Conservation Committee (JNCC), pp. 103.

- McFall-Ngai M, Nyholm SV, Castillo MG, 2010. The role of the immune system in the initiation and persistence of the *Euprymna scolopes-Vibrio fischeri* symbiosis. Seminars in Immunology 22, 48-53.
- Moguel C, Mascaró M, Avila-Poveda O, Caamal-Monsreal C, Sanchez A, Pascual C, Rosas C, 2010. Morphological, physiological and behavioral changes during post-hatching development of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda) with special focus on the digestive system. Aquatic Biology 9, 35-48.
- Moltschaniwskyj NA, Jackson GD, 2000. Growth and tissue composition as a function of feeding history in juvenile cephalopods. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 253, 229-241.
- Morritt D, Shaw P, 2012. Analysis of genetic differentiation among spawning populations of cuttlefish *Sepia officinalis*. Final Report, CRESH project, 10 pp.
- Moyano FJ, Diaz M, Alarcon FJ, Sarasquete MC, 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Fish Physiology and Biochemistry 2, 121-130.
- Muona M, Soivio A, 1992. Changes in plasma lysozyme and blood leucocyte levels of hatchery-reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and sea trout (*Salmo trutta* L.) during parr-smolt transformation. Aquaculture 106, 75-87.

#### Ν

- Naraoka T, Uchisawa H, Mori H, Matsue H, Chiba S, Kimura A, 2003. Purification, characterization and molecular cloning of tyrosinase from the cephalopod mollusk, *Illex argentinus*. European Journal of Biochemistry 270, 4026-4038.
- Navarro JC, Villanueva R, 2000. Lipid and fatty acid composition of early stages of cephalopods: an approach to their lipid requirements. Aquaculture 183, 161-177.
- Navarro JC, Villanueva R, 2003. The fatty acid composition of *Octopus vulgaris* paralarvae reared with live and inert food: deviation from their natural fatty acid profile. Aquaculture 219, 613-631.
- Newton K, Peters R, Raftos D, 2004. Phenoloxidase and QX disease resistance in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). Developmental and Comparative Immunology 28, 565-569.
- Nilsen IW, Overbo K, Sandaker E, Sletten K, Myrnes B, 1999. Protein purification and gene isolation of clamsysin, a cold-active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity. FEBS Letters 464, 153-158.
- Norbis W, Lorenzo MI, Torres GJ, 1999. Intra-annual growth variations of young-of-the-year hake (*Merluccius hubbsi*) of the Uruguayan continental shelf based on otolith analysis. Fisheries Research 44, 129-137.

# 0

- O'Dor RK, Wells MJ, 1975. Control of yolk protein synthesis by Octopus gonadotropin *in vivo* and *in vitro* (effects of Octopus gonadotropin). General and Comparative Endocrinology 27, 129-135.
- O'Dor RK, Mangold K, Boucher-Rodoni R, Wells MJ, Wells J, 1984. Nutrient absorption, storage and remobilization in *Octopus vulgaris*. Marine Behaviour and Physiology 11, 239-258.
- O'Dor RK, Webber DM, 1986. The constraints on cephalopods: why squid aren't fish. Canadian Journal of Zoology 64, 1591-1605.
- O'Dor RK, Wells MJ, 1987. Energy and nutrient flow. In Boyle PR (Ed.) Cephalopod Life Cycles, vol. 2, Academic Press, London, pp. 109-133.
- O'Dor RK, Dawe EG, 1998. *Illex illecebrosus*. In Rodhouse PG, Dawe EG, O'Dor RK (eds) Squid recruitment dynamics The Genus *Illex* as a model, the commercial *Illex* species and influences on variability. FAO Fisheries Technical Paper 376, 77-104.
- Ozogul Y, Duysak O, Ozogul F, Özkütük AS, Türeli C, 2008. Seasonal effects in the nutritional quality of the body structural tissue of cephalopods. Food Chemistry 108, 847-852.
- Öztürk G, Akbulut KG, Güney Ş, Acuna-Castroviejo D, 2012. Age-related changes in the rat brain mitochondrial antioxidative enzyme ratios: modulation by melatonin. Experimental Gerontology 47, 706-711.
- Ozyurt G, Duysak O, Akamca E, Tureli C, 2006. Seasonal changes of fatty acids of cuttlefish L. (Mollusca: Cephalopoda) in the north eastern Mediterranean Sea. Food Chemistry 95, 382-385.

#### Ρ

- Palmegiano GB, D'Apote MP, 1983. Combined effects of temperature and salinity on cuttlefish (*Sepia officinalis*) hatchling. Aquaculture 35, 259-264.
- Palumbo A, Di Cosmo A, Gesualdo I, Hearing VJ, 1997. Subcellular localization and function of melanogenic enzymes in the ink gland of *Sepia officinalis*. Biochemical Journal 323, 749-756.
- Paulij WP, Herman PMJ, Roozen MEF, Denucé JM, 1991. The influence of photoperiodicity on hatching of *Sepia officinalis*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 71, 665-678.
- Pereda SV, Uriarte I, Cabrera JC, 2009. Effect of diet and paralarval development on digestive enzyme activity in the cephalopod *Robsonella fontaniana*. Marine Biology 156, 2121-2128.
- Perrin A, 2004. Etude expérimentale des capacités digestives chez la seiche, *Sepia officinalis* L. (Mollusque, Céphalopode): impact de l'alimentation, indice de condition nutritionnelle et formulation d'un aliment artificiel. Thèse de doctorat, Université de Caen. 152 pp.

- Perrin A, Le Bihan E, Koueta N, 2004. Experimental study of enriched frozen diet on digestive enzymes and growth of juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca Cephalopoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 311, 267-285.
- Petrányi GG, 2002. The complexity of immune and alloimmune response. Transplant immunology 10, 91-100.
- Pierce GJ, Key LN, Boyle PR, Siegert KJ, Gonc JM, Porteiro FM, Martins HR, 1999. RNA concentration and the RNA to protein ratio in cephalopod tissues: sources of variation and relationship with growth rate. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 237, 185-201.
- Pierce GJ, Valavanis VD, Guerra A, Jereb P, Orsi-Relini L, Bellido JM, Katara I, Piatkowski U, Pereira J, Balguerias E, Sobrino I, Lefkaditou E, Wang J, Santurtun M, Boyle PR, Hastie LC, MacLeod CD, Smith JM, Viana M, González AF, Zuur AF, 2008. A review of cephalopod–environment interactions in European Seas. Hydrobiologia 612, 49-70.
- Pipe RK, 1990. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. Histochemical Journal 22, 595-603.
- Principato GB, Cristina-Aisa M, Biagoni M, Giovannini E, 1982. Partial purification and characterization of an alkaline phosphatase in *Helix nemoralis* and in *Octopus vulgaris*. Comparative Biochemistry and Physiology 72, 325-328.
- Pinczon Du Sel G, Blanc A, Daguzan J, 2000. The diet of the cuttlefish *Sepia officinalis* L. (mollusca: cephalopoda) during its life cycle in the Northern Bay of Biscay (France). Aquatic Sciences 61, 167-178.
- Probst WN, Stoll S, Hofmann H, Fischer P, Eckmann R, 2009. Spawning site selection by Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) in relation to temperature and wave exposure. Ecology of Freshwater Fish 18, 1-7.

# R

- Ramírez-Castillo ER, Arellano-Martínez M, Ceballos-Vázquez BP, González-Ocampo HA, Aguirre-Guzmán G, Luna-González A, 2011. Immune response of lion's paw scallop *Nodipecte subnodosus* (Sowerby, 1835) challenged with *Vibrio alginolyticus*. The Thai Journal of Veterinary Medicine 41, 425-432.
- Richard A, 1971. Contribution à l'étude expérimentale de la croissance et de la maturation sexuelle de *Sepia officinalis* L. (mollusque : céphalopode). Thèse de doctorat, Université de Lille 1, 264 pp.
- Robin JP, Denis V, 1999. Squid stock fluctuations and water temperature: temporal analysis of English Channel Loliginidae. Journal of Applied Ecology 36, 101-110.
- Rodrigues M, Guerra A, Troncoso J, 2011. The embryonic phase and its implication in the hatchling size and condition of Atlantic bobtail squid *Sepiola atlantica*. Helgoland Marine Research 65, 211-216.
- Rosa R, Nunes L, Reis CS, 2002. Seasonal changes in the biochemical composition of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, from three areas of the portuuese coast. Bulletin of Marine Science 71, 739-751.

- Rosa R, Pereira J, Nunes ML, 2005. Biochemical composition of cephalopods with different life strategies, with special reference to a giant squid, *Architeuthis sp.* Marine Biology 146, 739-751.
- Rosas C, Sánchez A, Pascual C, Aguila J, Maldonado T, Domingues P, 2011. Effects of two dietary protein levels on energy balance and digestive capacity of *Octopus maya*. Aquaculture International 19, 165-180.
- Rossiter M, 1996. Incidence and consequences of inherited environmental effects. Annual Review of Ecology and Systematics 27, 451-476.
- Royer J, 2002. Modélisation des stocks de céphalopodes de Manche. Thèse, Université de Caen. 242 pp.
- Royer J, Periès P, Robin JP, 2002. Stock assessments of English Channel loliginid squids: updated depletion methods and new analytical methods. ICES Journal of Marine Science 59, 445-457.
- Royer J, Pierce G, Foucher E, Robin JP, 2006. The English Channel stock of *Sepia officinalis*: Modelling variability in abundance and impact of the fishery. Fisheries Research 78, 96-106.

# S

- Saurabh S, Sahoo, PK, 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquaculture Research 39, 223-239.
- Segers FHID, Taborsky B, 2010. Egg size and food abundance interactively affect juvenile growth and behaviour. Functional Ecology 25, 166-176.
- Semmens JM, 2002. Changes in the digestive gland of the loliginid squid *Sepioteuthis lessoniana* (Lesson 1830) associated with feeding. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 274, 19-39.
- Semmens JM, Pecl GT, Gillanders BM, Waluda CM, Shea EK, Jouffre D, Ichii T, Zumholz K, Katugin ON, Leporati SC, Shaw PW, 2007. Approaches to resolving cephalopod movement and migration patterns. Reviews in Fish Biology and Fisheries 17, 401-423.
- Sharma S, Chatterji A, 2009. Identification of lysozyme activity from two edible bivalves *Perna viridis* (Linnaeus) and *Meretrix casta* (Chemnitz). Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science 32, 85-90.
- Shin WG, Park SH, Jang MK, Hahn TH, Kim JB, Lee MS, Kim DJ, Jun S-Y, Park CK, 2008. Aspartate aminotransferase to platelet ratio index (APRI) can predict liver fibrosis in chronic hepatitis B. Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver 40, 267-274.
- Siddiqui NI, Akosung RF, Gielens C, 2006. Location of intrinsic and inducible phenoloxidase activity in molluscan hemocyanin. Biochemical and Biophysical Research Communications 348, 1138-1144.
- Silva FHA, Faria DE, Torres KAA, Faria Filho DE, Coelho AAD, Savino VJM, 2008. Influence of egg pre-storage heating period and storage length on the digestive tract of newly-hatched broiler chicks. Brazilian Journal of Poultry Science 10, 23-28.
- Smith VJ, 2010. Immunology of Invertebrates: Cellular. In Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons.
- Sobrino I, Silva L, Bellido JM, Ramos F, 2002. Rainfall, river discharges and sea temperature as factors affecting abundance of two coastal benthic cephalopod species in the gulf of cadiz (sw spain). Bulletin of Marine Science 71, 851-865.
- Söderhäll K, Cerenius L, 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Current Opinion in Immunology 10, 23-28.
- Sofina EY, Akhnedzhanov RA, Pivnenko TN, Epshtein LM, 1988. Trypsin inhibitor from the liver of the squid *Berryteuthis magister*. Khimiya Prirodynkh Soedinenii. 6, 887-888.
- Solorzano Y, Viana MT, López LM, Correa JG, True CC, Rosas C, 2009. Response of newly hatched Octopus bimaculoides fed enriched *Artemia salina*: Growth performance, ontogeny of the digestive enzyme and tissue amino acid content. Aquaculture 289, 84-90.
- Soška V, Jarkovský J, Ravčuková B, Tichý L, Fajkusová L, Freiberger T, 2012. The logarithm of the triglyceride/HDL-cholesterol ratio is related to the history of cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia. Clinical Biochemistry 45, 96–100.
- Staats N, De Winder B, Stal LJ, Mur LR, 1999. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipelagic diatoms *Cylindrotheca clostrerium* and *Navicula salinarum*. European Journal of Phycology 34, 161-169.
- Stabili L, Pagliara P, 1994. Antibacterial protection in *Mathasterias glacialis* eggs: characterization of lysozyme-like activity. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 109, 709-713.
- Stabili L, Pagliara P, 2009. Effect of zinc on lysozyme-like activity of the seastar *Marthasterias glacialis* (Echinodermata, Asteroidea) mucus. Journal of Invertebrate Pathology 100, 189-192.
- Steer MA, Moltschaniwskyj NA, Nichols DS, Miller M, 2004. The role of temperature and maternal ration in embryo survival: using the dumpling squid *Euprymna tasmanica* as a model. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 307, 73-89.
- Suhong W, Yilei W, Zhaoxia Z, Jack R, Zhaohong W, Zhiahua Z, Ziping Z, 2004. Response of innate immune factors in abalone *Haliotis diversicolor supertexta* to pathogenic or non-pathogenic infection. Journal of Shellfish Research 23, 1173-1177.
- Swift K, Johnston D, Moltschaniwskyj N, 2005. The digestive gland of the Southern Dumpling Squid (*Euprymna tasmanica*): structure and function. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 315, 177-186.

- Sykes AV, Domingues PM, Loyd M, Sommerfield A, Andrade JP, 2003. The influence of culture density and enriched environments on the first stage culture of young cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758). Aquaculture 11, 531-544.
- Sykes AV, Domingues PM, Andrade JP, 2006. Effects of using live grass shrimp (*Palaemonetes varians*) as the only source of food for the culture of cuttlefish, *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758). Aquaculture International 14, 551-568.
- Sykes AV, Almansa E, Lorenzo A, Andrade JP, 2008. Lipid characterization of both wild and cultured eggs of cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) throughout the embryonic development. Aquaculture Nutrition 15, 38-53.
- Sykes AV, Almansa E, Lorenzo A, Andrade JP, 2009. Lipid characterization of both wild and cultured eggs of cuttlefish (*Sepia officinalis* L.) throughout the embryonic development. Aquaculture Nutrition 15, 38-53.

# Т

- Takeshita K, Hashimoto Y, Thuijihata Y, So T, Ueda T, Iomoto T, 2004. Determination of the complete cDNA sequence, construction of expression systems, and elucidation of fibrinolytic activity for *Tapes japonica* lysozyme. Protein Expression and Purification 36, 254-262.
- Thomas-Guyon H, Gagnaire B, Bado-Nilles A, Bouilly K, Lapègue S, Renault T, 2009. Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). Developmental and Comparative Immunology 33, 653-659.
- Thompson I, Choubert G, Houlihan DF, Secombes CJ, 1995. The effect of dietary vitamin A and astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout. Aquaculture 133, 91-102.
- Tsunematsu H, Nishimura H, Mizusaki K, Makisumi S, 1985. Kinetics of hydrolysis of amide and anilide substrates of p-Guanidino-L-Phenylalanine by bovine and porcine trypsins. Journal of Biochemistry 97, 617-623.

# U

- Uller T, Astheimer L, Olsson M, 2007. Consequences of maternal yolk testosterone for offspring development and survival: experimental test in a lizard. Functional Ecology 21, 544-551.
- Umezawa H, 1982. Low-molecular-weight enzyme inhibitors of microbial origin. Annual Review of Microbiology 36, 75-99.
- Uriarte I, Espinoza V, Herrera M, Zúñiga O, Olivares A, Carbonell P, Pino S, Farias A, Rosas C, 2012. Effect of temperature on embryonic development of *Octopus mimus* under controlled conditions. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 416-417, 168-175.

Turvey SE, Broide DH, 2010. Innate immunity. The Journal of Allergy and Clinical Immunology 125, S24-32.

## V

- Van Damme R, Bauwens D, Brana F, Verheyen RF, 1992. Incubation temperature differentially affects hatching time, egg survival, and hatchling performance in the lizard *Podarcis muralis*. Herpetologica 48, 220-228.
- Van Meel E, Klumperman J, 2008. Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system. Histochemistry and Cell Biology 129, 253-266.
- Vecchione M, 1987. Juvenile ecology. In Boyle PR (Ed) Cephalopod Life Cycles, Academic Press, London, 2, 61-84.
- Vecchione M, Hand VA, 1989. Digestive-gland histology in paralarval squids (Cephalopoda: Loliginidae). Fishery Bulletin 87, 995-1000.
- Vidal EAG, Dimarco FP, Wormuth JH, Lee PG, 2002. Influence of temperature and food availability on survival, growth and yolk utilization in hatchling squid. Bulletin of Marine Science 71, 915-931.
- Villanueva R, Koueta N, Riba J, Boucaud-Camou E, 2002. Growth and proteolytic activity of *Octopus vulgaris* paralarvae with different food rations during first feeding, using *Artemia nauplii* and compound diets. Aquaculture 205, 269-286.
- Villanueva R, Riba J, Ruizcapillas C, Gonzalez AV, Baeta M,2004 Amino acid composition of early stages of cephalopods and effect of amino acid dietary treatments on paralarvae. Aquaculture 242, 455-478.
- Villanueva R, Quintana D, Petroni G, Bozzano A, 2011. Factors influencing the embryonic development and hatchling size of the oceanic squid *Illex coindetii* following in vitro fertilization. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 407, 54-62.
- Voight JR, Grehan AJ, 2000. Egg brooding by deep-sea octopuses in the North Pacific Ocean. Biological Bulletin 198, 94-100.
- Vonk HJ, Western JRH, 1984. Comparative biochemistry and physiology of enzymatic digestion. Academic Press, London, pp. 109-119.

## W

- Wang J, Pierce GJ, Boyle PR, Denis V, Robin JP, Bellido JM, 2003. Spatial and temporal patterns of cuttlefish (*Sepia officinalis*) abundance and environmental influences a case study using trawl fishery data in French Atlantic coastal, English Channel, and adjacent waters. ICES Journal of Marine Science 60, 1149-1158.
- Wells MJ, 1983. Circulation in cephalopods. In Saleuddin ASM, Wilbur KM (Eds) The Mollusca Vol. 5: Physiology, Part 2, Academic Press, London, pp. 239-290.

- Wells MJ, Clarke A, 1996. Energetics: the costs of living and reproducing for an individual cephalopod. Philosophical Transactions of the Royal Society part B 351, 1083-1104.
- Witbaard R, 1996. Growth variations in *Arctica islandica* L. (Mollusca): a reflection of hydrography-related food supply. ICES Journal of Marine Science 53, 981-987.
- Wolthaus BG, 1984. Seasonal changes in frequency of diseases in dab from the southern North Sea. Helolander Meeresuntersuchunen 37, 375-387.
- Woodroffe C, 2003. Coasts: Form, process and evolution, Cambridge University Press. Press Syndicate of the University of Cambridge 623 pp.

# X

- Xue Q, Itoh N, Schey KL, Cooper RK, La Peyre JF, 2009. Evidence indicating the existence of a novel family of serine protease inhibitors that may be involved in marine invertebrate immunity. Fish and Shellfish Immunology 27, 250-259.
- Xue Q, Hellberg ME, Schey KL, Itoh N, Eytan RI, Cooper RK, La Peyre JF, 2010. A new lysozyme from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a possible evolutionary pathway for i-type lysozymes in bivalves from host defense to digestion. BMC Evolutionary Biology 10, 213.

## Y

- Yim M, 1978. Développement post-embryonnaire de la glande digestive de *Sepia officinalis* L. (Mollusque Céphalopode). Thèse de doctorat, Université de Caen, 75 pp.
- Yim M, Boucaud-Camou E, 1980. Etude cytologique du développement post-embryonnaire de la glande digestive de *Sepia officinalis* L. Mollusque Céphalopode. Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale 69, 59-79.

## Z

Zambonino-Infante JL, Cahu CL, 1994. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Comparative Biochemistry and Physiology 109, 209-212.

# **PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES**

### **Publications**

**Safi G.**, Bloor I., Gras M., Grangere K., Jackson E., Robin J.P., Koueta N. (Under review). Spatial and temporal variation in characteristics of cuttlefish *Sepia officinalis* L., early life history. *Journal of Sea Research*.

Le Pabic C., **Safi G.** (**Co-authors**), Serpentini A., Lebel J.M., Robin J.P., Koueta N. (submitted) Antiprotease, lysozyme and phenoloxydase activities in main tissues of cuttlefish *Sepia officinalis* L. *Comparative Biochemistry and Physiology: part B*.

**Safi G.**, Le Pabic C., Martinez A.S., Le Bihan E., Robin, J.P., Koueta N. (submitted). The digestive gland maturation of juvenile cuttlefish, *Sepia officinalis* L., from different spawning locations assessed with biochemical and histological tools. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 

**Safi G.**,Le Pabic C. (**Co-authors**), Robin J.P., Koueta N. (In preparation) Lysozyme and phenoloxydase activities in early life stages of cuttlefish *Sepia officinalis* L.

Gras M., **Safi G.**, Lebredonchel H., Lepoittevin J., Koueta N., Robin J.P. (In preparation). English Channel Cuttlefish (*Sepia officinalis*) stock structure in the reproduction period, quantitative and histological approaches.

### **Communications orales**

### Internationales

**Safi G.**, Gras M., Robin J.P., Koueta N., (2009). "Impact of different habitats of the English Channel on eggs development, survival and physiological performance of *Sepia officinalis* juveniles." Communication orale - 2<sup>nd</sup> CRESH Project Meeting, *Cephalopod Recruitment from English Channel Spawning Habitats, 28-30 octobre,* Plymouth, UNITED KINGDOM.

**Safi G.**, Bloor I., Gras M., Jackson, E., Robin J.P., Koueta N., (2010). "Comparison of pre-recruit stages from different coastal areas". Communication orale - Colloque Fondateur du Chantier Manche, *Stakeholders meeting of the Channel Program*, *30-31 mars*, Rouen, FRANCE.

**Safi G.**, Bloor I., Gras M., Robin J.P., Koueta N., (2010). "Impact of different habitats of the English Channel on the physiological performances of *Sepia officinalis* juveniles." Communication orale - 3rd CRESH Project Meeting, 22-24 Septembre, Nantes, FRANCE.

**Safi G.**, Bloor I., Gras M., Jackson E., Robin J.P., Koueta N., (2011). "Comparison of the physiological performances of cuttlefish juveniles *Sepia officinalis* L. pre-recruits from different coastal areas of the English Channel." Communication orale présentée à Euroceph 2011, *Cephalopod Biology Research in the 21st Century – A European Perspective*, 7<sup>th</sup> -10<sup>th</sup> April, Vico Equense, Naples, ITALY.

**Safi G.**, Bloor I., Gras M., Jackson E., Robin J.P., Koueta N., (2011). "Cuttlefish *Sepia officinalis* L. early life history from different coastal areas of the English Channel: comparison between experimental hatchlings and wild pre-recruits physiological performances." Communication orale présentée à ICES 2011, *Annual Science Conference*, 19<sup>th</sup>-23<sup>rd</sup> September, Gdansk, POLAND.

**Safi G.**, Bloor I., Gras M., Robin J.P., Koueta N., (2011). "Cuttlefish *Sepia officinalis* L. early life history from different coastal areas of the English Channel: study of the spawning sites impact on the juveniles physiological characteristics." Communication orale - 4<sup>th</sup> CRESH Project Meeting, 4-7 October, Lowestoft, UNITED KINGDOM.

**Safi G.**, Bloor I., Gras M., Jackson E., Robin J.P., Koueta N., (2012). "Juvenile cuttlefish *Sepia officinalis* L. physiology according to different English Channel coastal habitats" Communication orale - Final CRESH Project restitution, June 14<sup>th</sup>, Boulogne sur mer, FRANCE.

Gras M., **Safi G. (co-presenter)**, Lebredonchel H., Quinquis J., Koueta N., Foucher E., Robin J.P. (2012). "Cephalopods are not fish, main life-history traits in the cuttlefish *Sepia officinalis* stock" Communication orale - Final result restitution of CRESH Project, June 14<sup>th</sup>, Boulogne sur mer, FRANCE.

**Safi G.**, Gras M., Bloor I., Robin J.P., Koueta N., (2012). "Impact of major environmental variables on the physiological characteristics of cuttlefish *Sepia officinalis* L. pre-recruits in different spawning sites of the English Channel." Communication orale présentée au CIAC, *27 Octobre-2 Novembre*, Florianopolis, BRASIL.

Le Pabic C., **Safi G.**, Serpentini A., Lebel J-M., Koueta N., (2012). "Effects of chronic exposure to dissolved zinc on juvenile *Sepia officinalis* L. : development of appropriate biomarkers" Communication orale présentée au CIAC, *27 Octobre-2 Novembre*, Florianopolis, BRASIL.

#### Nationales

**Safi G.**, Gras M., Robin J.P., Koueta N., (2012). "Les différences entre œufs et juvéniles de plusieurs côtes ». Communication orale – Présentation des travaux CRESH aux pêcheurs et professionnels du milieu, 3 avril, SMEL, Blainville sur mer, FRANCE.

**Safi G.**, Gras M., Robin J.P., Koueta N., (2012). "Etude de l'impact de différents sites de ponte anglonormands sur les performances physiologiques des juvéniles de seiche *Sepia officinalis* L.». Communication orale – Présentation des travaux CRESH aux pêcheurs et professionnels du milieu, 25 mai, Ste mère église, FRANCE.

### Posters

**Safi G**., Le Pabic C., Robin J.P., Koueta N., (2011). "Pre-recruits immune system evolution of cuttlefish *Sepia officinalis* L. from different spawning sites of the English Channel." Poster présentée à ICES 2011, *Annual Science Conference*, 19<sup>th</sup>-23<sup>rd</sup> September, Gdansk, POLAND.

Le Pabic C., Goux D., **Safi G.**, Serpentini A., Lebel J-M., Koueta N., (2011). Haemocyte characterization in *Sepia officinalis* (Mollusca cephalopoda). Poster présenté à Euroceph 2011, *Cephalopod Biology Research in the 21st Century – A European Perspective*, 7<sup>th</sup> -10<sup>th</sup> April, Vico Equense, Naples, ITALY.

Lebredonchel H., Gras M., **Safi G.**, Slimane S., Quinquis J., Lepoittevin J., Koueta N., Foucher E., Robin J-P., 2011. Structure du stock de seiche, *Sepia officinalis*, en Manche en période de reproduction. Poster au *Forum Association Française d'Halieumétrie*, juin 2011 Boulogne-sur-Mer.

**Safi G**., Le Pabic C., Robin J.P., Koueta N., (2012). "Histological and biochemical tools used to characterize the digestive gland maturation in cuttlefish *Sepia officinalis* L. early life history". Poster présenté au CIAC, *27 Octobre-2 Novembre*, Florianopolis, BRASIL.

Groupe de travail

WORKSHOP CIAC 2012 - "Habitats and behavior of key cephalopod life stages." Participation au groupe de travail au CIAC, *27 29 Octobre*, Florianopolis, BRASIL.