



Activité chitinolytique et propriétés structurales de la cuticule chez la crevette *alaemon serratus* : Description au cours du cycle de mue et perspectives d'utilisation en écotoxicologie

Marc Rollin

► To cite this version:

Marc Rollin. Activité chitinolytique et propriétés structurales de la cuticule chez la crevette *alaemon serratus* : Description au cours du cycle de mue et perspectives d'utilisation en écotoxicologie. Écotoxicologie. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMMLH22 . tel-03578339

HAL Id: tel-03578339

<https://theses.hal.science/tel-03578339>

Submitted on 17 Feb 2022

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

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

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité **PHYSIOLOGIE ET BIOLOGIE DES ORGANISMES - POPULATIONS -
INTERACTIONS**

Préparée au sein de l'Université Le Havre Normandie

**Activité chitinolytique et propriétés structurales de la cuticule
chez la crevette *Palaemon serratus* - Description au cours du
cycle de mue et perspectives d'utilisation en écotoxicologie**

Présentée et soutenue par
MARC ROLLIN

**Thèse soutenue le 03/12/2021
devant le jury composé de**

MME SUSANA DE MATOS FERNANDES	DOCTEUR (HDR), UNIVERSITE PAU PAYS DE L ADOUR	Rapporteur du jury
M. ELLIOTT SUCRE	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, CUFR DE MAYOTTE	Rapporteur du jury
M. ROMAIN COULAUD	MAÎTRE DE CONFERENCES, UNIVERSITE LE HAVRE NORMANDIE	Membre du jury
M. VINCENT FELTEN	MAÎTRE DE CONFERENCES, UNIVERSITE DE LORRAINE	Membre du jury
MME CÉLINE PICARD	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE LE HAVRE NORMANDIE	Membre du jury
M. BENOIT XUEREB	MAÎTRE DE CONFERENCES, UNIVERSITE LE HAVRE NORMANDIE	Membre du jury Co-encadrant
MME CAROLE COSSU-LEGUILLE	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE DE LORRAINE	Président du jury
M. FRANK LE FOLL	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE LE HAVRE NORMANDIE	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par FRANK LE FOLL, Stress environnementaux et biosurveillance
des milieux aquatiques**

*« Déjà essayé. Déjà échoué. Peu importe.
Essaie encore. Echoue encore. Echoue mieux »*

Samuel Beckett (1906 – 1989)

Remerciements

En premier lieu, j'aimerais remercier gracieusement l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer cette thèse. Merci à Susana DE MATOS FERNANDES ainsi qu'à Elliott SUCRE d'avoir pris la responsabilité d'être rapporteurs, ainsi qu'à Carole COSSU-LEGUILLE et Vincent FELTEN d'endosser le rôle d'examineurs.

Merci à Frank LE FOLL pour avoir dirigé mon travail de thèse. Ton accueil et ta confiance ont été d'importants atouts qui m'ont permis de mener à bien ces travaux tout au long de ces années. Malgré nos emplois du temps pas toujours synchronisés, tu as su te rendre disponible et prodigué de bons conseils permettant d'approfondir et affiner mes choix scientifiques. Merci pour ton temps, tes relectures avisées, ta patience et ta bonne humeur.

Merci infiniment à toi Benoit, ou devrais-je dire monsieur XUEREB, pour l'encadrement scientifique et le soutien sans faille tout au long de ces quatre années. Qui aurait pu croire qu'une simple rencontre à la SEFA 2016 aurait pu donner suite à autant d'expériences par la suite ? Au travers de ta rigueur scientifique et des nombreuses discussions que l'on a eues, en réunion comme entre deux portes, j'ai su m'épanouir et prendre confiance en moi sur le plan scientifique. A bien des égards, tu m'as été d'une aide plus que précieuse. D'une simple phrase rassurante jusqu'aux dernières corrections réalisées dans un rush intense, tu as su être là, avec les mots justes. Au-delà du scientifique, j'ai aussi appris à découvrir et à apprécier la personne que tu es. Je me rappellerai longtemps de ces expéditions pêche à apercevoir l'apôtre de Poséidon, de ces fous rires partagés avec (et en dépit) Alex, de ces sessions de running qui ont conduit à faire la Dingo Night, de ces parties de Magic endiablés, finissant quelques fois par un « ça me va » et de tant d'autres. Merci pour ta bonne humeur et ta curiosité, tu as été un encadrant idéal, à la hauteur de ton investissement.

Second encadrant scientifique, je ne saurai ô combien te remercier Romain COULAUD pour tout ce que tu as fait depuis mes débuts scientifiques. Voilà maintenant sept ans que nous nous connaissons, et je me rappelle encore des premiers moments au coin de la machine à café à Metz, à blaguer avec les thésards. A l'époque tu avais déjà cette humanité qui te caractérise tant, cette faculté de rendre les choses simples et de faire en sorte que tout aille bien. Sept ans en arrière, tu me rassurais lors de l'utilisation de R et la manipulation des gammars, aujourd'hui tu me permets de réaliser une thèse fascinante dans laquelle je me suis épanoui professionnellement et personnellement. Merci pour ta confiance infaillible, ton écoute précieuse et tes conseils avisés, autant d'atouts qui m'ont aidé à devenir une meilleure personne et un scientifique curieux. Tes simples « hello, ça va ? », suivis de quelques blagues m'ont aidé à sourire chaque jour, et à affronter les journées de poisse. Je ne pouvais rêver mieux comme père spirituel depuis toutes ces années. Merci pour tout, ne change rien et des bisous à la famille !

Je tenais à exprimer une profonde gratitude envers le laboratoire URCOM, plus précisément Céline PICARD, Nicolas HUCHER et Vincent LOISEL, pour m'avoir fait découvrir de merveilleuses possibilités dans l'étude interdisciplinaire des crustacés et de leur mue. Les interactions que nous avons eues ont véritablement attisé ma curiosité et mon intérêt pour ces aspects novateurs de ma thèse. Merci d'avoir rendu cela possible, tout comme je vous remercie pour votre patience à toute épreuve ... au travers de quelques déboires (j'ai une vive pensée pour la DSC), vous avez su faire de moi quelqu'un de plus réfléchi. Je garderai en mémoire nos discussions de plus en plus affinées sur le sujet, ainsi que votre gentillesse et curiosité, qui m'ont fait revenir vers vous avec toujours plus de questions (ainsi qu'un sourire plus grand !).

Mes pensées vont également à Olivier GEFFARD, Arnaud CHAUMOT et Hervé QUEAU, qui m'ont offert la possibilité d'approfondir mon sujet de thèse en utilisant une espèce de crustacé d'eau douce. Au-delà de cette collaboration, je tenais à vous remercier pour votre présence depuis mon stage de M1 et vos conseils, toujours avisés. Merci pour votre bienveillance et votre disponibilité, même à l'autre bout de la France. Je suis honoré de votre confiance et de la curiosité que vous avez lors de chacune de nos discussions. Au plaisir de vous revoir et de discuter plus amplement !

Puisque j'ai évoqué mon stage, j'aimerais remercier Vincent FELTEN, Michael DANGER et Martin LAVIALE pour avoir contribué à mes premiers pas scientifiques. Le temps passé avec vous a façonné la personne que je suis et je vous remercie pour tous les enseignements personnels et professionnels.

Merci mille fois à Béatrice ROCHER pour tes nombreux conseils et ta patience scientifique, qui a entre autres permis à un pan de thèse de voir le jour. Travailler à tes côtés a été une expérience incroyable dont je me souviendrai longtemps. Merci pour avoir cru en ce travail, supporté les hauts et les bas tout en conservant cette curiosité et passion qui te définissent bien. Je n'oublierai pas ces moments passés ensemble à la paillassse, tout comme je n'oublierai pas la fameuse loi du sorcier.

En parlant de supporter... je voudrais dire un grand merci à l'équipe technique de SEBIO, en commençant par Aurélie qui a endossé les rôles de soutien / technicienne / pêcheuse / illustratrice / bibliographiste / lectrice / pâtissière spécialiste en tarte citron (et j'en passe), le tout en subissant mes jeux de mots effroyables ! Nous n'avions pas les mêmes concepts de rangements je te l'accorde, mais pour le reste, ce fut un plaisir de partager tous ces moments avec toi. Ton point de vue scientifique à chaque manipulation m'a permis de revoir à la hausse chacun de mes protocoles. Merci pour avoir cru en moi et m'avoir soutenu tout ce temps. J'espère que le côté chat noir s'estompera avec le temps, histoire que tu sortes un peu du sable ! En tout cas, tu as vu que réaliser une thèse est quelque chose d'unique, et qui sait ... cela pourra te donner des idées (en plus doc lapinou ça sonne bien).

Merci également à Agnès pour les coups de main apportés au long de cette thèse, ainsi que ta bonne humeur. Des simples formations pour l'azote liquide aux pêches d'Antifer, nos discussions au cours des différents événements étaient toujours agréables et enrichissantes. Bon courage avec toutes ces cuticules, nos formations sur les appareils thermiques vont me manquer !

Merci à Mayélé pour ces sessions pêches, aussi inattendues que drôles. Il va falloir te trouver quelqu'un d'autre pour te débloquer des rochers ! Merci pour ces rires en tout cas. Merci Steph et Nathalie pour vos sourires et vos bons mots, toujours appréciés en période de rédaction. Merci à Valérie pour ta patience et pour tous tes bons plans administratifs, tu m'as fait gagner beaucoup de temps !

Plus globalement, merci au laboratoire SEBIO pour l'hospitalité et la convivialité. Merci Céline, Tiphaine, Thomas, Florence, Salima, Géraldine et tant d'autres pour vos discussions autour d'une pause, et la jovialité que vous apportez au sein du laboratoire.

Merci aux anciens de m'avoir bien initié au monde du Havre : merci à Alex et Jomar, promis je viens prendre une Gulden bientôt les duuuuudes, merci à Matthieu, ton ombre plane encore sur le cyteumètre, merci à docteur NIHOUUUL, rendez-vous à la taverne de la truie qui danse et merci à Catarina, fingers crossed for you !

Un immense merci au bureau H121 et tous ceux qui y ont transité, vous avez fait de mes quatre ans un réel bonheur. Merci à ma mate de thèse Apolline, pour tout ce que tu as apporté dans ce bureau et en dehors. Si ton rire sardonique ne résonne plus en ces murs, ce sont des centaines de mes souvenirs qui en sont imprégnés. Te suivre à travers ce parcours, ces formations de médiation scientifique, ces séminaires et ces opportunités de parler de nos thèses m'a fait rencontrer une personne incroyable. Merci pour ces découvertes, ces fous rires, ce don pour la salsa (escroc !), et tous ces bons moments, en espérant qu'ils soient encore plus nombreux après (sans oublier le sacré Marco, cela va sans dire !)

Merci à Caro, la nouvelle régente du bureau, pour ta bonne humeur et ton écoute. Merci pour ces sorties ciné, restal, et ces discussions, souvent un café à la main, sans précédent (*i.e.* qui ne se vaudrent pas). Outre mes moqueries, je suis heureux que tu sois restée ici, et j'ai hâte de passer d'autres bons moments en ta compagnie après la thèse (ce n'est pas du second degré).

Merci à Gauthier pour tous ces moments, drôles comme sérieux, que tu as apportés. Hâte de refaire des soirées magic / warhammer / musique au bout de la nuit. Tu es incroyable, et tu le sais ! La bise à GuitGuit, de la part d'un collègue !

Enfin merci à la nouvelle vague de recrues : JB le magnifique (artiste peintre en devenir), Sarah (la crabquérante), Matthieu, Mathilde, Sylvain. Chaque interaction avec vous est un plaisir et me fait dire que la relève est plus qu'assurée.

Remerciements

Merci aux autres doctorants que j'ai pu rencontrer à SEBIO comme ailleurs : merci à Clément et Elodie (bisous mes loulous), Mira (je te rends l'ATG), Alex et Dasha, Charbel, monsieur Baratange et Héloïse (à bientôt pour une petite partie !), Max et Elo !

Merci également aux promos de master qui n'ont pas dormi pendant mes cours, ainsi qu'aux pauvres stagiaires « martyrisés » pendant ces travaux. Une grande pensée pour Chloé, qui en plus d'avoir supporté mes jeux de mots, a su me faire rire à bien des reprises ! Ne change rien et courage pour la gestion des stagiaires (je suis preneur des futurs rapports !). Merci à Auréline pour avoir ambiancé les journées et courage pour ta thèse ! Merci également à Martin pour ton travail, pas évident en ces temps, et courage pour la suite.

Merci à toutes les personnes m'ayant suivi, supporté et avec qui je suis resté en contact. Merci aux havrais Marine, Clairette, Marie, Romain, Maelys, Benji, Aurélie pour chaque soirée passée avec vous !

Un merci spécial à un certain DENIIIIIIIS, qui lors d'une escale à Bruxelles, m'a affirmé que « dans la vie, aime en premier, et ensuite fais ce que tu veux ».

Merci à la seconde famille de Metz : Clément, Anne et Justine (mères, je suis fier), Imad (inas inas), Quentin (Orvalhalla), Fanny (quand est-ce que tu reviens ?), David, Manu (on y est presque mon gars), Vincent Baillard, Nico, Alice, Olivier, Andréina, Emilie et tant d'autres ! Hâte de vous revoir (représentation au Liddl de Mulhouse, vous connaissez).

Un merci tout particulier à Ana, qui me suit depuis un petit bout de temps maintenant. Merci pour ces discussions riches et ce goût de la découverte, hâte de voyager pour pouvoir t'en dire davantage ! Je te souhaite le meilleur pour ton futur, aussi intense que sera ta défaite au badminton.

Un grand merci à ceux qui me soutiennent depuis plus longtemps. Merci à Valeu (Horatio), n'oublie pas de prévenir Edouard de tout ça. Merci à John ... Joouoohn, embrassez le Poitou pour moi mon vieux. Merci à Julien et Mijal, à très bientôt mes amis ! Merci à Raph, en direct de la Colombie. Merci à Jason, la puissance du scaphandre. Merci à Dono, des bisous ma caille et rdv à la place Stan. Merci à Allan, Léna, Valentin et tant d'autres. Je pense à vous.

Enfin un grand merci à ma famille, la vraie cette fois, pour être présente depuis tout ce temps et me soutenir quoi qu'il arrive. Merci papa, merci maman, merci beau-père, belle-sœur, tantes, oncles et grands-parents. Vous avez fait de moi ce que je suis aujourd'hui, je suis fier de vous et je vous aime.

Remerciements

Enfin merci beaucoup à mon frère Eric. Au cours de ma vie, tu m'as transmis bon nombre de passions mais aussi de curiosité. Tu as été, et restes une source d'inspiration et de fierté pour moi. Merci d'être présent et d'être qui tu es.

*« L'inspiration est réciproque : chacun de nous a une responsabilité
créative envers l'autre »*

Oviyia Pashiri

Table des matières

I. Introduction générale	27
II. Synthèse bibliographique	33
2.1. <i>Utilisation des Palaemonidae en écotoxicologie et pertinence en tant qu'espèces sentinelles..</i>	35
2.1.1. Les Palaemonidae : une famille de crustacés diversifiée et présente dans tous les milieux	37
2.1.2. Biologie et écologie	40
2.1.3. Utilisation en écotoxicologie	46
2.2. <i>La mue chez les crustacés</i>	56
2.2.1. Composition de la cuticule chez les crustacés	56
2.2.2. Le cycle de mue : un processus régulier immuable	70
2.3. <i>La perturbation de la mue : connaissances et marqueurs disponibles</i>	83
2.3.1. La mue : une perturbation silencieuse mais visible	83
2.3.2. Quels sont les marqueurs adaptés à la détection d'altérations de la mue in natura ?	87
III. Matériels et méthodes	107
3.1. <i>Provenance et maintien au laboratoire des spécimens de Palaemon serratus</i>	109
3.1.1. Provenances des crevettes	109
3.1.2. Techniques de prélèvement	110
3.1.3. Stabulation au laboratoire	111
3.1.4. Expérimentation d'expositions in vivo, sous conditions contrôlées de laboratoire	112
3.2. <i>Mesures biologiques</i>	115
3.2.1. Détermination du stade de mue et du sexe des organismes	115
3.2.2. Mesure de l'activité de la N-acétyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) par dosage colorimétrique ...	120
3.3. <i>Caractérisations des propriétés structurales de la cuticule de Palaemon serratus</i>	126
3.3.1. Collecte et stockage des cuticules	126
3.3.2. Mesures des propriétés thermiques de la cuticule	128
3.3.3. Mesures de la composition de surface des cuticules par IRTF	134
IV. Adaptation de la mesure de l'activité N-Acétyl-β-D-Glucosaminidase chez <i>Palaemon serratus</i> : variabilité et sensibilité de la réponse	139
4.1. <i>Optimisation et variabilité physiologique de la mesure de l'activité N-acétyl-β-D-glucosaminidase</i>	141
4.2. <i>Mesure du pouvoir discriminant de l'activité N-acétyl-β-D-glucosaminidase par expositions in vitro</i>	173
V. Caractérisation de la cuticule par analyse des propriétés physicochimiques et suivi dans un contexte dynamique	203

5.1. Mesure des propriétés physicochimiques de la cuticule	205
VI. Application et pertinence des marqueurs de mue sous influence de stress chimiques	259
6.1. Sensibilité en conditions contrôlées	261
6.2. Application in situ	295
VII. Transférabilité de la méthode de mesure de l'activité N-Acétyle-β-D-Glucosaminidase chez <i>Gammarus fossarum</i>	317
7.1. Mesure et utilisation de l'activité N-Acétyle-β-D-Glucosaminidase chez <i>Gammarus fossarum</i>	319
VIII. Synthèse et discussion	339
8.1. Intérêt du modèle <i>Palaemon serratus</i>	343
8.2. Méthodologies de mesures des marqueurs de mue	347
8.2.1. Optimisation de la mesure de l'activité de la NAGase	347
8.2.2. Caractérisation des propriétés physicochimiques de la cuticule	351
8.2.3. Périmètres de déploiement des marqueurs.....	355
8.3. Ecophysiologie des réponses mesurées	357
8.3.1. Evolution des propriétés structurales de la cuticule et de l'activité de la NAGase au cours du cycle de mue.....	357
8.3.2. Activité N-acétyle-β-D-Glucosaminidase en fonction du sexe des organismes	359
8.3.3. Propriétés structurales de la cuticule et écologie des organismes.....	360
8.4. Application des outils développés en tant que marqueurs d'altération de mue.....	363
8.4.1. Application des outils en écotoxicologie : de futurs marqueurs d'altération de la mue ?.....	363
8.4.2. Périmètre d'utilisation des marqueurs de mue en écotoxicologie.....	365
IX. Conclusion et perspectives	371
Références bibliographiques	379
Annexes	437

Liste des abréviations

4-NAG : 4-nitrophényl N-acétyl- β -D-Glucosaminide

20-HE : 20-hydroecdysone

AChE : acétylcholinestérase

ACP : analyse en composantes principales

ADN : acide(s) désoxyribo-nucléiques

AFNOR : association française de normalisation

ASW : artificial seawater

ATG : analyse thermogravimétrique

BSA : bovine serum albumine

BMD : Benchmark Dose

CAT : catalase

CE₅₀ : concentration aboutissant à un effet sur 50 % des individus

CHH : crustacean hyperglycemic hormone

CHL : cholestérol

CL₅₀ : concentration létale pour 50 % des individus

COVID : corona virus disease

CYP1A : cytochrome P4501A

DDT : dithiothreitol

DEHP : diethylhexyl phthalate

DMSO : diméthylsulfoxyde

DO : densité optique

DSC : differential scanning calorimetry

EcR : récepteur à ecdysone

EDTA : éthylènediaminetétraacétique

GP : glutathion peroxydase

GSH : glutathion sous forme réduite

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques

HSP : heat shock protein

ICP-AES : inductively coupled plasma atomic emission spectrometry

ICP-MS : inductively coupled plasma mass spectrometry

ISO : organisation internationale de normalisation

IRTF : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La : longueur de l'abdomen

Lc : longueur du céphalothorax

Lct : longueur du céphalothorax en prenant en compte le rostre

LDH : lactate déshydrogénase

Lr : longueur du rostre

LOEC : lowest observed effect concentration

LPO : peroxydation lipidique

Lt : longueur totale

MDA : malondialdéhyde

MIH : hormone inhibitrice de la mue

MT : métallothionéine

NAG : N-acétyl- β -D-glucosaminide

NAGase : N-acétyl- β -D-glucosaminidase

OCDE : organisation de coopération et de développement économique

PBDE : polybromodiphényléther

PCB : polychlorobiphényle

PoA : ponastérone A

Px : pentoxifylline

ROCCH : réseau d'observation de la contamination chimique du littoral

SETAP : Shrimp Embryo Teratogenesis toxicity Assay Palaemonid

SOD : superoxide dismutase

STEP : station d'épuration des eaux usées

TBT : tributylétain

UA : unité génotoxique

UT : unité toxique

UV : ultraviolet

Listes des figures

Introduction

Synthèse bibliographique

- Figure II-1** Répartition géographique d'espèces de Palaemonidae dans le monde, selon les régions biogéographiques. ANT : Antarctique, AT : Afrotropicale, AU : Australasienne, NA : Néarctique, NT : Néotropique, OL : Orientale, PA : Paléarctique, PAC : Îles océaniques du Pacifique. N représente la richesse spécifique de Palaemonidae recensés (d'après De Grave *et al.* 2008)..... 37
- Figure II-2** Relations phylogénétiques des espèces représentatives de Palaemonidae des genres *Macrobrachium*, *Palaemon* et *Palaemonetes*, établies sur la comparaison de 536 pb du gène de l'ARNr 16S. Les nombres à proximité des nœuds indiquent les probabilités postérieures bayésiennes et le support bootstrap utilisant le maximum de parcimonie (d'après Cuesta *et al.* 2012)..... 39
- Figure II-3** Photographie d'une crevette bouquet *Palaemon serratus* en milieu naturel (source : f.sichel@unicaen)..... 39
- Figure II-4** Distribution des populations de crevette bouquet *Palaemon serratus* le long des côtes françaises (source : https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/18410)..... 40
- Figure II-5** Description morphologique d'un Palaemonidae en vue latérale (crédit : A. Duflot) 41
- Figure II-6** Différenciations morphologiques de la partie antérieure du céphalothorax chez les Palaemonidae, d'après Gonzalez-Ortega & Cuesta (2006) : (A) *Palaemonetes varians*, (B) *Palaemon elegans*, (C) *Palaemonetes antennarius*, (D) *Palaemon macrodactylus*, (E) *Palaemon xiphias*, (F) *Palaemon adspersus*, (G) *Palaemon longirostris* (femelle issue de la rivière Gadalquivir) et (H) *Palaemon serratus*, accompagnée d'une illustration (source : A. Duflot). 42
- Figure II-7** Illustration des différentes tailles mesurées sur les spécimens *Palaemon serratus* : taille totale de l'organisme (Lt), taille du céphalothorax avec rostre (Lct), taille du rostre (Lr), taille du céphalothorax sans rostre (Lc), taille de l'abdomen (La)..... 43
- Figure II-8** Représentation de la distribution bathymétrique des différents stades de développement de *Palaemon serratus* (crédit : A. Duflot, d'après Campillo, 1979) 46
- Figure II-9** Approche multi-échelles utilisée en écotoxicologie chez les Palaemonidae (crédit : A. Erraud)..... 47
- Figure II-10** Orientation des chaînes moléculaires au sein des variétés cristallographiques de chitine (crédit : Aurélie Duflot, adapté de Jeuniaux, 1975) 58

- Figure II-11** Organisation structurale de la cuticule de homard *Homarus americanus*. (a) Représentation schématique des niveaux hiérarchiques de la structure moléculaire de la cuticule, avec au plus bas niveau la présence de molécules de N-acétyl-glucosamines (I) formant des chaînes anti-parallèles d' α chitine (II). La formation de nanofibrilles se fait par paquetage de 18-25 chaînes chitineuses entourées par une matrice protéique (III). Ces nanofibrilles se regroupent pour former des fibres protéo-chitineuses (IV). Ces fibres s'arrangent en plan horizontal autour de cavités formées par les canaux poreux, donnant une forme d'alvéoles de ruche (V). Les plans ainsi formés se superposent tout en ayant une rotation régulière le long de l'axe normale, formant une structure de Bouligand (VI). (b) Structure tissulaire d'une section normale de la cuticule observée au microscope électronique à balayage, où la délimitation des couches, notamment entre l'exo et l'endocuticule, est remarquable par la différence d'épaisseur des structures de Bouligand (= Tp). (c) Coupe oblique d'endocuticule observée au microscope à balayage, permettant de voir l'empilement des structures de Bouligand et l'orientation des plans fibreux les formant. Les flèches renseignent sur l'emplacement de canaux poreux (d'après Romano *et al.* 2007) 60
- Figure II-12** Représentation de la structure cuticulaire des crustacés (d'après Stevenson, 1985)..... 62
- Figure II-13** Illustration de la distribution des fibres verticales au sein de la cuticule des crustacés. Les canaux poreux (pc) partent des cellules hypodermiques (H) puis remontent le long des couches cuticulaires en perdant progressivement de l'épaisseur. A la surface, l'épicuticule (epi) est traversée par des fibres verticales denses qui s'étendent vers l'exocuticule (d'après Modla, 2006) 64
- Figure II-14** Distribution spatiale du ratio de calcification dans l'exosquelette du crabe *Calappa granulata*. Le ratio $R_{\text{carbonate}}$ traduit le degré de calcification. Un fort ratio correspond à une minéralisation élevée (e.g. calcite) tandis qu'un ratio faible signifie une faible minéralisation (e.g. forme amorphe, d'après Katsikini *et al.* 2020)..... 69
- Figure II-15** Dynamique de la cuticule au cours du cycle de mue chez les crustacés. Ep : épicuticule (jaune), ex : exocuticule (bleu), en : endocuticule (vert), ml : couche membranaire (rouge), épiderme (violet) comprenant t : glande tégumentaire, cl : cellules de Leydig, s : sinus hémolymphatique, lp : cellule lipoprotéique (d'après Skinner, 1962). 73
- Figure II-16** Régulation de la mue chez les crustacés (d'après Song *et al.* 2017). Exemple chez les Palaemonidae : le complexe glande du sinus et organe X permet la sécrétion de la Molting Inhibiting Hormone (MIH) qui inhibe la synthèse des ecdystéroïdes (20-HE) par l'organe Y, au cours de la mue. Au cours de la prémue, les niveaux de MIH vont diminuer progressivement, favorisant la synthèse de la 20-HE qui aura un rétrocontrôle négatif sur l'organe X. La 20-HE se concentrera dans l'hémolymph permettant sa rencontre avec les récepteurs à ecdysone (EcR) présents dans l'organisme. Parmi les EcR connus se trouvent les initiateurs de la transcription des ARNm codant pour la production d'enzymes chitinolytiques (chitinase et NAGase), dont le rôle permettra in fine le déclenchement de la mue (crédit : A. Duflot) 78
- Figure II-17** Influence supposée des ecdystéroïdes (20-HE) et de la Moulting Inhibiting Hormone (MIH) sur les crustacés selon la photopériode (d'après Aiken, 1969) 81
- Figure II-18** Bibliométrie relative aux recherches sur la régulation et l'altération du processus de mue chez les crustacés. L'aire en rose et celle en orange représentent respectivement le nombre d'itérations obtenues par la recherche de « molt regulation crustacea » et « molt disruption crustacea » sur le moteur de recherche Google scholar. 84

Figure II-19 Marqueurs de mue utilisés pour diagnostiquer l'altération du processus de mue chez les crustacés. Chaque pourcentage a été calculé sur les 146 publications scientifiques recensées dans ce travail bibliographique (crédit : M. Rollin).	88
Figure II-20 Exemples d'anomalies morphologiques observées chez la crevette blanche <i>Palaemon longirostris</i> : organisme normal (A), déformations du rostre et du céphalothorax (B), déformations du rostre (C), hypertrophie des scaphocérites (D), hypertrophie des uropodes (E) (source : Béguer et al. 2008).	91

Matériel et méthodes

Figure III-1. Répartition des stations d'échantillonnage de <i>Palaemon serratus</i> le long du littoral de la baie de Seine (Normandie, France).	110
Figure III-2 Méthode de prélèvement des crevettes <i>Palaemon serratus</i> sur le littoral de la baie de Seine. a : havenet de 20 cm de diamètre avec un maillage de 6 mm, b : épuisette en nylon de 13x19 cm avec une maille de 0,5 mm (source : M. Burlion Giorgi).	111
Figure III-3 Dispositifs mis en place lors des manipulations <i>in vivo</i> . L'oxygène est acheminé à chaque bécber par des bulleurs reliés à des pipettes Pasteur, afin d'obtenir un bullage fin. La température lors de l'exposition est vérifiée à l'aide d'une sonde température immergée dans 1 L d'eau de mer naturelle (crédit : M. Rollin).	113
Figure III-4 Détermination des stades de mue de la crevette <i>Palaemon serratus</i> par observation de la sétogenèse au niveau des uropodes (crédit : A. Duflot)	117
Figure III-5. Dispositif non invasive permettant la détermination des stades de mue chez la crevette <i>Palaemon serratus</i> (crédit : M. Rollin)	119
Figure III-6 Observations sous loupe binoculaire (x8) des caractères sexuels secondaires de <i>Palaemon serratus</i> . Le mâle (gauche) est reconnaissable par la présence de la protubérance (p) visible au milieu de la cinquième paire de périopodes, de bulbes éjaculateurs à la base de chaque périopode de la cinquième paire (be), ainsi que par l'arrangement resserré des périopodes, tandis que la femelle (droite) dispose d'un bourrelet (b) à la place de la protubérance, de gonopores à la base de chaque périopode de la troisième paire (g), et de périopodes relativement élargis (source : A. Duflot). .	120
Figure III-7 Principe de la réaction colorimétrique permettant de quantifier l'activité de la N-Acétyle- β -D-Glucosaminidase (NAGase), utilisée par Spindler (1976). La NAGase hydrolyse la liaison entre le substrat N-Acétyle-Glucosamine (NAG) et le ligand chromogénique, libérant du nitrophénol qui in fine colore le milieu réactionnel en jaune. Le résultat est détectable à 410 nm.	122
Figure III-8 Variation de la stabilité de l'activité de la NAGase (a) et de la teneur protéique (b) des extraits enzymatiques, au cours du temps. Les données jaunes et bleues représentent respectivement les valeurs obtenues lorsque l'extrait a été incubé à 37°C et à température ambiante (20°C).	124
Figure III-9 Collecte, traitement et stockage des pièces cuticulaires du céphalothorax (orange) et de l'abdomen (jaune) des crevettes <i>Palaemon serratus</i> , en vue des analyses des propriétés structurales. Les pointillés rouges représentent les lignes de coupe des pièces cuticulaires (crédit : M. Rollin).	127

Figure III-10 Événements caractéristiques d'un matériau polymère observables par analyse de calorimétrie différentielle	129
Figure III-11 Thermogramme caractéristique de la cuticule de <i>Palaemon serratus</i> analysée par calorimétrie différentielle. Pour chaque événement, les températures de début (Td), de pic (Tp) et de fin (Tf) d'événement, ainsi que l'enthalpie (E) sont rapportées puis comparées entre les individus.	132
Figure III-12 Thermogramme caractéristique de la cuticule de <i>Palaemon serratus</i> obtenu par analyse thermogravimétrique. A l'issu du programme, la perte de masse (bleu) ainsi que la première dérivée de la perte de masse (bleu clair) sont analysées. Pour chaque événement, la température où survient la dégradation maximale (T), ainsi que la perte de masse associée (w) sont calculées et comparées entre les individus.....	134
Figure III-13 Principe de mesure par spectrométrie InfraRouge à Transformée de Fourier (IRTF) avec Réflexion Totale Atténuée (RTA).....	135
Figure III-14 Spectres IRTF caractéristiques de la face externe (courbe bleue) et de la face interne (courbe rouge) de la cuticule de <i>Palaemon serratus</i> . La courbe en gras représente la moyenne des spectres analysés tandis que le nuage coloré autour de cette courbe représente l'écart type des spectres analysés.....	137

Publication n°1

Figure 1 Modulation of NAGase activity of <i>P. serratus</i> (expressed in nmol.min ⁻¹) by pH and type of buffer on the last abdominal segment (A) and epidermis (B). ■ corresponds to the mean values for the citrate phosphate buffer (17.5 µmol.L ⁻¹), ● corresponds to the mean values for the phosphate buffer (50 mmol.L ⁻¹), and ▲ corresponds to the mean values for the TRIS buffer (50 mmol.L ⁻¹). Segments correspond to +/- standard deviations. Grey rectangles correspond to pH ranges leading to maximum of NAGase activity.....	154
Figure 2 Modulation of NAGase activity of <i>P. serratus</i> (expressed in nmol.min ⁻¹) by substrate concentration (expressed in µmol.L ⁻¹) on last abdominal segment (A), epidermis (B), uropod (C), telson (D), and periopod (E). Segments correspond to +/- standard deviations. Grey rectangles correspond to the substrate concentration range leading to maximum of NAGase activity.	156
Figure 3 OD increase kinetics of <i>P. serratus</i> NAGase activity (expressed in nmol.min ⁻¹) in the last abdominal segment (A), epidermis (B), uropod (C), telson (D), and periopod (E). Modulation of these kinetics was performed by adding 20 µl (■), 30 µL (●), 40 µL (▲), or 50 µL (*) of enzyme extract. Grey rectangles correspond to the time range leading to the best linearity.....	158
Figure 4 Moulting stage effect on NAGase activity of <i>P. serratus</i> (expressed in nmol.min ⁻¹) for the last abdominal segment (A), uropod (B), telson (C), and periopod (D). Boxes extend from the first to the third quartile, with a bold segment for the median value; the whiskers extend to the most extreme data points, no more than 1.5 times the interquartile range.....	160

Figure 5 Effect of sex on NAGase activity of *P. serratus* (expressed in nmol.min^{-1}) for the last abdominal segment (A), uropod (B), telson (C), and periopod (D). White boxes correspond to females and grey boxes to males. Boxes extend from the first to the third quartile, with a bold segment for the median value; the whiskers extend to the most extreme data points, no more than 1.5 times the interquartile range 161

Publication n°2

Figure 1 Effects of four organic solvents, acetone (a), DMSO (b), ethanol (c) and methanol on NAGase activity of *Palaemon serratus* exposed *in vitro*. For each solvent, results on raw NAGase activity (filled circles) and protein contents of enzyme extract (filled triangles) were displayed along a wide range of solvent concentration. Fitted curve on a distribution represents a significative response to the quadratic trend tests. 187

Figure 2 Specific effects of four compounds, pentoxifylline (a), fenoxycarb (b), dithiocarbamate (c) and RH5849 (d) on NAGase activity of *Palaemon serratus* exposed *in vitro*. As they displayed a specific effect, compounds showed a significative trend test on raw NAGase activity (filled circles), symbolised with a fitted curve, while no effect was observed on protein contents (filled triangles). 189

Figure 3 Non-specific effects of three compounds, zinc (a), cadmium (b) and glyphosate(c) on NAGase activity of *Palaemon serratus* exposed *in vitro*. As they displayed a non-specific effect, the three compounds showed both a significative trend tests on raw NAGase activity (filled circles) and on protein contents (filled triangles). The significance of the trend tests is symbolised for each parameter by a curve fitting to the data distribution (trend test: $p\text{-adjust value} < 0.05$). 191

Figure 4 Atypical effects of two compounds, ibuprofene (a) and diclofenac (b) on NAGase activity of *Palaemon serratus* exposed *in vitro*. These two compounds displaying no effect on raw NAGase activity (filled circles), while significantly altering the protein contents in enzymatic extract (filled triangles). Significance of this latter is represented by a fitted curve on the data distribution (trend test: $p\text{-adjust value} < 0.05$). 191

Publication n°3

Figure 1 Experimental design, which was based on three main steps: (1) the characterisation of the physicochemical properties of the *Palaemon serratus* cuticle, (2) the description of the physicochemical property modulations along the moult cycle, and (3) the characterisation of the degradation of cuticle structure by formic acid. 213

- Figure 2** Typical curves of DSC (a) and TGA (b) analyses on the physicochemical properties of the *Palaemon serratus* cuticle. Analysis of the DSC curve allows the definition of two main events related to the cuticle organisation (grey areas), while the study of TGA results (blue curve) and the first derivative of the sample weight loss (light-blue curve) permits to define five events attributed to cuticle composition. Both techniques detect events linked with bound water evaporation (1) and protein degradation (2), while only TGA results detect chitin degradation (3) and inorganic phase oxidation (4) events. At the end of TGA heating process, P. serratus cuticle is represented by a resting mineral fraction (5)..... 217
- Figure 3** FTIR spectra of the external (blue) and internal (red) faces of the cuticle of the prawn *Palaemon serratus*. Bold blue and red curves correspond to the mean of spectrum values of external and internal cuticle faces respectively (n = 5 for each face). Blue and red clouds correspond to the standard deviation of the spectrum values of each corresponding cuticle face. Spectrum normalisation has been made on the 2 850-3 000 cm⁻¹ area..... 224
- Figure 4** Dynamic of the *Palaemon serratus* cuticle organisation, analysed by DSC technique, along the moult cycle. DSC metrics displayed are onset, peak, end temperatures and enthalpy values of the bound water evaporation (left boxes) and the protein degradation (right boxes). Each box is the result of 4-6 cuticle specimens, except for C stage. These boxes show the data median with the lower and upper box limits symbolizing respectively the first and third quartile distribution..... 226
- Figure 5** Dynamic of the *Palaemon serratus* cuticle composition, analysed by TGA technique, along the moult cycle. TGA metrics displayed are event temperature (white boxes) and sample weight loss (grey boxes). Each box is the result of 4-6 cuticle specimens, except for C stage. These boxes show the data median with the lower and upper box limits symbolizing respectively the first and third quartile distribution. 230
- Figure 6** Composition of the *Palaemon serratus* cuticle exposed to different conditions (i.e. control: n = 10, formic acid 10 %: n = 5, formic acid 100 %: n = 5), using TGA approach. TGA metrics displayed are event temperature (left boxes) and sample weight loss (right boxes). Each box shows the data median with the first and third quartile distribution as lower and upper box limits respectively..... 235
- Figure 7** FTIR spectra of the external (a) and internal (b) faces of the *Palaemon serratus* cuticle, exposed to the tested conditions (control: green curve; formic acid 10 %: blue curve and formic acid 100 %: red curve). Bold curves correspond to the mean of spectrum values (control: n = 5; formic acid 10 %: n = 5; formic acid 100 %: n = 5). clouds around bold curves correspond to the standard deviation of the spectrum values of each corresponding condition. Annotations in green and red correspond to the major changes of bands decreasing and increasing in intensity by cuticle formic acid exposure respectively..... 237

Publication n°4

Figure 1 Characterisation of *Palaemon serratus* cuticle composition in specimens exposed over one moult cycle (from mid premoult to the next D2 moult stage; 21.4 ± 0.5 days) to cadmium and pentoxifylline. TGA metrics displayed are event temperature (left boxes) and sample weight loss (right boxes). Each box shows the data median with the first and third quartile distribution as lower and upper box limits respectively with $n = 3, 5$ and 5 for control, cadmium and pentoxifylline, respectively..... 278

Note n°1

Figure 1 Localisation géographique des sites prospectés en baie de Seine, durant le mois d'octobre 2019..... 301

Figure 2 Activités NAGase mesurées sur le dernier segment abdominal (a) et les uropodes (b) des spécimens sélectionnés de *Palaemon serratus* (i.e. stade de mue entre C et D1') collectés au sein des différents sites de la baie de Seine (i.e. Yport : $n = 6$, Antifer nord : $n = 8$, Antifer sud : $n = 7$, Octeville : $n = 8$, Cap de la Hève : $n = 9$, Longues-sur-mer : $n = 6$)..... 305

Figure 3 Spectres IRTF des faces externes (a) et internes (b) de la cuticule de spécimens de *Palaemon serratus* collectés le long du littoral de la Baie de Seine. Les différentes couleurs de courbes représentent les sites prospectés : jaune = Longues-sur-mer ; vert = Cap de la Hève ; violet = Octeville ; rouge = Antifer sud ; bleu = Antifer nord (cinq sites, $n = 3$ par site). Les courbes en gras correspondent aux moyennes des spectres obtenus pour les différents sites, tandis que les nuages colorés correspondent à l'écart-type associé aux moyennes. 306

Figure 4 Organisation et composition de la cuticule des spécimens sélectionnés de *Palaemon serratus* (i.e. stade de mue entre C et D1'), collectés en baie de Seine (i.e. Antifer nord : $n = 4$, Antifer sud : $n = 5$, Octeville : $n = 7$, Cap de la Hève : $n = 4$, Longues-sur-mer : $n = 4$) et analysées par technique d'ATG. Pour chaque événement, les paramètres analysés sont la température maximale de dégradation (graphiques à gauche) et la perte de masse associée (graphiques à droite)..... 308

Figure 5 Variabilité de la composition cuticulaire des crevettes sélectionnées (i.e. stade de mue de C à D1') selon les sites prospectés en baie de Seine (i.e. Antifer nord : $n = 4$, Antifer sud : $n = 5$, Octeville : $n = 7$, Cap de la Hève : $n = 4$, Longues-sur-mer : $n = 4$). Les différentes couleurs représentent les matériaux composant la cuticule (violet = eau liée, bleu = protéine, vert = chitine, kaki = phase inorganique volatile, rose = fraction minérale restante), tandis que leur hauteur symbolise la proportion de ces matériaux. 311

Note n°2

- Figure 1** Modulations de l'activité de la NAGase chez *Gammarus fossarum* (exprimée en nmol.min^{-1}) en fonction de la concentration de substrat (exprimée en $\mu\text{mol.L}^{-1}$), mesurée sur les organismes sans tube digestif. Les segments correspondent aux écarts types positifs et négatifs. La zone grisée correspond à la gamme de concentration en substrat permettant d'obtenir une activité NAGase maximale. 327
- Figure 2** Cinétiques de densité optique issues de l'activité de la NAGase de *Gammarus fossarum* mesurée sur des organismes sans tube digestif. La variation de ces cinétiques a été fait par ajout de 20 μL (■), 30 μL (●), 40 μL (▲) et 50 μL (*) d'extrait enzymatique. La zone grisée correspond à la zone de linéarité de la réaction de la NAGase. 328
- Figure 3** Variations de l'activité de la NAGase de *Gammarus fossarum* (exprimée en nmol.min^{-1}), mesurée sur des organismes femelles sans tube digestif ($n = 10$), au cours du cycle de mue. Les extrémités de chaque boîte représentent les premiers et troisièmes quartiles des données, la médiane étant représentée par un segment gras. Les points gras représentent les données extrêmes pour chaque distribution. 329
- Figure 4** Variations de l'activité de la NAGase de *G. fossarum* (exprimée en nmol.min^{-1}), mesurée sur des organismes sans tube digestif, selon le genre des individus. Les boîtes blanches et grises représentent respectivement les spécimens femelles et mâles. Les extrémités de chaque boîte représentent les premiers et troisièmes quartiles des données, la médiane étant représentée par un segment gras. Les points gras représentent les données extrêmes pour chaque distribution. 331
- Figure 5** Occurrence de retards de mue observés chez les spécimens *Gammarus fossarum* femelles exposées à des eaux usées traitées. L'exposition a été réalisée sur 16 jours via 6 conditions d'exposition et un contrôle ($n = 15$ par condition). A la fin de l'expérimentation, la condition "amont 100%" ne comptait aucun survivant, l'analyse a, par conséquent, été réalisée sur les conditions restantes. 332
- Figure 6** Mesure d'activité de la NAGase chez les spécimens *Gammarus fossarum* femelles exposées à des eaux usées traitées (i.e. 7 conditions, $n = 15$ par condition). A l'issue de l'exposition de 16 jours, la condition « amont 100% » ne disposait d'aucun gammarus survivant et n'a pas pu être analysée. Pour chaque condition, l'activité de la NAGase est distribuée selon les stades de mue retrouvés chez les organismes exposés : C1 (cercles noirs), C2/D1 (cercles rouges) et D1 (cercles verts). Les stades C2/D1 et D1 représentent les gammarus n'ayant pas de retards de mue, contrairement aux femelles retrouvées au stade C1. 333

Synthèse et discussion

- Figure VIII-1** Evolution du signal des marqueurs de mue développés chez *P. serratus* au cours du cycle de mue (crédit : M.Rollin)..... 357
- Figure VIII-2** Périmètres et choix d'application des marqueurs de mue en tant qu'outils de diagnostic de perturbations du processus de mue chez les crustacés (crédit : M. Rollin). 366

Liste des tableaux

Introduction

Synthèse bibliographique

Tableau II-1 Appellation attribuée aux différentes couches cuticulaires selon les différents auteurs (d'après Aiken, 1980).....	61
Tableau II-2 Liste des composés chimiques induisant l'altération des descripteurs individuels de la mue chez les crustacés (adapté de Zou, 2020).	85
Tableau II-3 Utilisation des ecdystéroïdes en tant que marqueur d'altération de mue chez les crustacés	94
Tableau II-4 Utilisation de l'activité de la chitinase en tant que marqueur d'altération de la mue chez les crustacés.	99
Tableau II-5 Utilisation de l'activité de la NAGase lors d'exposition <i>in vivo</i> de crustacés à des contaminants.....	100
Tableau II-6 : Bilan des avantages et inconvénients des différents marqueurs de mue dans une approche de diagnostic de perturbation sur des populations de crustacés présentes <i>in natura</i>	105

Publication n°1

Table 1 Numbers of <i>P. serratus</i> specimens (for the epidermis, last abdominal segment, and periopods) or pools (for uropods and telson) used to determine the modulation of the NAGase activity induced by the moult cycle and sex. Three uropods and two telson specimens were pooled to produce a biological replicate	152
Table 2 Summary of the optimised protocols obtained on the epidermis, last abdominal segment, periopods, uropods, and telson of <i>P. serratus</i> specimens	153

Publication n°2

Table 1 List of the 19 compounds selected, their properties and the range of concentrations used during the <i>in vitro</i> assay	183
Table 2 Summary of the solvent effects on NAGase activity of <i>Palaemon serratus</i> exposed <i>in vitro</i> . For each parameter, the <i>p</i> -value of the trend test attributed to the fitted model is reported, as well as the calculated 10%, 20% and 50% Inhibition Concentration (or ENhancement Concentration when number are coloured in red).	186

Table 3 Summary of the compound effects on the NAGase activity of <i>Palaemon serratus</i> exposed <i>in vitro</i> . For each parameter, the <i>p</i> -value of the trend test attributed to the fitted model is reported, as well as the calculated 10%, 20% and 50% Inhibition Concentration (or ENhancement Concentration when number are coloured in red).....	188

Publication n°3

Table 1 Comparison of cuticle composition between different crustacean species.	220
Table 2 Dynamic of the major element proportion measured on a pool of resting mineral fractions of the cuticles of <i>Palaemon serratus</i> specimens of each moult stage (8 moult stages, 1 pool per moult stage, 5 specimens per pool).....	229
Table 3 Proportion of major elements found with resting mineral fractions of the exposed cuticles (i.e. control: n = 10; formic acid 10 %: n = 5; formic acid 100 %: n = 5) of <i>Palaemon serratus</i> . Bold values refer to high difference compared to the control group.....	234

Publication n°4

Table 1 Nominal and measured concentrations of cadmium and pentoxifylline in i) water samples following the medium renewals (T0), after 48h of contamination (T48 h) and ii) abdomen tissues of <i>Palaemon serratus</i> exposed over 1 moult cycle (i.e. from mid premoult to the next D2 moult stage; 21.4 ± 0.5 days). Measures were performed on simplicite on matrice homogenates	275
Table 2 Lipid, protein and glycogen contents (mean ± standard deviation, n = 6, 10, 10 for control, pentoxifylline and cadmium prawns respectively) found in hepatopancreas of <i>Palaemon serratus</i> specimens exposed to the tested solutions (i.e. control, cadmium, pentoxifylline) over one moult cycle (from mid premoult to the next D2 moult stage; 21.4 ± 0.5 days). Difference in letters refers to significant difference between the tested conditions.....	276
Table 3 The NAGase activity (expressed in nmol.min ⁻¹ , mean ± standard deviation, n= 6, 10, 10 for control, pentoxifylline and cadmium prawns respectively) found in uropods and last abdominal segment of <i>Palaemon serratus</i> specimens exposed to the tested solutions (i.e., control, cadmium, pentoxifylline) over one moult cycle (from mid premoult to the next D2 moult stage; 21.4 ± 0.5 days).	276
Table 4 Proportion of major elements found with resting mineral fractions of the cuticles of <i>Palaemon serratus</i> specimens exposed to cadmium and pentoxifylline, over one moult cycle (i.e. from mid premoult to the next D2 moult stage; 21.4 ± 0.5 days), in comparison to the control condition. Data are presented as measured simplicite performed from a pool of TGA ashes (control: n = 3; pentoxifylline: n = 6; cadmium: n = 6). Bold values show a high difference compared to SW control.	279

Note n°1

Table 1 Caractérisation du niveau de qualité des sites prospectés au regard de l'indice de contamination du biote (calculé sur la base des données de bioaccumulation des bivalves publiées par le ROCHH pour l'année 2015-2016 ; selon Erraud *et al.* 2018b) et des niveaux de génotoxicité mesurés sur spermatozoïdes de crevettes durant l'automne 2019 301

Note n°2

Synthèse et discussion

Tableau VIII-1 Variabilité des mesures des activités NAGase réalisées sur le dernier segment abdominal et les uropodes de *Palaemon serratus*, déterminée selon les différentes manipulations réalisées au cours des travaux de thèse. La variabilité des mesures est exprimée selon le coefficient de variabilité calculé pour chacune des manipulations réalisées au cours de cette thèse, plus particulièrement les individus en D2 sélectionnés pour l'optimisation méthodologique (n = 10), utilisés en contrôle lors de l'exposition *in vitro* (n = 19 homogénats pour le dernier segment) et en tant que témoin lors du bioessai *in vivo* (n = 10). 351

Tableau VIII-2 Variabilité des métriques mesurées relatives aux deux événements détectés par analyse DSC sur la cuticule de *Palaemon serratus*. La variabilité des mesures est exprimée selon le coefficient de variabilité calculé pour chacune des manipulations réalisées au cours de cette thèse, plus particulièrement les individus en D2 sélectionnés pour l'optimisation méthodologique (n = 10) et en tant que témoin lors du bioessai *in vivo* (n = 10). 353

Tableau VIII-3 Variabilité des métriques mesurées relatives aux quatre événements détectés par analyse ATG sur la cuticule de *Palaemon serratus*. La variabilité des mesures est exprimée selon le coefficient de variabilité calculé pour chacune des manipulations réalisées au cours de cette thèse, plus particulièrement les individus en D2 sélectionnés pour l'optimisation méthodologique (n = 5) et en tant que témoin lors du bioessai *in vivo* (n = 5). 354

Liste des annexes

Annexe 1	Liste non exhaustive des études mesurant des marqueurs sub-individuels au laboratoire en utilisant les crevettes Palaemonidae.	439
Annexe 2	Liste non exhaustive des études mesurant des marqueurs individuels au laboratoire lors d'exposition aiguës en utilisant les crevettes Palaemonidae.	444
Annexe 3	Liste non exhaustive des études mesurant des marqueurs individuels au laboratoire lors d'expositions chroniques en utilisant des crevettes Palaemonidae	451
Annexe 4	Liste des expérimentations réalisées in vitro sur l'interaction entre contaminant et activité NAGase.....	463
Annexe 5	Table d'annotation des principaux groupements chimiques identifiables sur un spectre infrarouge. L'intensité d'un pic peut être forte (F), moyenne (m) ou fine (f).....	467

I. Introduction générale

Depuis la première moitié du XXème siècle, le secteur de la chimie de synthèse connaît une importante et continuelle expansion, résultant en un relargage chronique de molécules dans l'écosphère. Ainsi, au cours de l'année 2021, le système américain d'enregistrement de molécules chimiques de la Société Américaine de Chimie, recensait plus de 175 millions de substances organiques et inorganiques, soit respectivement 36 millions de plus qu'en 2018 et 91 millions de plus par rapport à 2014 (<https://www.support.cas.org>). A cette immense diversité s'ajoute l'utilisation indispensable de ces molécules dans chacun de nos gestes du quotidien. Ainsi, sous l'égide du progrès et de l'innovation soutenus par la chimie de synthèse, les activités anthropiques issues des secteurs agricoles, industriels, urbains ou encore des activités domestiques deviennent alors des sources de contaminations chroniques et délibérées. La gravité de cette contamination est à la fois amplifiée par l'explosion démographique humaine survenant au cours de ces dernières décennies, exacerbant le taux d'émission des molécules utilisées, mais aussi par la distribution et la rémanence de chacune des molécules émises. Ainsi, si certains composés chimiques n'engendrent qu'une pollution locale, d'autres peuvent être transportés par les voies terrestres, aquatiques ou aériennes sur divers écosystèmes, pouvant même être mesurés à des niveaux importants plusieurs années après l'arrêt de leur émission et/ou commercialisation.

Face à cette pollution chronique et délibérée, les milieux aquatiques suscitent encore à ce jour une attention toute particulière. En effet, les milieux aquatiques regroupent les écosystèmes les plus productifs en termes de biens et de fonctions écosystémiques (Costanza *et al.*, 1997 ; Costanza *et al.* 2014). Parallèlement, en raison de phénomènes tels que les précipitations et les ruissellements, différents composés chimiques présents ou transportés dans tout compartiment de l'écosphère sont susceptibles d'être acheminés vers les milieux aquatiques, faisant de ces derniers, en particulier les écosystèmes marins, un réceptacle ultime pour de nombreux contaminants. Ce constat a conduit à la prise de conscience des pouvoirs publics de la fragilité des milieux aquatiques, favorisant la mise en place *i)* d'études scientifiques visant à déterminer les effets des contaminants sur la biodiversité dans un contexte de surveillance environnementale, et *ii)* de plans d'action visant à la restauration et la

remédiation des milieux. Sur l'ensemble des études toxicologiques réalisées dans ce contexte, une grande majorité ont été menées sur quelques taxons modèles appartenant aux bivalves et aux poissons. Bien que présents dans les écosystèmes étudiés, ces taxons ne sont pas intégrateurs de la représentativité des diversités taxonomiques et fonctionnelles présentes au sein de ces milieux. Ainsi, le simple suivi de poissons ou de bivalves dans le cadre de l'évaluation de l'état de santé de la faune sauvage, ne permet pas d'avoir un diagnostic représentatif et protecteur vis-à-vis des nombreux autres taxons (Chapman, 2002 ; Galloway *et al.* 2004). En ce sens, l'étude de taxons ayant une meilleure représentativité de la sensibilité aux contaminants et des fonctions réalisées au sein de l'écosystème permettrait de pallier pour partie le manque de représentativité critiqué.

Dans ce contexte, le groupe des Crustacés forment un ensemble de taxons intéressant à étudier. Ce groupe, sous embranchement des Arthropodes dont il est le seul représentant en milieu marin, compte plus de 67 000 espèces recensées (LeBlanc, 2007 ; Ah Yong *et al.* 2011). Outre la richesse taxonomique, les crustacés occupent également l'ensemble des écosystèmes terrestres et aquatiques, à l'exception des milieux extrêmement arides (Waterman & Chace, 1960). Toutefois, la richesse taxonomique des crustacés s'exprime avant tout dans les milieux aquatiques, particulièrement dans les écosystèmes marins. Au sein de ces milieux, les crustacés ont un rôle écologique important, assurant à la fois le maintien et le développement d'autres espèces (*e.g.* proie de nombreuses espèces de poissons et d'oiseaux, substrat et refuge pour des organismes filtreurs sessiles ; Boudreau and Worm, 2012), mais aussi la réalisation de fonctions écosystémiques (*e.g.* régulation de la biomasse de phytoplancton, dégradation et redistribution de la matière organique). Par ailleurs, certaines de ces espèces sont présentes en forte abondance (Kelly *et al.* 2003 ; Atkinson *et al.* 2009), formant une importante biomasse susceptible d'être exploitée par les activités de pêche locales et industrielles grandissantes (Campillo, 1979 ; Anderson *et al.* 2011). En conséquence, pour leur représentativité et leur abondance, leurs rôles écologiques et économiques, ainsi que le développement des connaissances sur la biologie des espèces, leurs potentiels de captivité et d'élevage en conditions contrôlées, de nombreuses espèces de crustacés suscitent un grand intérêt dans le domaine de l'écotoxicologie et le suivi de l'état de santé des milieux aquatiques. Depuis les dernières décennies, les crustacés ont alors été de plus en plus utilisés lors d'études toxicologiques, à l'image des daphnies (*Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia dubia*), espèces emblématiques d'eau douce utilisées principalement lors d'expérimentations en laboratoire (Tarazona *et al.* 2014 ; Bownik, 2017). Toutefois, l'étude d'effets *in natura* de la contamination chimique sur des populations sauvages

de crustacés restent à ce jour peu réalisée. En effet, s'il est possible de citer les gammaridés comme espèces modèles des milieux dulçaquicoles dont l'utilisation lors d'études toxicologiques *in situ* est de plus en plus fréquente (Chaumot *et al.* 2015), aucun modèle semblable n'est à noter concernant les milieux marins, dont l'évaluation de l'état de santé ne fait l'objet que d'études ponctuelles.

A l'instar des arthropodes, le sous-embranchement des crustacés se distingue par des particularités physiologiques notoires. Ces derniers disposent d'un système neuroendocrinien complexe, unique chez les invertébrés, permettant d'assurer des fonctions similaires à celles des vertébrés (osmorégulation, croissance, reproduction) mais aussi des traits uniques (Chang, 1995 ; Verslycke *et al.* 2004 ; LeBlanc, 2007). Parmi ces traits uniques, la mue représente une fonction physiologique essentielle, caractéristique des ecdysozoaires, dont le représentant majeur est l'embranchement des Arthropodes. Selon Aiken (1980), « *le terme mue désigne l'ensemble des changements physiologiques et morphologiques impliqués dans la préparation de l'exuvie, ainsi que dans le retour à un état stable* ». Ainsi, la mue est un processus physiologique fondamental qui permet à un organisme confiné dans un exosquelette de s'extirper de celui-ci temporairement afin d'accomplir d'autres grandes fonctions telles que la croissance et la reproduction. Ce processus intervient de manière régulière au cours du cycle de vie des crustacés, formant un cycle rythmant leur développement. Le cycle de mue des crustacés a pour la première fois été décrit par Drach (1939), comme une succession d'événements regroupés en trois phases : la postmue, l'intermue et la prémue, toutes trois définies par l'apparition d'événements tissulaires majeurs. L'ensemble et la succession de ces événements sont réalisés sous le contrôle de mécanismes de régulation hormonale complexes et partiellement décrits (Song *et al.* 2017). La régulation de la mue est alors permise par l'action et l'interaction de nombreux acteurs moléculaires, qui sont autant de cibles potentielles vis-à-vis de l'action des contaminants présents dans l'environnement. Parmi ceux-ci, de nombreux ont été identifiés comme étant susceptibles d'altérer la régulation voire le bon déroulement de la mue chez les crustacés (LeBlanc, 2007 ; Song *et al.* 2017 ; Zou, 2020). Ces observations sont exacerbées par le manque de recul sur la condition des crustacés présents en milieu naturel. En effet, la majorité des études portant sur la qualité de la mue ont été réalisées *via* la mise en place de bioessais ponctuels, en conditions contrôlées, en se basant sur des marqueurs macroscopiques associés à la croissance et n'étant interprétables qu'en maîtrisant totalement l'exposition des organismes. En cela, les outils existants ne permettent pas d'émettre de réels diagnostics quant à l'état de la mue des populations présentes *in natura*. Ce constat est appuyé

par Zou (2005) qui relatait les perturbations de la mue par des xénobiotiques comme une forme silencieuse de perturbation endocrine, soulignant alors le manque de méthodologie adaptée au suivi et à la détection d'altérations du processus de mue sur des organismes endémiques des milieux aquatiques.

En ce sens, l'objectif de ce travail de thèse consiste à développer des marqueurs susceptibles d'indiquer des altérations de mue chez les crustacés, applicables lors d'approches en conditions contrôlées mais aussi en condition *in situ*. Pour ce faire, la mise en place des marqueurs et leur validation toxicologique ont été réalisées sur une espèce emblématique des milieux marins européens, la crevette rose *Palaemon serratus* (Pennant, 1777), présentant de grands intérêts dans l'écotoxicologie et la biosurveillance des milieux marins. Afin de répondre pleinement à cet objectif, le travail de thèse s'articule autour des problématiques suivantes :

- Pourquoi et comment estimer la qualité de la mue chez *P. serratus* ?

Cette étape initiale consistait à déterminer la pertinence de l'espèce *P. serratus* dans un contexte d'écotoxicologie, mais aussi à travers les possibles connaissances disponibles sur le déroulement de son cycle de mue et des mécanismes y intervenant. Cette compréhension était indispensable afin de sélectionner des marqueurs intervenant dans le processus de mue, relativement simples à analyser et à déployer, et ayant un potentiel intéressant dans le suivi d'altérations de mue. Une fois les outils sélectionnés, ceux-ci ont été adaptés à l'espèce et optimisés afin d'obtenir une réponse distincte et robuste. La phase d'optimisation des outils est succédée d'une analyse de la variation de la réponse imputable aux facteurs intrinsèques de l'organisme (*i.e.* stade de mue, localisation morphologique de l'échantillon considéré, sexe). L'intégration de ces facteurs potentiellement confondant permettra alors de déterminer un seuil physiologique au-delà duquel une altération de mue pourra être décelée.

- Quel est le pouvoir de discrimination des outils développés ?

Au regard des seuils de variabilité naturelle estimés précédemment, les outils développés ont été déployés lors d'expositions *in vivo* d'organismes en conditions contrôlées à des contaminants modèles. Ces derniers induisant des effets directs sur des acteurs moléculaires intervenant dans la mue, le pouvoir intégrateur des outils a été évalué. Parallèlement, des expérimentations *in vitro* ont été menées afin de déterminer le potentiel de différents xénobiotiques à induire un impact direct sur les marqueurs de mue nouvellement développés.

- Quelle est la qualité de la mue sur des populations sauvages se développant au sein de sites présentant des contrastes de contamination chimique ?

Le double objectif de cette problématique est de *i)* vérifier la capacité des outils développés à diagnostiquer *in natura* de potentielles altérations de mue induites par les contaminants présents dans le milieu environnant, et *ii)* réaliser l'état de la qualité de mue des populations de *P. serratus* présentes en baie de Seine.

Ce travail de thèse s'articule en neuf chapitres. Le chapitre I propose un bilan des connaissances sur la famille des Palaemonidae, plus particulièrement l'un de ses principaux représentants européens en milieu marin : *P. serratus*, et leur utilisation en écotoxicologie. Ce chapitre se poursuit sur le savoir acquis sur le cycle de mue des crustacés, son déroulement, les mécanismes de régulation, ainsi que les paramètres environnementaux et xénobiotiques étant susceptibles d'influencer et d'altérer le processus de mue. Le chapitre II permet de visualiser de manière synthétique les méthodes et expérimentations mises en place au cours de ce travail. Le chapitre III met en lumière les principales méthodes et expérimentations utilisées au cours de ces travaux. Les chapitres IV à VII se focalisent, sous formes d'articles et de notes, sur le développement des marqueurs de mue sélectionnés, la caractérisation et l'optimisation méthodologiques de leur réponse, l'évaluation de l'influence des facteurs intrinsèques puis la capacité de détection d'altérations de mue à travers une double approche laboratoire/terrain. Les chapitres VIII et IX offrent une lecture transversale des résultats obtenus, avant d'émettre une conclusion générale, ponctuée par l'élaboration de perspectives majeures.

II. Synthèse bibliographique

Le premier chapitre de ce manuscrit retranscrit la synthèse bibliographique des connaissances aux crevettes Palaemonidae, ainsi qu'au fonctionnement et la perturbation du cycle de mue chez les crustacés. Celui-ci s'articule en trois parties distinctes.

La première partie est consacrée à la présentation de la famille Palaemonidae ainsi qu'à la pertinence de considérer ces modèles en tant qu'espèces sentinelles¹ dans le domaine de la biosurveillance environnementale. Pour cela, une focalisation sur l'espèce emblématique des eaux marines d'Europe, *Palaemon serratus*, son écologie et sa biologie sont présentées. Enfin, l'utilisation des Palaemonidae en écotoxicologie et sa représentativité sont discutées.

La deuxième partie s'articule autour des connaissances établies sur la mue des crustacés, notamment sur le fonctionnement de ce processus physiologique et la composition de la cuticule, matériau directement impliqué par la mue.

La troisième partie se focalise sur l'altération de la mue par des contaminants, et sur les outils disponibles permettant de détecter les perturbations de celle-ci. Pour cela, un état des lieux des connaissances relatives aux perturbations de la mue est réalisé. De ce diagnostic général, la pertinence des marqueurs de mue, traditionnellement caractérisés et utilisés pour suivre le déroulement du cycle de mue, en tant qu'indicateur de perturbation est discutée. Cette discussion se concentre également sur la possibilité d'utiliser de tels indicateurs en conditions naturelles afin de détecter des altérations de mue sur des populations sauvages.

¹ D'après la définition d'espèce sentinelle décrite par Berthet (2015)

2.1. Utilisation des Palaemonidae en écotoxicologie et pertinence en tant qu'espèces sentinelles.

Depuis la naissance de l'écotoxicologie et de la biosurveillance environnementale, la grande majorité des études sur les écosystèmes aquatiques a été basée sur un petit nombre d'espèces, principalement de bivalves et de poissons. Si ces taxons présentent de bonnes capacités à accumuler les xénobiotiques présents dans le milieu, et par conséquent représentent de potentielles espèces sentinelles (Beeby, 2001), des questionnements quant à leur représentativité écologique et leur sensibilité aux composés toxiques ont commencé à émerger dans les années 2000 (Chapman, 2002 ; McCarthy *et al.* 2002 ; Galloway *et al.* 2004). Dans un objectif d'évaluation global de l'impact de la contamination des milieux aquatiques sur la faune sauvage, une évaluation basée uniquement sur de tels taxons semble en effet peu extrapolable et protectrice pour de nombreuses autres espèces, notamment d'invertébrés aquatiques. En ce sens, le groupe des crustacés, principal représentant du clade des ecdysozoaires dans les milieux aquatiques et composé de plus de 67 000 espèces réparties sur l'ensemble du globe (Waterman & Chace Jr, 1960 ; Ahyong *et al.* 2011) reste encore peu étudié dans le cadre de la biosurveillance environnementale des milieux aquatiques, en particulier en milieu marin, en dépit de *i*) son importante représentativité au sein du règne animal ; *ii*) du rôle clé de ses représentants au sein des écosystèmes aquatiques (Boudreau & Worm, 2012) que ce soit dans les chaînes trophiques ou différents processus écosystémiques ; *iii*) de l'intérêt économique de certaines de ses espèces ou encore *iv*) de ses singularités physiologiques (*e.g.* importance de la mue).

A ce jour, deux familles distinctes de crustacés sont couramment utilisées en tant qu'espèces modèles en écotoxicologie en milieu continental : les Daphniidae et les Gammaridae. Ainsi, les Daphniidae, à l'image de *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* et *Ceriodaphnia dubia*, trois espèces de cladocères d'eau douce, sont utilisées depuis les années 1970, essentiellement dans des essais de toxicités aiguës et chroniques en conditions contrôlées de laboratoire (Tarazona *et al.* 2014 ; Brownik 2017). Le choix de ces organismes s'explique notamment par leur facilité de maintien et d'élevage, ainsi que les connaissances avancées de leurs cycles de vie et de reproduction. Des tests d'écotoxicité réglementés, en exposition aiguë (ISO 6341, OCDE 202) comme chronique (ISO 10706, OCDE 211), ont ainsi été développés chez ces espèces. Plus récemment, les Gammaridae, représentés principalement par les espèces

d'eau douce *Gammarus pulex* et *Gammarus fossarum* ont également été proposés comme des crustacés pertinents pour la biosurveillance des eaux douces (Peschke *et al.* 2014 ; Chaumot *et al.* 2015). Les gammares ont à la fois été utilisés dans des essais d'écotoxicité en condition contrôlée de laboratoire (*e.g.* Felten *et al.* 2008 ; Xuereb *et al.* 2009 ; Geffard *et al.* 2010), mais aussi en conditions naturelles *via* l'utilisation d'approches passives (*e.g.* Gross *et al.* 2001 ; Peschke *et al.* 2014) ou actives (*e.g.* Maltby *et al.* 2002 ; Coulaud *et al.* 2011 ; Lacaze *et al.* 2011). Les gammares représentent ainsi actuellement des espèces sentinelles couramment utilisées par les acteurs opérationnels de la biosurveillance des milieux dulçaquicoles aussi bien *via* des mesures de bioaccumulation (Norme AFNOR XP T90-721 2019) que *via* des bioessais d'écotoxicité basés sur la mesure de différents biomarqueurs (Norme AFNOR XP T90-722 2020).

Cependant, si des espèces sentinelles de crustacés ont été identifiées et utilisées pour la biosurveillance environnementale en eau douce, aucun équivalent n'est encore disponible en milieu marin. Depuis quelques années, les crevettes Palaemonidae commencent à être proposées comme des espèces sentinelles pertinentes pour la biosurveillance des milieux marins (Key *et al.* 2006 ; Erraud *et al.* 2018, 2019 ; Araujo *et al.* 2020).

Selon Berthet (2015), la considération d'une espèce en tant qu'espèce sentinelle déployable en condition naturelle est déterminée par plusieurs critères tels que *i*) la sédentarité de l'espèce par rapport au site étudié, *ii*) sa facilité d'identification, de capture et de maintien en élevage, *iii*) une taille de population suffisante pour permettre la collecte d'organismes, *iv*) une distribution de population large et connue afin de permettre la comparaison inter-sites, *v*) une longévité suffisamment élevée nécessaire à la réalisation du suivi chronique de contaminations, *vi*) des relations doses-effets établis au cours d'études d'écotoxicité et *vii*) des connaissances établies sur la biologie et écologie de l'espèce, déterminant ainsi la variabilité inter-individuelle des réponses d'intérêt suivies et la représentativité de l'espèce au sein de son écosystème. Ainsi, en se basant sur l'ensemble de ces critères, ce chapitre propose d'évaluer la pertinence des Palaemonidae en tant qu'espèces sentinelles, tel qu'énoncé par Berthet (2015), dans un contexte de biosurveillance environnementale, en se focalisant particulièrement sur l'espèce qui a été utilisée durant ce travail doctoral, la crevette bouquet *Palaemon serratus*.

2.1.1. Les Palaemonidae : une famille de crustacés diversifiée et présente dans tous les milieux

La famille des Palaemonidae est une famille de crustacés classée selon la systématique suivante : **embranchement** : Arthropodes ; **super-classe** : Crustacé ; **classe** : Malacostracés ; **sous-classe** : Eumalacostracés ; **super-ordre** : Eucaridés ; **ordre** : Décapodes ; **sous-ordre** : Pleocyemate ; **infra-ordre** : Caridea. Elle regroupe 137 genres répartis en deux sous-familles : les Palaemoninae et les Pontoninae (Ahyong *et al.* 2011). Le régime et comportement alimentaire est le principal facteur permettant de distinguer ces deux sous-familles. Si les Pontoninae sont détritivores, les Palaemoninae sont préférentiellement carnivores, mais pouvant devenir opportunistes selon le type de nourriture disponible (Holthuis, 1959). Les Palaemonidae sont présents dans la majorité des milieux aquatiques, avec davantage d'espèces marines et saumâtres que continentales, et sont généralement caractérisés par une diversité spécifique importante (Bauer, 2004 ; De Grave *et al.* 2008 : **Figure II-1**).

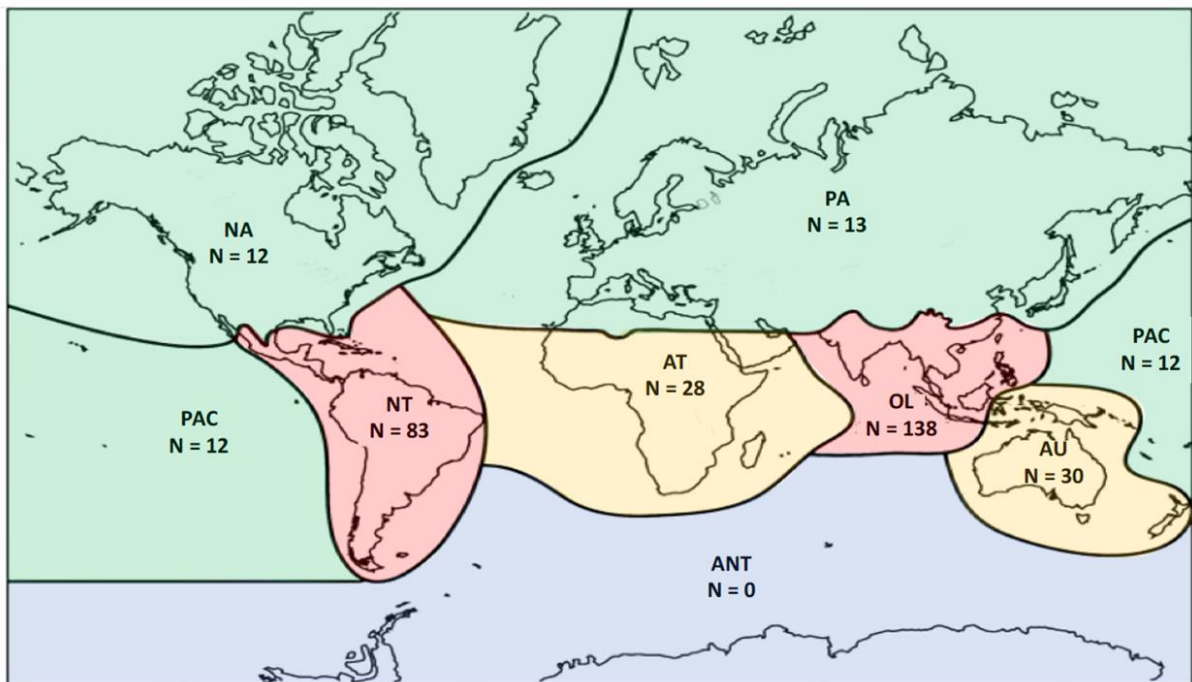


Figure II-1 Répartition géographique d'espèces de Palaemonidae dans le monde, selon les régions biogéographiques. ANT : Antarctique, AT : Afrotropicale, AU : Australasienne, NA : Néarctique, NT : Néotropique, OL : Orientale, PA : Paléarctique, PAC : Iles océaniques du Pacifique. N représente la richesse spécifique de Palaemonidae recensés (d'après De Grave *et al.* 2008).

La sous-famille des Pontoninae est composée d'espèces vivant principalement dans les récifs coralliens qui ont globalement été moins étudiées que les espèces de Palaemoninae. La sous-famille des Palaemoninae regroupe 21 genres connus (De Grave & Fransen, 2011) dont le représentant majeur, en termes de richesse spécifique et d'abondance, est le genre *Macrobrachium* (Ashelby *et al.* 2012). Il comporte notamment plusieurs espèces à intérêt économique, soutenant la pêche commerciale et l'aquaculture (García-Guerrero *et al.* 2013). Les crevettes de ce genre sont prisées en aquaculture en raison de leur facilité d'élevage et de leur grande taille (les plus grands spécimens de *M. rosenbergii* pouvant atteindre une longueur totale de 30 cm). Néanmoins, le genre *Macrobrachium* est restreint aux milieux aquatiques dulçaquicoles et saumâtres (De Grave *et al.* 2008 ; Jose & Harikrishnan, 2019). De plus, la distribution géographique du genre *Macrobrachium* est faible, limitée principalement aux régions tropicales et sub-tropicales (Jayachandran, 2001). Plus ubiquistes et présents dans les milieux aquatiques marins, saumâtres et d'eau douce, les genres *Palaemonetes* et *Palaemon* sont également bien représentés (Holthuis, 1952), faisant de ces crevettes des organismes intéressants à étudier.

Dans les eaux européennes, les genres *Palaemonetes* et *Palaemon* sont largement représentés (Gonzalez-Ortegón & Cuesta 2006), avec 6 espèces du genre *Palaemon* : *P. adspersus* (Rathke, 1837) ; *P. elegans* (Rathke, 1837) ; *P. longirostris* (H. Milne-Edwards, 1837) ; *P. xiphias* (Risso, 1816), l'espèce invasive *P. macrodactylus* (Rathbun, 1902) et l'espèce modèle de ce travail doctoral ***P. serratus*** (Pennant, 1777), et 4 espèces du genre *Palaemonetes* : *P. antennarius* (H. Milne-Edward, 1837) ; *P. turcorum* (Holthuis, 1961) ; *P. varians* (Leach, 1814) et *P. zariquieyi* (Sollaud, 1939). En baie de Seine, les crevettes Palaemonidae sont représentées par quatre espèces : *P. serratus* et *P. elegans*, toutes deux vivant dans les eaux marines, *P. longirostris*, espèce estuarienne, ainsi que *P. varians*, espèce naviguant entre les eaux marines et estuariennes (**Figure II-2**).

P. serratus (Pennant 1777, **Figure II-3**), anciennement nommée *Leander serratus* est aussi retrouvée dans le langage courant sous l'appellation de crevette rose, crevette bouquet ou encore bouquet commun. Elle présente une large distribution géographique en Europe et au-delà. Elle est observée du Danemark et des côtes de la mer Baltique jusqu'au nord-ouest des côtes Atlantiques, en Irlande et le long de la façade Atlantique jusqu'en Mauritanie, ainsi qu'au détroit de Gibraltar, au sein de la mer Méditerranée et de la mer Noire (Forster, 1951 ; Holthuis, 1959 ; Campillo, 1979 ; Guerao & Ribera, 2000 ; Huxley, 2011 ; Haig *et al.* 2014).

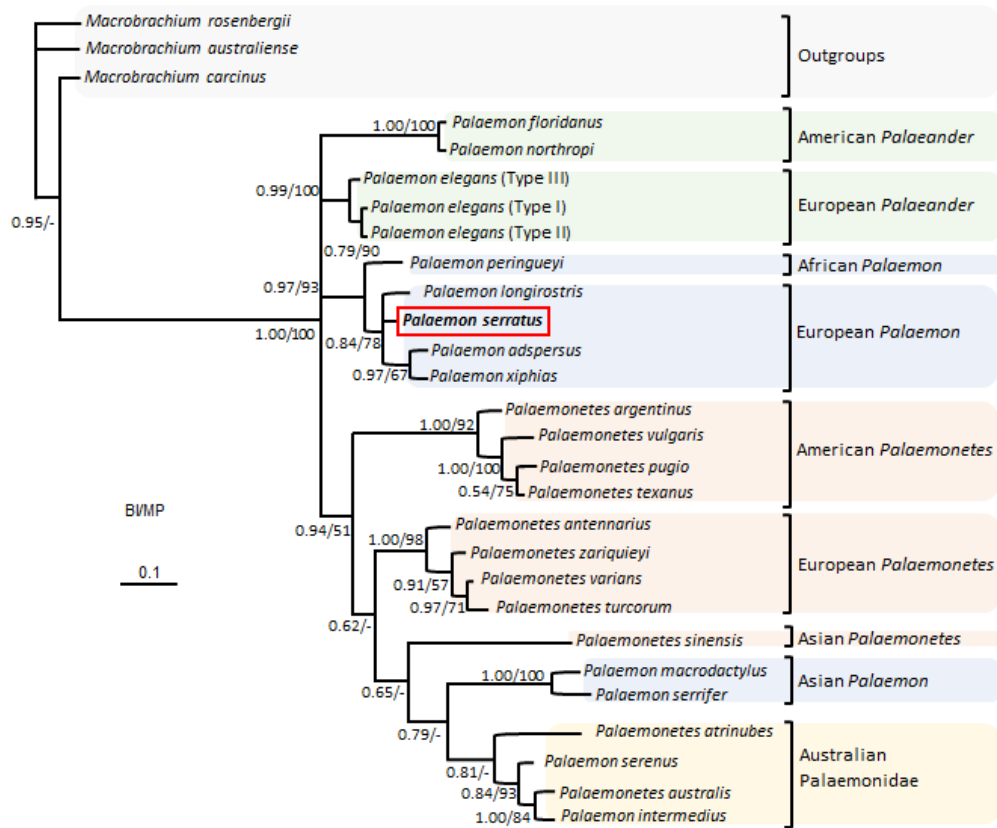


Figure II-2 Relations phylogénétiques des espèces représentatives de Palaemonidae des genres *Macrobrachium*, *Palaemon* et *Palaemonetes*, établies sur la comparaison de 536 pb du gène de l'ARNr 16S. Les nombres à proximité des nœuds indiquent les probabilités postérieures bayésiennes et le support boostmap utilisant le maximum de parcimonie (d'après Cuesta et al. 2012)



Figure II-3 Photographie d'une crevette bouquet *Palaemon serratus* en milieu naturel (source : f.sichel@unicaen)

En France, on la retrouve sur la grande majorité du littoral, que ce soit en Manche, sur les côtes Atlantiques ou en Méditerranée (**Figure II-4**). Récemment, des fractures phylogénétiques entre les différentes populations, notamment entre les individus de la zone Atlantique et ceux présents en mer Méditerranée, ont été révélées, pouvant à terme mener à un clivage spécifique (Weiss *et al.* 2018 ; Perina *et al.* 2019 ; González-Castellano, 2020).

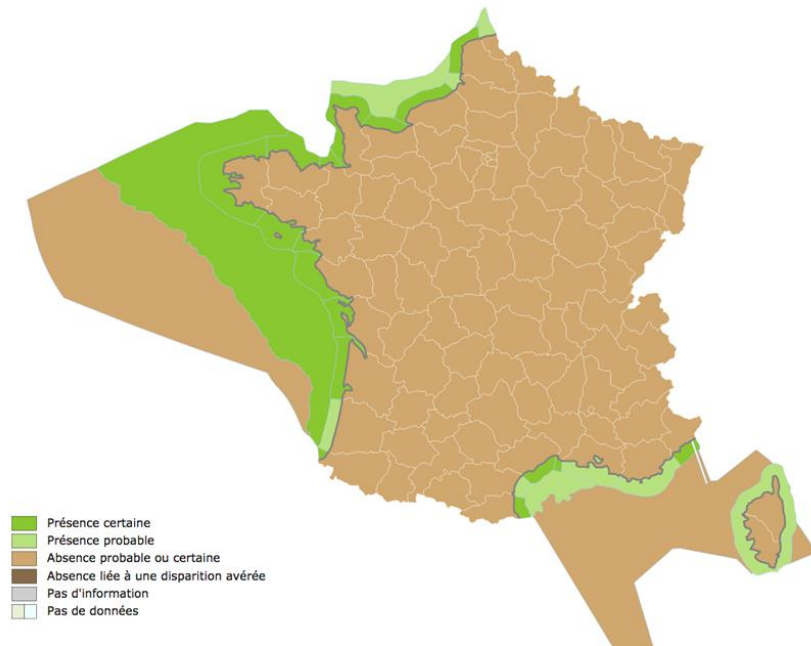


Figure II-4 Distribution des populations de crevette bouquet *Palaemon serratus* le long des côtes françaises (source : https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/18410)

2.1.2. Biologie et écologie

2.1.2.1. Morphologie et critères de détermination

A l'instar des autres crustacés, *P. serratus* et les Palaemonidae de manière générale présentent un exosquelette chitineux recouvrant l'ensemble du corps, et séparé en deux régions distinctes : le céphalothorax et l'abdomen, pour un total de sept segments le long de l'axe antéro-postérieur (**Figure II-5**). Le céphalothorax forme une structure rigide, composée par le premier segment, qui protège la majorité des organes internes et se prolonge sur la partie antérieure d'une extension tégumentaire appelé le rostre. Ce dernier est pourvu de dents dorsales et ventrales, présentes aussi bien en région pré et post-orbitale. La succession des six autres segments composent l'abdomen, structure flexible et essentiellement composé de muscles, dont l'extrémité postérieure est formée par le telson. Sous le céphalothorax, les Palaemonidae disposent de cinq paires de périopodes, assurant la locomotion par marche et la

préhension, tandis que cinq paires de pléopodes sont présentes sous les cinq premiers segments de l'abdomen, assurant la locomotion natatoire. Le dernier segment postérieur de l'abdomen soutient les uropodes, utilisés lors de la propulsion, en complément des pléopodes (Holthuis, 1959 ; Bauer, 2004).

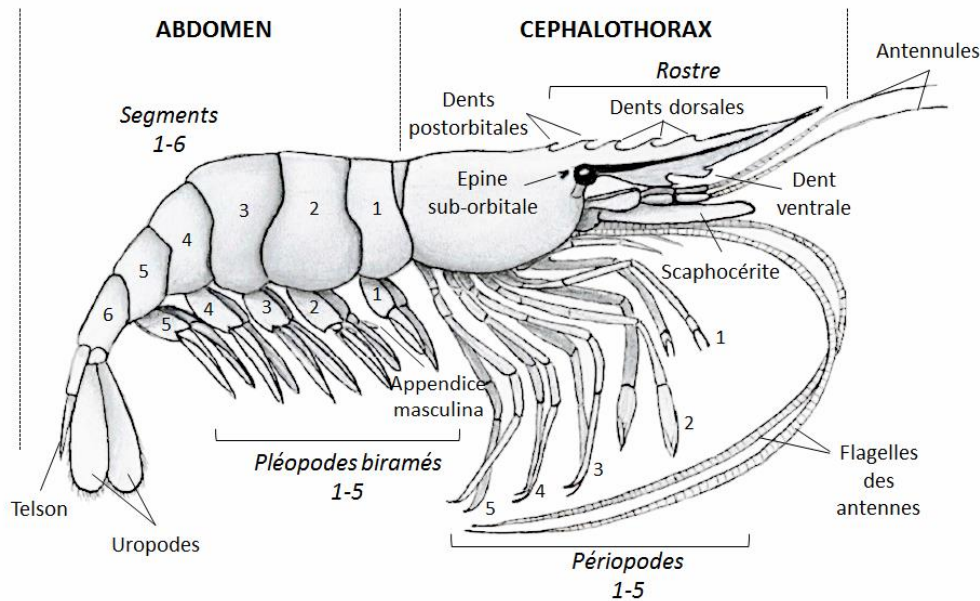


Figure II-5 Description morphologique d'un Palaemonidae en vue latérale (crédit : A. Duflot)

Si la morphologie des Palaemonidae est relativement commune, les organismes composant ce groupe disposent de tailles et de couleurs diversifiées, permettant généralement une identification rapide des espèces. Toutefois, en présence d'organismes ayant de fortes ressemblances macroscopiques, à l'image des espèces des genres *Palaemon* et *Palaemonetes*, différentes clés de détermination morphologiques sont disponibles. Parmi elles, Gonzalez-Ortegón & Cuesta (2006) ont établi une liste de critère de détermination exhaustive permettant d'identifier les organismes des genres *Palaemon* et *Palaemonetes* présents en Europe, citant par exemple le nombre de dents dorsales et ventrales sur le rostre, incluant également le nombre de dents post-orbitales, le nombre de rangées de soies le long de la partie ventrale du rostre, la forme du rostre à son extrémité, la position des épines brachio-stégiales ou encore le nombre de pièces mandibulaires formant la mâchoire inférieure.

Palaemon serratus possède un corps quasiment translucide, coloré toutefois par la présence de chromatophores rouges sur le bord des segment abdominaux, formant des lignes transversales bien marquées (Gonzalez-Ortegón & Cuesta, 2006). Cette coloration est influencée par les conditions de luminosité dans le milieu, en témoigne la disparition de ce caractère chez des spécimens présents dans les eaux turbides. Dans les eaux de la Manche, deux espèces du genre *Palaemon* présentant des similarités morphologiques sont fréquemment retrouvées en sympatrie au niveau de l'estran : *Palaemon serratus* et *Palaemon elegans*. Pour différencier les spécimens de ces deux espèces, l'utilisation de critères de détermination simples reposant sur la morphologie du rostre et l'organisation des dents rostrales est généralement suffisante. Ainsi, *Palaemon serratus* présente un rostre long, concave comprenant six à huit dents sur la partie dorsale et cinq sur la partie ventrale tandis que *Palaemon elegans* possède un rostre plus court, droit voire légèrement concave, avec sept à neuf dents sur la partie dorsale et seulement trois dents ventrales (**Figure II-6**).

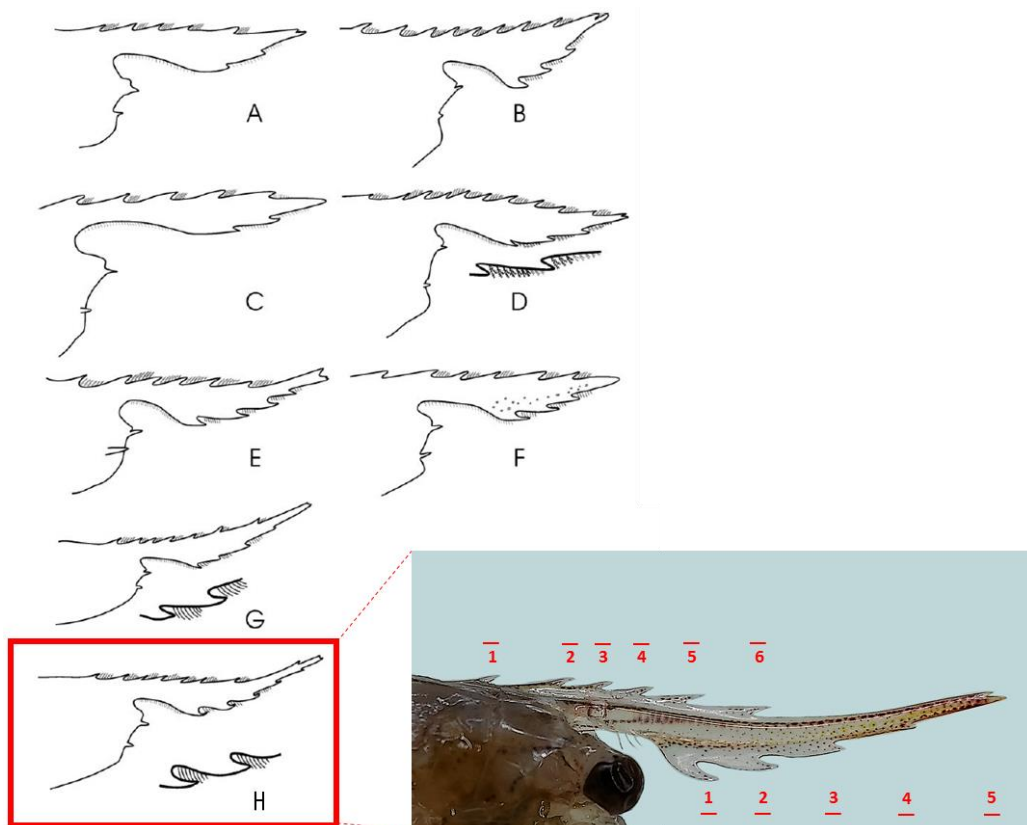


Figure II-6 Différenciations morphologiques de la partie antérieure du céphalothorax chez les Palaemonidae, d'après Gonzalez-Ortegón & Cuesta (2006) : (A) *Palaemonetes varians*, (B) *Palaemon elegans*, (C) *Palaemonetes antennarius*, (D) *Palaemon macrodactylus*, (E) *Palaemon xiphias*, (F) *Palaemon adspersus*, (G) *Palaemon longirostris* (femelle issue de la rivière Gadalquivir) et (H) *Palaemon serratus*, accompagnée d'une illustration (source : A. Duflot).

2.1.2.2. Ecologie et cycle de vie

Palaemon serratus présente une espérance de vie située entre 2 et 5 ans selon les auteurs (Sollaud, 1916 ; Forster, 1951 ; Cole 1958 ; Campillo 1979 ; Figueras, 1986). La croissance par mues successives des crustacés complexifie l'estimation de l'âge des organismes. Néanmoins, quelques auteurs ont estimé la taille qu'un organisme atteint, selon une distribution de taille-fréquence, lors de la fin de chaque saison de croissance (*i.e.* octobre) et à chaque présumé « anniversaire » (*i.e.* juin) chez *P. serratus* (Sollaud, 1912 ; Forster, 1951 ; Cole, 1958 ; Hartnoll, 2001). Lors d'un suivi de cohorte à Roscoff (Finistère, France), Campillo (1979) détermine la présence de 3 classes d'âges : classe 0 (*i.e.* moins d'un an ; longueur du céphalothorax : $L_{ct} < 27$ mm, **figure II-7**), classe 1 (*i.e.* plus d'un an ; $27 < L_{ct} < 36$ mm) et classe 2 (*i.e.* plus de 2 ans ; $36 < L_{ct} < 40.6$ mm). Selon cet auteur, les deux sexes ont une durée de vie relativement comparable de trois années. Si ce constat semble vrai pour les mâles, il a été observé que les spécimens femelles pouvaient vivre jusqu'à cinq ans.

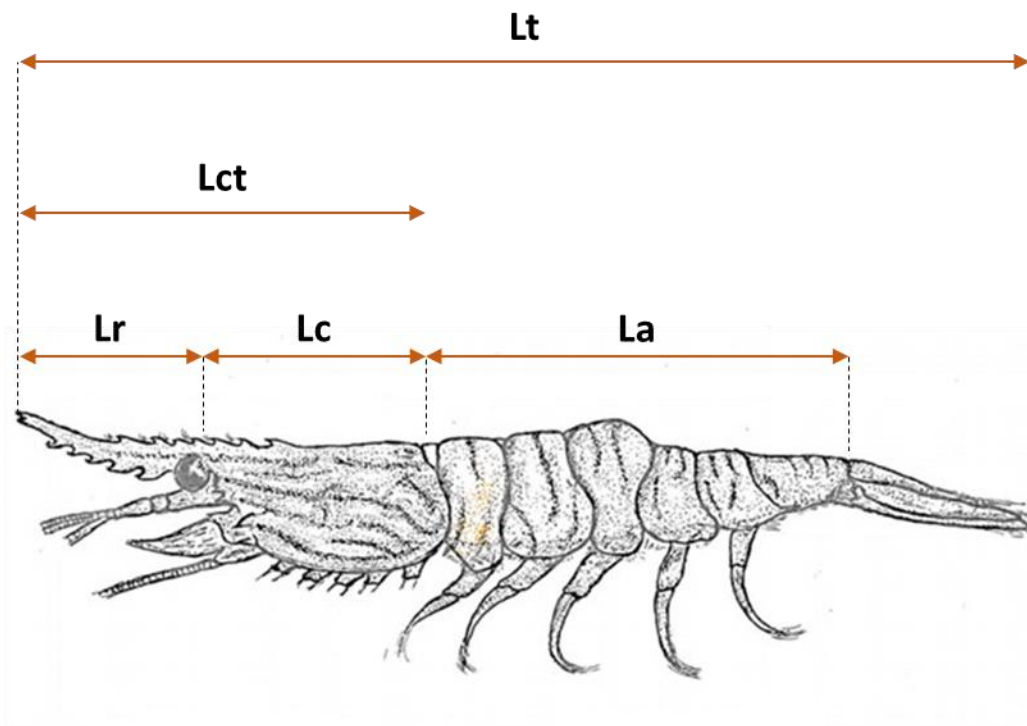


Figure II-7 Illustration des différentes tailles mesurées sur les spécimens *Palaemon serratus* : taille totale de l'organisme (Lt), taille du céphalothorax avec rostre (Lct), taille du rostre (Lr), taille du céphalothorax sans rostre (Lc), taille de l'abdomen (La).

Comme l'ensemble des Palaemonidae, la crevette rose présente quatre phases dans son cycle de développement : une phase sous forme d'œuf, succédée par une phase larvaire, puis juvénile et adulte (**Figure II-8**). La spermatogenèse étant continue chez les crustacés (Subramoniam, 2016), la période de reproduction, et intrinsèquement la production d'œufs, est rythmée par le développement ovarien. Chez *Palaemon serratus*, ce processus est influencé par l'âge et la température (Forster, 1959 ; Campillo 1979 ; Haig *et al.* 2014). Les femelles de classe 0 ont une production d'œufs par an, issue d'une reproduction hivernale, tandis que les femelles de classe 1 et supérieure peuvent réaliser une deuxième ponte au printemps. De plus, selon la température de l'eau, le nombre de ponte, comme l'ensemble des traits de reproduction, peuvent varier, expliquant les différences spatiales observées (Haig *et al.* 2014). De la même manière, l'incubation et le développement des œufs dépend de la température de l'eau, ce qui explique que la ponte hivernale est incubée sur 3-4 mois, tandis que l'incubation de la ponte printanière ne s'étend que sur 2 mois (Cole, 1958 ; Campillo, 1979). Ces observations ont été corroborées en condition de laboratoire, où une augmentation de température diminuait le temps d'incubation des œufs (Phillips, 1971). Depuis les dernières décennies et avec la montée en température des eaux de l'Atlantique Nord, ce constat tend à s'égaliser, favorisant la mise en place de plusieurs pontes par an (Cannaby & Hüsrevoglu, 2009 ; Huxley, 2011). Une fois l'éclosion réalisée, la crevette rose réalise plusieurs stades larvaires sous forme de larve zoé puis de larve mysis. Les larves possèdent généralement une tolérance à la salinité plus élevée que les adultes, ce qui explique qu'elles soient retrouvées en zones estuariennes et littorales (Panikkar, 1941 ; Campillo, 1979 ; Rowe, 2002 ; Kelly *et al.* 2012). De juillet à mi-octobre (*i.e.* larves issues de la ponte printanière), les larves colonisent même les zones subtidales (Forster, 1951 ; De Bhaldrathe, 1971 in Kelly *et al.* 2012 ; Kelly *et al.* 2008). En dehors de cette période, les conditions climatiques ne sont plus optimales, influençant le développement larvaire (Yagi & Ceccaldi 1984, 1985). Au sein de ces zones subtidales, les larves sont préférentiellement benthiques, mais disposent d'appendices thoraciques leur permettant de nager, permettant d'accéder à de la nourriture telle que des micro-crustacés ou du phytoplancton (Haig *et al.* 2014). Le développement larvaire est constitué d'une succession de stades zoés et mysis, chacun débutant par la mue de l'organisme pour aboutir à la métamorphose de la crevette, lui conférant sa morphologie finale (Reeve, 1969 ; Kelly *et al.* 2012). Les différents stades ont d'ailleurs été décrits afin d'obtenir une clé de détermination morphologique spécifique (Fincham & Figueras, 1986). Si en général, la succession des stades est relativement courte, le temps à la métamorphose ainsi que le nombre de stades dépendent de facteurs environnementaux tels que la nourriture, la salinité, la température et la photopériode (Reeve,

1969 ; Wickins, 1971 ; Campillo, 1979 ; Fincham, 1983 ; Fincham & Figueras, 1986 ; Kelly *et al.* 2012). Néanmoins, Fincham & Figueras (1986) estiment à huit/neuf le nombre moyen de stade larvaires chez *P. serratus*, avant la métamorphose de l'organisme. Durant les premiers stades zoés, le développement, la croissance et les changements morphologiques sont relativement synchrones entre les individus. En revanche, les stades mysis permettent de mettre en évidence des changements morphologiques tels que des variations de taille (Fincham & Figueras, 1986). Une fois la métamorphose réalisée, les formes post-larvaires ou juvéniles apparaissent. Les juvéniles forment la classe d'âge 0, phase la plus tolérante aux variations de salinité et température, leur permettant de coloniser les zones littorales jusqu'aux flaques intertidales découvertes sur l'estran en été, et regagnant les zones basses rocheuses intertidales en hiver, lorsque les conditions deviennent défavorables (Forster, 1951 ; Guerao & Ribera, 1996 ; Kelly *et al.* 2012 : **Figure II-8**). La croissance des juvéniles et des adultes est rythmée par le cycle de mue, la prise de taille étant réalisée au moment de chaque mue. Au fur et à mesure du développement, les cycles de mue deviennent de plus en plus étendus, et la tolérance aux conditions de salinité diminue (Panikkar, 1941). Les adultes (*i.e.* classe 2) colonisent majoritairement les basses zones intertidales en période chaude (*i.e.* mai à novembre), découvertes qu'en cas de grandes marées de vive-eau, et migrent en grande partie vers les eaux profondes lors de la dégradation des conditions climatiques (*i.e.* novembre à mai). Ainsi, malgré la migration régulière de cette espèce, sa longue présence sur l'estran durant plus de la moitié de l'année, soit de mai à novembre, rend possible la corrélation des réponses biologiques avec le niveau de contamination de son lieu de vie. De plus, *P. serratus* représente généralement une biomasse importante dans les écosystèmes et est présente en forte densité sur la bande littorale ce qui permet de prélever rapidement les organismes, sans nécessiter la mise en œuvre de moyens à la mer relativement onéreux.

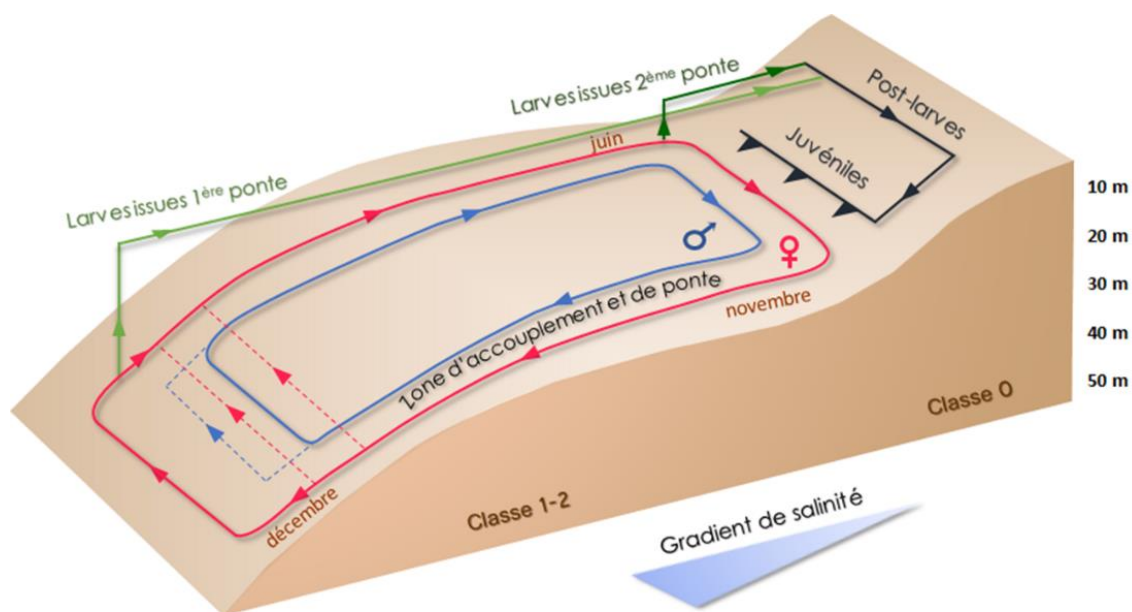


Figure II-8 Représentation de la distribution bathymétrique des différents stades de développement de *Palaemon serratus* (crédit : A. Duflot, d'après Campillo, 1979)

2.1.3. Utilisation en écotoxicologie

En écotoxicologie, l'utilisation et la mise en place d'espèces sentinelles reposent sur la capacité de celles-ci à détecter les effets de contaminants, notamment à travers l'analyse de réponses biologiques observées à différents niveaux biologiques tels que le niveau sub-individuel (*e.g.* activité moléculaire, machinerie cellulaire, intégrité tissulaire) (Allan *et al.* 2006 ; Damásio *et al.* 2008), l'individu (*e.g.* traits de vie, comportement) ou encore la population (*e.g.* densité du stock, taux de croissance, sex ratio : **Figure II-9**). A ce titre, Key *et al.* (2006) proposent d'utiliser la crevette *Palaemonetes pugio* en tant qu'espèce sentinelle, cette espèce ayant été utilisée dans des études toxicologiques intégrant les trois niveaux biologiques. Cette partie propose un inventaire axé sur les études d'effets de contaminants chez les Palaemonidae, aussi bien en conditions contrôlées de laboratoire que dans un contexte de biosurveillance environnementale.

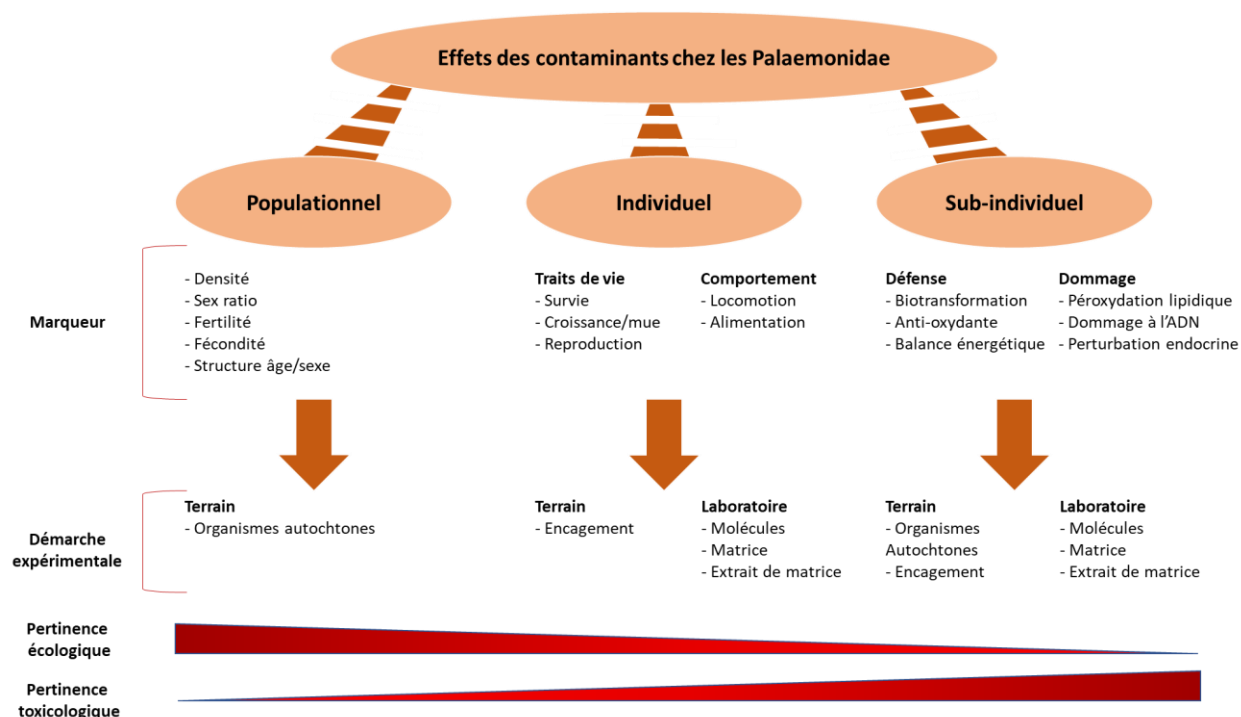


Figure II-9 Approche multi-échelles utilisée en écotoxicologie chez les Palaemonidae (crédit : A. Erraud)

2.1.3.1. Descripteurs sub-individuels

Les descripteurs sub-individuels, souvent appelés biomarqueurs, permettent de réaliser un diagnostic précoce et sensible de l'effet toxique, permettant de disposer d'alarmes en amont des conséquences sur les niveaux biologiques supérieurs. Un biomarqueur désigne « *un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant* » (Lagadic et al. 1997). Deux catégories de biomarqueurs sont généralement distinguées (Amiard & Amiard-Triquet 2008) : les biomarqueurs d'exposition, regroupant les réponses de l'organisme et les mises en place de défense en réponse à la présence de xénobiotique et les biomarqueurs d'effet, traduisant les dommages imputables à l'action du contaminant sur l'organisme.

Chez les Palaemonidae, les études portant sur la mesure de biomarqueurs ont majoritairement été réalisées chez les espèces du genre *Palaemonetes*, notamment avec l'espèce nord-américaine *Palaemonetes pugio* (Key et al. 2006). Le genre *Palaemon* est le second genre le plus utilisé, en particulier avec *Palaemon serratus*, l'espèce d'étude de ce travail doctoral. (voir Annexe 1). Parmi les biomarqueurs développés sur ces organismes figurent principalement des marqueurs en lien avec :

i) l'impact des contaminants sur le système nerveux, notamment au travers de la mesure de l'activité de l'acétylcholine estérase (AChE),

ii) la prise en charge et la transformation des contaminants, *via* le dosage de la glutathion S-transférase (GST), de la forme réduite de glutathion (GSH), des métallothionéines (MT) ou encore du cytochrome P4501A (CYP1A),

iii) l'étude du stress oxydant : dosage de la catalase (CAT), de la superoxyde dismutase (SOD), de la peroxydation lipidique (LPO), du malondialdéhyde (MDA).

et iv) la réponse immunitaire (*e.g.* nombre d'hémocytes, fraction hémocytaire en circulation).

De manière plus minoritaire, le dosage des *heat shock proteins* (HSP), ainsi que l'analyse de dommages à l'ADN et l'expression génique ont également été réalisés. A ce titre, Olsvik *et al.* (2017) ont réalisé un screening d'expression de gène sur des crevettes *Palaemon elegans* exposés pendant 98 jours à un antiparasitaire, le teflubenzuron, à une dose représentant 2 % de la dose utilisée en aquaculture. Ainsi, après la période d'exposition, les auteurs ont constaté une plus faible transcription de deux gènes codant pour des HSP et d'un gène marqueur d'apoptose. De plus, trois gènes associés à la régulation de la mue ont montré une altération par l'exposition. A notre connaissance, il s'agit de la seule publication évoquant des perturbations de la mue à l'échelle sub-individuelle, chez les Palaemonidae. Ces altérations, ainsi que d'autres réponses en lien avec le processus de mue restent à étudier notamment en lien avec des observations aux échelles supérieures.

Si les marqueurs sub-individuels sont relativement bien documentés en conditions contrôlées de laboratoire, peu d'études analysant ces paramètres dans le milieu naturel ont été menées à ce jour. A titre d'exemple, Bolton-Warberg *et al.* (2007) ont encagé des individus de l'espèce *Palaemonetes pugio* au niveau de deux sites situés à proximité de champs dans lesquels du dichlorvos était pulvérisé régulièrement en tant qu'insecticide. Ces auteurs ont ainsi constaté une variation significative de l'activité de l'AChE entre les sites. Chez le genre *Palaemon*, à notre connaissance seules trois études ont été réalisées *in situ*. Ainsi, lors d'approches passives, Benradia *et al.* (2016) ont mis en évidence une induction significative de la GST ainsi qu'une inhibition de l'activité de l'AChE chez des crevettes *Palaemon adspersus* collectées sur deux sites anthropisés en été et automne durant deux ans. Cependant, l'activité de ce marqueur neurotoxique exprime également une variabilité saisonnière, qui pourrait expliquer en partie les résultats observés. Plus récemment, Erraud *et al.* (2018, 2019) ont développé un marqueur de génotoxicité chez deux espèces de crevettes Palaemonidae : *Palaemon serratus* et *Palaemon*

longirostris. Ils se sont focalisés sur la qualité spermatique des individus mâles. Cette cible cellulaire, ne disposant pas de techniques de réparation de l'ADN, reflète directement le degré de génotoxicité du milieu (Erraud *et al.* 2019). Un suivi de l'estuaire de Seine et du littoral de la baie de Seine a alors été réalisé entre 2015 et 2017 en collectant régulièrement des organismes. Cette étude a permis d'évaluer l'empreinte génotoxique de ces milieux estuariens/marins, mettant en évidence une dynamique spatio-temporelle de la contamination, les niveaux de dommages à l'ADN variant selon la localisation des sites d'étude et la période de prélèvement.

Ces études soulignent la possibilité d'utiliser de tels marqueurs en biosurveillance environnementale, permettant alors de disposer d'indicateurs précoces de dommages et d'outils définissant les mécanismes d'actions des contaminants sur les populations naturelles. Néanmoins, de tels déploiements nécessitent au préalable l'adaptation et l'optimisation du marqueur concerné à l'espèce utilisée, et la compréhension des variations naturelles de la réponse imputables aux facteurs physiologiques et/ou environnementaux.

2.1.3.2.Descripteurs individuels

L'étude des effets des contaminants sur des descripteurs individuels comme les traits de vie a été le niveau biologique le plus étudié chez les Palaemonidae. Ainsi, la survie des individus est le paramètre individuel le plus couramment mesuré, avec, dans une moindre mesure, la croissance, le délai de mue et la reproduction. Des marqueurs comportementaux tels que l'alimentation, la locomotion (*i.e.* vitesse de nage, évitement de contaminant) ou l'activité respiratoire ont également été analysés de manière éparse. Enfin on retrouve également des marqueurs d'anomalies du développement avec par exemple l'étude de l'apparition de malformations squelettiques.

Les traits de vie ont majoritairement été étudiés lors d'expérimentations en conditions contrôlées de laboratoire. Lors de ces tests, la toxicité d'une molécule, et dans une moindre mesure d'un mélange de molécules voire de matrices environnementales (*i.e.* eau, sédiments) a été déterminée majoritairement au travers d'expositions aiguës (voir Annexe 2), mais aussi chroniques (voir Annexe 3). Une myriade de composés toxiques diversifiés a été testée durant ces expérimentations. Ainsi, les substances étudiées dans ce cadre suivent la chronique de la prise de conscience de la dangerosité des molécules émergentes. En conséquence, les éléments métalliques tels que le cadmium, le cuivre, le zinc, le plomb, le mercure, le gallium ont fait

l'objet des premières investigations dès les années 1980 (*e.g.* Murti & Shukla, 1984 ; Rayburn *et al.* 1999 ; Yang 2014, De Melo *et al.* 2019a ; Araujo *et al.* 2020). Parallèlement, des composés organiques à l'image des HAPs commencent à être eux aussi étudiés (*e.g.* Wirth *et al.* 1999 ; Luis & Guilhermino, 2012 ; Gravato *et al.* 2014). A la suite du développement de nombreux biocides de plus en plus élaborés, les composés organochlorés figurent depuis les années 1990 parmi les molécules les plus testées chez les Palaemonidae (Clark *et al.* 1987 ; Key *et al.* 1998 ; Collins & Capello, 2006 ; Key *et al.* 2007 ; DeLorenzo & De Leon, 2010 ; DeLorenzo *et al.* 2012 ; Dai *et al.* 2014). Depuis les années 2000, des substances émergentes et potentiellement dangereuses font l'objet d'analyses de risque, incluant des expositions sur les crevettes Palaemonidae : microplastiques (Gray & Weinstein, 2007), graphène (De Melo *et al.* 2019a), crèmes solaires (Araujo *et al.* 2020) ou encore substances médicamenteuses (Emblidge & De Lorenzo, 2006 ; Gonzalez-Ortegón *et al.* 2015a,b).

Selon Key *et al.* (2006), les tests de toxicité aigüe réalisés sur *Palaemonetes pugio*, et par extension sur les Palaemonidae, sont définis comme étant des expérimentations réalisées en 96 heures ou moins. De telles conditions impliquent généralement une concentration forte du composé testé et ont été principalement réalisées pour évaluer le taux de survie des crevettes aux stades embryonnaires, larvaires ou adultes. Plus récemment, un nouveau marqueur comportemental a été mis en place et développé comme bioindicateur d'une toxicité aigüe : l'évitement de l'organisme. Associé au comportement natatoire, ce marqueur se base sur la mise en place de plusieurs compartiments, et permet de définir des concentrations effectives à partir desquelles une partie des individus exposés fuient le milieu contaminé. Ainsi, des CE50 ont pu être estimés chez les crevettes exposées à du Triclosan (Araujo *et al.* 2019), ainsi qu'à des crèmes solaires de différentes natures (Araujo *et al.* 2020). Les réponses respiratoires ont également été suivies lors d'expositions à des insecticides et herbicides (carbofurane : Barbieri *et al.* 2016 ; Paraquat : Coller *et al.* 1999), ainsi que des expositions à des drainages miniers acides (Mohti *et al.* 2012), concluant, à l'exception du carbofurane, à des élévations de la ventilation à la suite de l'exposition aux stress chimiques.

Les études de toxicité chronique chez les Palaemonidae, quel que soit le stade de développement, sont moins fréquentes. De la même façon que lors des tests de toxicité aigüe, la survie est le paramètre le plus étudié. Ce trait de vie est majoritairement étudié sur les formes de vie précoces (*i.e.* embryons et larves). Afin d'évaluer le taux de mortalité des embryons exposés à un contaminant, Rayburn *et al.* (1996) ont réalisé un protocole d'exposition des embryons de crevettes, et le suivi de leur survie et développement sur une période de 12 jours,

appelé SETAP (*i.e.* Shrimp Embryo Teratogenesis toxicity Assay Palaemonid). Ce protocole a été utilisé afin d'exposer des formes embryonnaires de *Palaemonetes pugio* à des fractions solubles de pétrole (Rayburn et al. 1996), des solvants (Rayburn & Fisher, 1997), des métaux (Rayburn & Fisher, 1999 ; Rayburn & Aladdin, 2003), ainsi que des composés organiques (Rayburn & Fisher, 1999). La majorité de ces composés ont entraîné non seulement une diminution de la survie des embryons, mais également l'apparition d'anomalies morphologiques, potentiellement létales pour les formes plus âgées. Toutefois, ce stade de vie ayant une tolérance accrue à l'exposition de xénobiotiques, la pertinence d'utiliser ce stade de développement en biosurveillance environnementale a été remise en cause par Key *et al.* (2003). À l'exception du suivi de survie, les principaux autres paramètres analysés lors de tels tests sont la croissance, à tout stade de développement, et la reproduction des formes adultes. Concernant la croissance des organismes, les genres *Palaemon* et *Palaemonetes* ont fait l'objet de la majorité des études. À titre d'exemple, Collins & Capello. (2006) ont exposé des crevettes *Palaemonetes argentinus* juvéniles durant 15 jours à un pesticide : la cyperméthrine. À l'issue de cette exposition, les auteurs ont observé une diminution du taux de croissance et de survie des organismes, ainsi qu'une augmentation de la période d'intermue. Les paramètres relatifs à la mue, associés au temps de développement des phases larvaire, juvéniles, ou adultes, ont, lors de ces expositions, souvent été reportés comme sensibles à différents composés tels que le diclofénac et le clomitrazole (Gonzalez-Ortegón *et al.* 2013), les HAPs (Oberdörster *et al.* 2000, Key *et al.* 2020) ainsi que le cuivre (Manyin & Rowe, 2008, 2010). Dans un contexte de changements globaux, Kurihara *et al.* (2008) ont exposé des adultes *Palaemon pacificus* à des teneurs élevées de dioxyde de carbone dans les eaux d'exposition, durant 15 et 30 semaines. La fréquence des mues des organismes a été observée comme le seul paramètre altéré au cours des deux périodes d'exposition. Toujours dans le cadre de l'étude des changements globaux et avec des concentrations environnementalement réalistes, Gonzalez-Ortegón *et al.* (2013) ont remarqué une diminution de la masse et du taux de croissance chez des larves de *Palaemon serratus* exposées au clomitrazole, ainsi qu'une hausse de la durée d'intermue des organismes. Enfin, dans un cadre plus difficile à réaliser en raison de la logistique nécessaire, Manyin & Rowe (2010), ont mis au point une exposition au cuivre durant l'ensemble du cycle de développement chez *Palaemonetes pugio*. Cette expérience de plusieurs mois est très informative quant au niveau d'impacts d'un xénobiotique sur chaque stade de vie, et permet de renseigner sur le développement d'organismes exposés. Ainsi, si aucun effet n'est décelé sur la survie des organismes, les auteurs ont constaté diverses perturbations des autres traits de vie telles qu'une augmentation de la taille et du temps de développement des larves.

L'étude de marqueurs individuels chez les Palaemonidae a également été réalisée *in situ* durant quelques études. Ainsi, dans l'estuaire de la Garonne (*i.e.* Gironde, France), la crevette blanche *Palaemon longirostris* et l'espèce invasive *Palaemon macrodactylus* font l'objet de suivis en raison d'apparition récurrente au sein de l'estuaire d'organismes ayant des déformations squelettiques (Aurousseau, 1984 ; Béguer *et al.* 2008). Concernant la crevette blanche, la réalisation de campagnes mensuelles de novembre 2006 à novembre 2007 a permis l'étude de 5193 organismes, mettant en avant la taille et le sexe comme facteurs principaux de corrélation avec la présence d'anomalies morphologiques (Béguer *et al.* 2010). Les crevettes femelles et de grandes tailles sont alors déterminées comme étant les plus touchées par ces déformations. De plus, la température et la salinité semblent exercer une influence sur l'apparition de tel phénomène. Les adultes semblent plus particulièrement impactés, mais ces anomalies concernent également les larves de *P. longirostris* et *P. macrodactylus* présentes en estuaire de Gironde, affectant leur développement (Feuillassier *et al.* 2012). Des études plus récentes de ce site ont permis de corréler les conditions abiotiques à l'occurrence d'anomalies chez les crevettes blanches adultes. Selon Lévesque *et al.* (2018), le comportement migratoire des femelles traversant des eaux estuariennes hypoxiques, chargées en molécules biologiques, et supplémentées en fongicides et contaminants organiques, dont certains potentiellement tératogéniques permettraient d'expliquer l'utilisation de davantage d'énergie dans le maintien de l'organisme et le comportement natatoire, conduisant à l'augmentation de l'occurrence des déformations exosquelettiques chez les adultes et les jeunes formes de vie (Lévesque *et al.* 2018). Néanmoins, des investigations complémentaires incluant des marqueurs sub-individuels, voire l'apport et l'utilisation d'outils liés au processus de mue au sein de ces investigations, permettraient d'améliorer la compréhension des déformations squelettiques observées sur le terrain.

En comparant les réponses des Palaemonidae avec d'autres espèces, des bioessais de toxicité ont montré que les crevettes Palaemonidae étaient généralement des organismes plus sensibles. Par exemple, plusieurs études (Schimmel *et al.* 1977 ; Scott *et al.* 1987 ; Wirth *et al.* 2004 ; Harper *et al.* 2008) ont comparées la sensibilité des Palaemonidae avec des espèces de poissons estuariens comme *Fundulus heteroclitus* et *Cyprinodon variegatus* lors d'expositions à des pesticides (*i.e.* malathion, fenvalarate, fipronil, parathion, endosulfan et bifenthrine) et ont conclu que les Palaemonidae étaient beaucoup plus sensibles. Lors de comparaisons avec d'autres espèces invertébrées, des études ont également montré que les Palaemonidae (principalement *Palaemonetes pugio*) étaient plus sensibles à différentes molécules comme *i)*

le chlore présent dans les effluents de centrales nucléaires en comparaison des crabes bleus *Callinectes sapidus* (Hall *et al.* 1979), ii) des organophosphorés pyréthroïdes en comparaison avec une espèce de *Mysidae*, *Americamysis bahia* (DeLorenzo *et al.* 2012), iii) le méthyl tert-butyl éther en comparaison avec les amphipodes *Rhepoxynius abronius* (Rausina *et al.* 2002), iv) au pesticide endosulfan en comparaison du crabe violoniste *Uca pugilator* et de l'huître *Crassostrea virginica* (Pennington *et al.* 2004) et v) au fipronil en comparaison de la palourde *Mercenaria mercenaria* et de l'huître *Crassostrea virginica* (Wirth *et al.* 2004).

2.1.3.3. Descripteurs populationnels

L'étude des impacts au niveau des populations est une approche particulièrement intéressante car elle permet une compréhension globale des effets dans le temps et l'espace. Elle est donc plus pertinente d'un point de vue écologique que les études au niveaux inférieurs (Forbes & Calow, 1999). De plus, l'étude des impacts sur les populations est importante d'un point de vue réglementaire étant donné que la population représente le niveau de protection visé par les directives internationales comme la Directive Cadre sur l'Eau. Toutefois, l'étude en direct de l'impact des contaminants sur les populations naturelles est généralement difficile à mettre œuvre du fait de la variabilité naturelle importante des paramètres populationnels comme la densité ou la structure en taille/âge de la population (Clark, 2003). De ce fait, les études basées sur ce niveau biologique restent rares. Chez les Palaemonidae, le genre *Palaemonetes* a fait l'objet de la majorité des études se focalisant sur les impacts au niveau populationnel, notamment *Palaemonetes pugio* qui a été beaucoup étudiée aux Etats-Unis (Fulton *et al.* 1999 ; Leight *et al.* 2005 ; Key, 2006). Les paramètres démographiques principalement analysés sont les densités de crevettes, les sex-ratios, ainsi que des paramètres relatifs à la croissance et la reproduction des organismes tels que la distribution de taille et de masse, l'occurrence des femelles ovigères et le nombre d'œufs portés par femelle (Finley *et al.* 1999 ; Fulton *et al.* 1999 ; Weis *et al.* 2000 ; Wall *et al.* 2001 ; Leight *et al.* 2005). Par exemple, dans une étude de Leight *et al.* (2005), des crevettes *Palaemonetes pugio* échantillonnées mensuellement sur une période de dix ans, et en provenance de quatre stations (*i.e.* trois à proximité d'activités agricoles et un site de référence), ont révélé une densité de population diminuée sur les trois sites anthropisés à hauteur de 57,5, 75 et 80 % par rapport au site témoin. Ces résultats sont venus appuyer ceux de Fulton *et al.* (1999), qui, chez la même espèce et sur les mêmes stations, après un suivi mensuel de 1985 à 1990, avaient déjà observé une diminution de près de 50 % de la densité d'une population de crevettes d'un site situé près de rejets de pesticides

organophosphorés d'origine agricole. Au niveau populationnel, les investigations se font davantage sur le genre *Palaemon*. La taille et la croissance de trois populations de *P. concinnus* provenant d'une mangrove (*i.e.* un site péri-urbain et deux sites de référence), ont été évaluées à raison d'un prélèvement de 100 crevettes par site tous les 15 jours pendant 12 mois (Penha-Lopes *et al.*, 2011). Les auteurs ont observé dans le site péri-urbain des périodes de reproduction plus longues, une plus grande proportion de femelles ovigères, un taux de développement embryonnaire plus importants et une modification du sex-ratio en faveur des femelles. Ces effets ont notamment été reliés à une charge parasitaire plus élevée dans le site péri-urbain pouvant expliquer ces effets stimulants sur la population.

Si ces études permettent de diagnostiquer des états de santé des populations de crevettes et suscitent de plus en plus l'intérêt des chercheurs (*i.e.* plus de 50 % des études recensées ayant été réalisées durant les 10 dernières années), elles atteignent leur limite lors de l'identification des causes des perturbations observées. Toutefois, ces travaux permettent de mettre en évidence de réelles perturbations dans la dynamique de populations chez les *Palaemonidae*.

Synthèse de la partie 1

Intérêt et utilisation des *Palaemonidae* en écotoxicologie

Grâce aux travaux établissant les connaissances de la biologie et de l'écologie des crevettes *Palaemonidae*, il est possible de reconnaître l'intérêt d'utiliser ces crevettes en écotoxicologie. De même, en se basant sur les critères de Berthet (2015), *Palaemon serratus* peut être reconnue en Europe comme une espèce sentinelle disposant :

- D'une facilité d'identification, en raison des clés de détermination établies (Gonzalez-Ortegon & Cuesta, 2006)
- D'une abondante densité de population (Campillo, 1979 ; De Grave *et al.* 2007)
- D'une disponibilité forte sur le littoral durant sept mois de l'année, facilitant sa capture
- D'une aire de répartition large sur la majorité des côtes européennes (Weiss *et al.* 2018)
- D'une biologie bien documentée
- De rôles économiques et écologiques clés au niveau du littoral
- De son utilisation en écotoxicologie à différentes échelles d'observation

2.2. La mue chez les crustacés

Le super-embranchement des ecdysozoaires, comprenant les Arthropodes et par conséquent les crustacés, se distingue notamment par une particularité morphologique importante : la présence d'une cuticule externe. Ce tissu chitineux constitue un exosquelette qui confine l'organisme, formant une barrière contre les éventuels stress présents dans le milieu externe. Toutefois, si la cuticule permet de protéger en partie l'organisme, elle le contraint lors de son développement, notamment pour sa croissance et sa reproduction. Pour pallier cela, l'individu va de manière régulière réaliser des mues au cours de son cycle de vie. Le phénomène de mue pour un ecdysozoaire consiste principalement en la fragilisation partielle de la cuticule afin que l'individu puisse s'en extirper et croître, ainsi qu'en la synthèse d'une nouvelle cuticule, créant une protection plus adaptée aux nouvelles dimensions de l'organisme (Chang & Mykles, 2011). La mue est ainsi un processus physiologique clé chez les crustacés, jouant un rôle dans *i)* la croissance des organismes, du stade larvaire aux adultes, *ii)* la métamorphose des larves en juvéniles, *iii)* l'accouplement des adultes, ainsi que dans *iv)* la maturation et le développement ovariens, *v)* l'embryogenèse et *vi)* la reproduction de certaines espèces (Olesen *et al.* 2013 ; Subramoniam, 2016). Pour que ce processus puisse se réaliser et qu'*in fine* l'organisme assure son développement, la mue est sous tendue par une myriade de mécanismes biochimiques et moléculaires, interagissant entre eux et formant une régulation complexe, non entièrement connue à ce jour (Song *et al.* 2017). Ainsi, la mue chez les crustacés peut se résumer par un processus crucial et nécessitant beaucoup d'énergie pour être parfaitement réalisé. Outre sa réalisation, Aiken (1963) précise *qu'historiquement, le terme « mue » inclut tous les changements physiologiques et morphologiques impliqués dans la préparation à l'exuvie et la stabilisation de la cuticule post-exuvie*. Plus précisément, le terme « mue » peut faire référence à deux sujets distincts et complémentaires : l'état morphologique et structurel de la cuticule, ainsi que le déroulement du cycle de mue menant à l'exuvie de l'organisme. Cette partie se propose de détailler chacun de ces deux sujets chez les crustacés, en mentionnant les différences possibles entre les différentes espèces, et en citant lorsqu'elles sont connues les propriétés particulières chez notre organisme d'étude *P. serratus*.

2.2.1. Composition de la cuticule chez les crustacés

Parmi les Arthropodes, le groupe monophylétique des crustacés présente la plus grande diversité morphologique, disposant de structures et d'organisations anatomiques très variées

entre les classes et parfois les ordres présents au sein de ce sous-embranchement (Schram, 2013). Malgré cette diversité et celle des habitats occupés par les différents taxons, l'ensemble des spécimens de crustacés dispose d'un trait caractéristique commun : la présence d'un exosquelette rigide externe, la cuticule. Plus précisément, la composition de la cuticule, tant au niveau moléculaire qu'à l'échelle tissulaire reste similaire entre les différentes espèces, de telle manière qu'il est possible d'évoquer une structure globale type de la cuticule caractéristique des crustacés. Malgré tout, des particularités spécifiques sont à dénoter selon les espèces considérées, mais aussi originaires d'influences externes, comme décrits au cours de cette sous-partie.

2.2.1.1. Description moléculaire de la cuticule

La cuticule des crustacés est un matériau composite biologique et inorganique, formé essentiellement de réseaux de protéines, de polysaccharides et de sels inorganiques. Historiquement, la carapace dorsale des brachyours, décapodes comprenant les « vrais crabes », est la cuticule majoritairement décrite et caractérisée chez les crustacés (Dillaman *et al.* 2013). Celle-ci permettra de définir une première composition globale de la cuticule des crustacés.

L'unité moléculaire basale communément définie au niveau de la cuticule est un monomère glycosylé appelé N-acétylglucosamine (Jeuniaux, 1975). Ces unités vont se lier entre elles *via* la formation de ponts β (1-4) glycosidiques, et former de longues chaînes polysaccharidiques connues sous le nom de chitine. Les chaînes de chitine s'arrangent selon une structure secondaire formant des feuillets parallèles, dont trois variétés cristallographiques se distinguent : la chitine α , β , et γ . Ces variétés de chitine ne se différencient que par leur arrangement, la forme α et β présentant des chaînes antiparallèles et parallèles respectivement, tandis que la chitine γ présente un groupement de deux chaînes parallèles et une antiparallèle (Jeuniaux, 1975 : **Figure II-10**). Chez les crustacés, à la différence des insectes, seule la forme α chitine est retrouvée (Jeuniaux, 1975 ; Stevenson *et al.* 1985, Dillaman *et al.* 2013). Cette forme apparaît comme étant la forme de chitine la plus stable, les deux autres formes étant converties en chitine α lors de traitement à l'acide concentré (Hackman & Goldberg, 1965). La teneur en chitine dans la cuticule des crustacés est susceptible de varier selon les espèces, avec une abondance accrue dans les cuticules de crevettes par rapport à celle des crabes et des écrevisses par exemple (Accosta *et al.* 1993 ; Kurita 2006). En raison de l'abondance de

crustacés, l'extraction depuis la cuticule, ancienne comme nouvelle, permet de produire une source très abondante de chitine (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003 ; Kurita, 2006). Ce matériau, ainsi que son dérivé acétylé, le chitosan, ont été relativement bien étudiés en raison de leurs propriétés physiques qui les rendent particulièrement intéressants dans de nombreux domaines tels que l'agro-alimentaire, l'industrie pharmaceutique et cosmétique, la santé humaine et animale, le textile ainsi que la remédiation de produits métalliques (Kumar, 2000 ; Synowiecki & Al-Khateeb, 2003 ; Kurita, 2006 ; Rinaudo 2006 ; Gerente *et al.* 2007 ; Aranaz *et al.* 2009 ; Byun *et al.* 2012 ; Pandharipande & Bhagat, 2016).

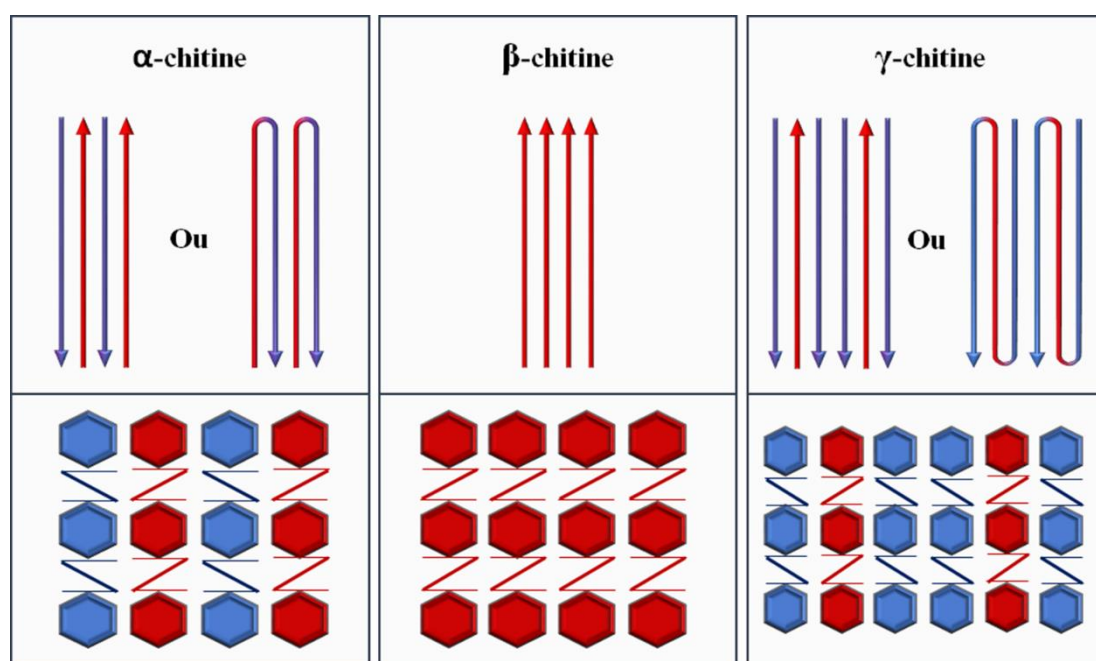


Figure II-10 Orientation des chaînes moléculaires au sein des variétés cristallographiques de chitine (crédit : Aurélie Duflot, adapté de Jeuniaux, 1975)

Au sein de la cuticule, les chaînes de chitine vont se grouper en un amas de 18 à 25 unités formant une nanofibrille. La nanofibrille ainsi formée sera maintenue dans une matrice protéique servant d'enrobage externe de la fibrille formée (**Figure II-11**). Chaque nanofibrille mesure entre 2 et 5 nanomètres de diamètre et s'étend sur une longueur de 300 nanomètres (Neville *et al.* 1976 ; Raabe *et al.* 2005 ; Sachs *et al.* 2006 ; Romano *et al.* 2007 ; Dillaman *et al.* 2013 ; Fabritius *et al.* 2016). A leur tour, les nanofibrilles vont s'empaqueter dans une matrice protéique pour former des fibres protéo-chitineuses mesurant entre 50 et 250 nanomètres de diamètre. Les fibres ainsi formées vont s'agencer de part et d'autre des canaux poreux les plus développés, présents en section transversale, ce qui forme *in fine* une structure

dite alvéolée. Les fibres ainsi agencées sont parallèles entre elles, formant des plans horizontaux, parallèles aux cellules épidermiques sous-jacentes, dans lesquels les canaux poreux traverseront la structure fibreuse, aidant au transport (et par conséquent à l'apport) de minéraux au cours du cycle de mue. Les plans de fibres vont alors se superposer, donnant une structure verticale disposant d'une rotation régulière autour de l'axe normal, (*i.e.* perpendiculaire aux différents plans) lors de chaque succession d'un plan à l'autre. L'empilement torsadé de plans formés de fibres protéo-chitineuses, produisant un angle de 180 degrés entre le premier et le dernier plan est bien documenté et plus connu sous le nom de structure de Bouligand (Bouligand, 1972) ou sous le terme anglais de « twisted plywood », pouvant être littéralement traduit par « contreplaqué tordu ». Aux niveaux d'observation supérieurs, la structure de Bouligand est définie comme étant une unité basale dans la détermination des couches formant la cuticule des crustacés. Toutefois, certains auteurs indiquent que la structure de Bouligand, bien qu'observée chez de nombreuses espèces de crustacés, n'est pas l'unique structure formée par les plans de fibres protéo-chitineuses et que parfois des empilements de plans fibreux sans rotation ont été rapportés (Neville, 1975 ; Hepburn & Chandler, 1976 ; Politi *et al.* 2019). Malgré la conservation de la structure de Bouligand au sein de nombreuses espèces crustacés, aucune étude n'a, à notre connaissance, caractérisé précisément la réelle structure moléculaire de la cuticule des Palaemonidae.

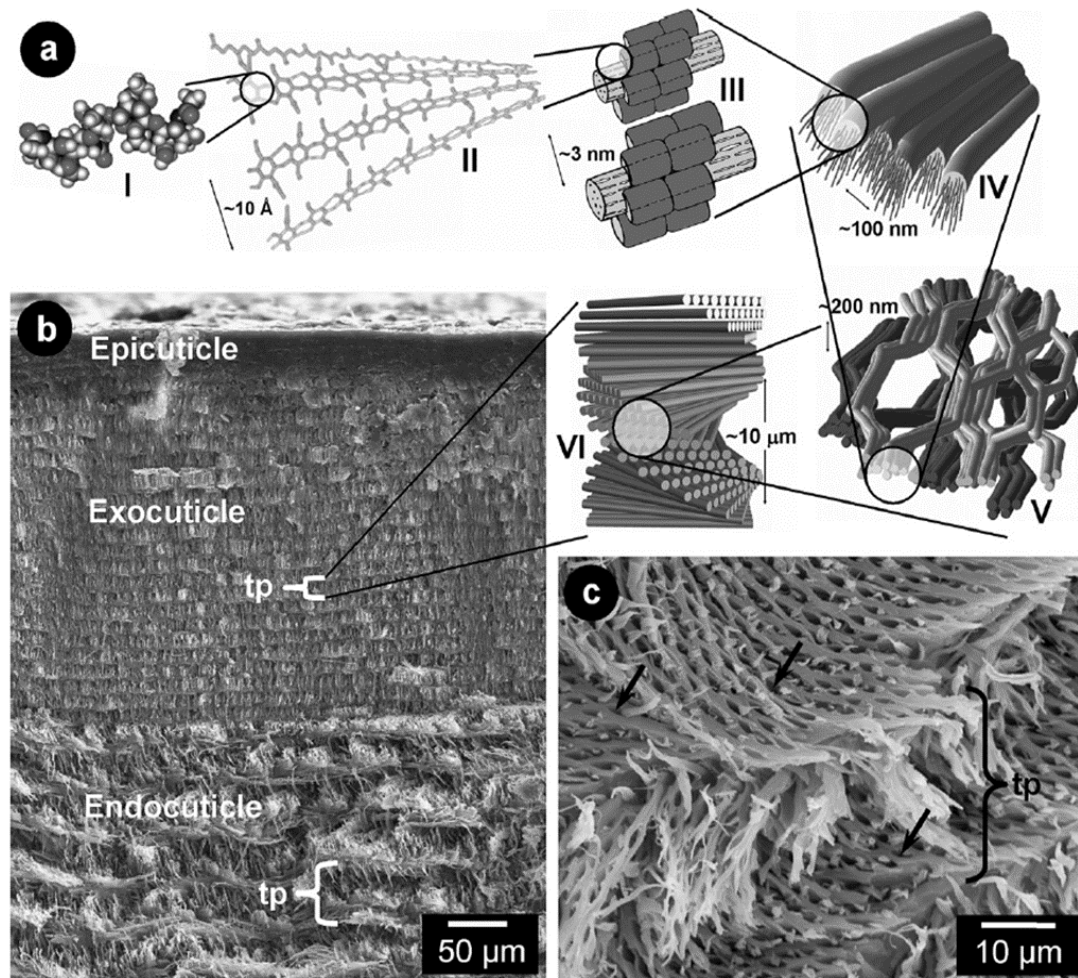


Figure II-11 Organisation structurale de la cuticule de homard *Homarus americanus*. (a) Représentation schématisée des niveaux hiérarchiques de la structure moléculaire de la cuticule, avec au plus bas niveau la présence de molécules de N-acétylglucosamines (I) formant des chaînes anti-parallèles d'α chitine (II). La formation de nanofibrilles se fait par paquetage de 18-25 chaînes chitineuses entourées par une matrice protéique (III). Ces nanofibrilles se regroupent pour former des fibres protéo-chitineuses (IV). Ces fibres s'arrangent en plan horizontal autour de cavités formées par les canaux poreux, donnant une forme d'alvéoles de ruche (V). Les plans ainsi formés se superposent tout en ayant une rotation régulière le long de l'axe normale, formant une structure de Bouligand (VI). (b) Structure tissulaire d'une section normale de la cuticule observée au microscope électronique à balayage, où la délimitation des couches, notamment entre l'exo et l'endocuticule, est remarquable par la différence d'épaisseur des structures de Bouligand (= Tp). (c) Coupe oblique d'endocuticule observée au microscope à balayage, permettant de voir l'empilement des structures de Bouligand et l'orientation des plans fibreux les formant. Les flèches renseignent sur l'emplacement de canaux poreux (d'après Romano *et al.* 2007)

2.2.1.2. Description tissulaire de la cuticule

Parmi l'ensemble des crustacés, la majorité des espèces dont la cuticule a été étudiée présente une structure cuticulaire en quatre couches principales (Roer & Dillaman, 1984 ; Pütz & Buchholz, 1991 ; Skinner *et al.* 1992 ; Park, 1999 ; Promwikorn *et al.* 2005 ; Raabe *et al.* 2005 ; Sachs *et al.* 2006 ; Romano *et al.* 2007 ; Dillaman *et al.* 2013, **Figure I-12**). Historiquement, l'analyse et la description de ces couches cuticulaires ont fait l'objet de nombreuses études au milieu du XX^{ème} siècle dans lesquelles chaque auteur nommait les

couches selon une terminologie qui leur était propre (Aiken, 1980, **Tableau II-1**). Néanmoins, ces auteurs citent de manière consensuelle la présence de quatre couches cuticulaires, qui semble être un trait conservé chez les crustacés comme l'attestent Véga *et al.* (2005) qui observent cette organisation sur des fossiles de décapodes datant de la fin du Crétacé. Actuellement, ces quatre couches sont connues, de la couche surfacique à la couche la plus interne, sous le nom d'épicuticule, d'exocuticule, d'endocuticule et de couche membranaire, les trois dernières formant la procuticule.

Tableau II-1 Appellation attribuée aux différentes couches cuticulaires selon les différents auteurs (d'après Aiken, 1980)

Drach (1939)		Richards (1951)		Dennell (1960)		Skinner (1962) Travis (1963)	
Epicuticule		Epicuticule		Epicuticule		Epicuticule	
Endocuticule	Couche pré-exuviale (couche pigmentaire)	Procuticule	Exocuticule	Endocuticule	Couche pigmentaire	Exocuticule	
	Couche principale		Endocuticule		Couche calcifiée	Endocuticule	
	Couche membraneuse		Couche membraneuse		Couche non calcifiée	Couche membraneuse	
Lower (1964)		Hepper (1965) Travis (1955a)		Stevenson (1967)		Schafer (1968)	
Epicuticule		Epicuticule		Epicuticule		Epicuticule	
Procuticule	Zone pigmentaire (Exocuticule)	Procuticule	Couche pigmentaire	Procuticule	Endocuticule pré-exuviale	Couche pigmentaire	
	Zone calcifiée (Mesocuticule)		Couche principale		Endocuticule post-exuviale	Endocuticule	
	Zone membraneuse (Endocuticule)		Couche membraneuse		Couche membraneuse	Couche membraneuse	

Ainsi, l'épicuticule est une fine couche de quelques centaines de nanomètres d'épaisseur (Fabritius *et al.* 2016), présentant une forte teneur en lipides et lipoprotéines, ce qui lui permet d'assurer un rôle de protection contre le milieu extérieur (*i.e.* évitant notamment les entrées

d'eau chez les organismes aquatiques : Nagasawa, 2012). Cette fine couche est également fortement minéralisée comme observé par Promwikorn *et al.* (2005) chez la crevette géante tigrée *Penaeus monodon*. Ces auteurs constatent également que l'épicuticule est riche en sucre, mais ne possède pas de fibres de collagène. Sous-jacent et perpendiculaires à la surface, des fibres verticales traversent l'épicuticule et rejoignent les couches profondes, rejoignant même pour certaines les cellules épidermiques sous-cuticulaires (Modla, 2006).

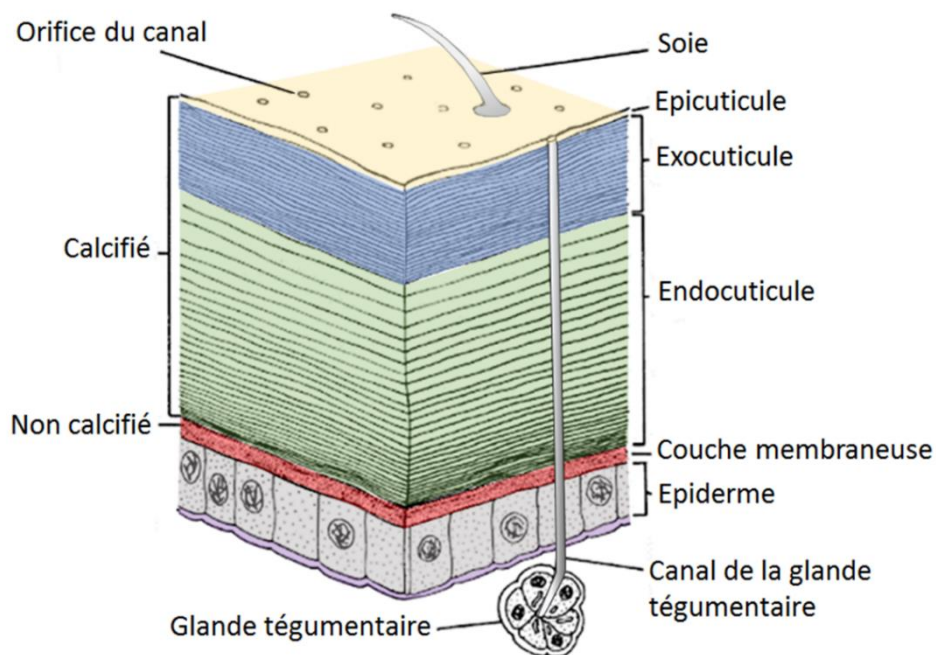


Figure II-12 Représentation de la structure cuticulaire des crustacés (d'après Stevenson, 1985)

Situées sous l'épicuticule, l'exocuticule et l'endocuticule forment des couches fortement minéralisées, dont l'organisation est régie par la présence de structures de Bouligand empilées de manière plus ou moins compacte. L'exocuticule représente la deuxième couche la plus épaisse de la cuticule, sous la forme de sous-couches empilées de manière compacte, formées par un assemblage de chitine et protéines. Des analyses histochimiques ont permis de mettre en évidence la présence de fibres de collagène, de sels calciques, majoritairement sous forme cristalline (Fabritius *et al.* 2016), l'absence de lipides (Promwikorn *et al.* 2005), ainsi que de quinones présentes pour renforcer et tanner la matrice protéique (Travis, 1955 ; Neville, 1975). L'exocuticule forme souvent une limite discontinue avec l'épicuticule, de manière à renforcer la transition entre ces deux couches et ainsi éviter le décollement et l'isolement de la couche surfacique (Fabritius *et al.* 2016).

Sous l'exocuticule se trouve l'endocuticule, dont l'empilement de structures de Bouligand forme un maillage plus lâche. Néanmoins, il s'agit de la couche cuticulaire la plus épaisse et la plus calcifiée (Travis, 1955 ; Skinner, 1962 ; Fabritius *et al.* 2012). Toutefois, à la différence de l'exocuticule, l'endocuticule est essentiellement minéralisée par des formes amorphes de calcium, et n'est pas tannée par des molécules de quinones (Travis, 1955 ; Hild *et al.* 2008 ; Dillaman *et al.* 2013 ; Fabritius *et al.* 2016). Cette différence d'interaction protéique pourrait être expliquée par la différence de protéines associées à chacune de l'exocuticule et l'endocuticule (Skinner *et al.* 1992 ; Compère *et al.* 2002). La transition entre ces deux couches n'est pas clairement délimitée : la plupart du temps, les deux couches se distinguent par la place qu'occupe une structure de Bouligand. Cette transition est encore plus ténue chez certains crustacés tels que le tourteau *Cancer pagurus*, où une diminution de densité de couches fibreuses survient au niveau des basses couches de l'exocuticule (Fabritius *et al.* 2012). De la même manière, l'endocuticule peut être sujette à des variations d'organisation entre la partie supérieure et la partie inférieure, où les fibres de collagène sont plus compactes, comme observée chez la crevette géante tigrée *Penaeus monodon* (Promwikorn *et al.* 2005).

Enfin, la couche la plus interne de la cuticule est la couche membranaire, située à la surface des cellules épidermiques qui participent à la synthèse puis à la dégradation des couches cuticulaires au cours de la mue. La couche membranaire dispose d'une structure similaire à la partie basale de l'endocuticule, avec une composition majeure en chitine et en protéine, mais n'est pas minéralisée (Roer & Dillaman, 1984 ; Fabritius *et al.* 2012). Cette dernière affirmation semble toutefois dépendre de l'espèce considérée, en témoigne la présence forte de sels calciques retrouvés dans la couche membranaire de la crevette géante tigrée *Penaeus monodon* (Promwikorn *et al.* 2005).

Visibles lors d'une coupe transversale de la cuticule, des canaux poreux s'étendent depuis les cellules épidermiques jusqu'aux couches cuticulaires supérieures, tout en s'amincissant progressivement par rapport à leur diamètre initial (Roer & Dillaman, 1984 ; Molda, 2006 : **figure II-13**). Molda (2006) explicite également la présence d'autres types de fibres et canaux transversaux au sein de la cuticule complexifiant la structure globale de celle-ci. Toutefois, les canaux poreux restent les principales structures transversales ayant un grand rôle dans la minéralisation de l'ensemble de la cuticule notamment.

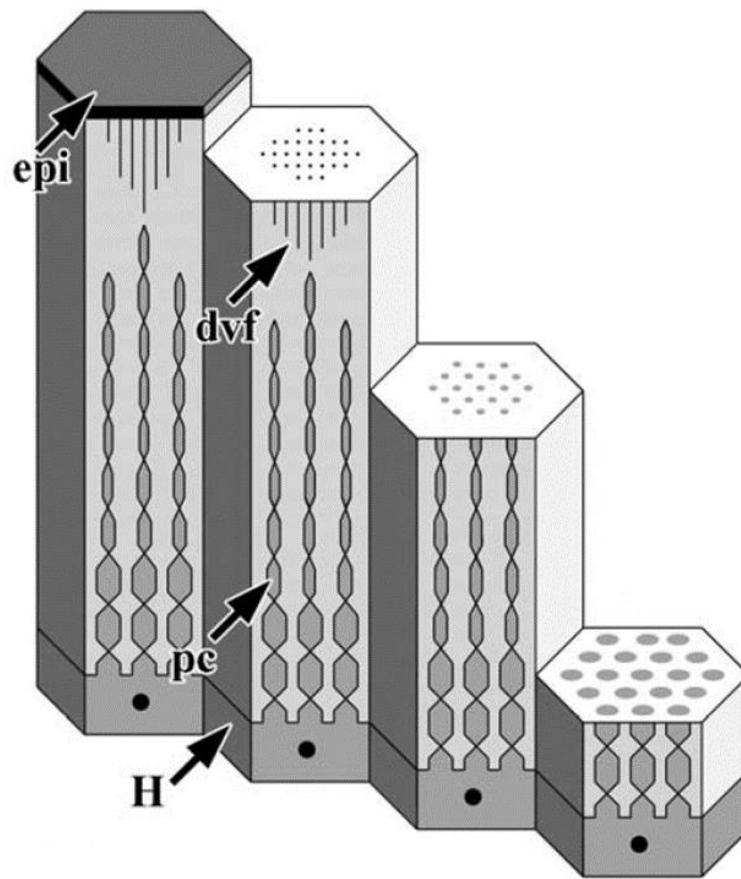


Figure II-13 Illustration de la distribution des fibres verticales au sein de la cuticule des crustacés. Les canaux poreux (pc) partent des cellules hypodermiques (H) puis remontent le long des couches cuticulaires en perdant progressivement de l'épaisseur. A la surface, l'épicuticule (epi) est traversée par des fibres verticales denses qui s'étendent vers l'exocuticule (d'après Modla, 2006)

2.2.1.3. Minéralisation de la cuticule

La minéralisation de la cuticule a lieu essentiellement au niveau des structures de Bouligand, c'est-à-dire dans l'exocuticule et l'endocuticule, ainsi que dans l'épicuticule. Au niveau de ces couches cuticulaires, le dépôt de minéraux s'effectue par précipitation de sels calciques (*i.e.* carbonate de calcium et phosphate de calcium principalement) au sein de la matrice organique (Giraud-Guille *et al.* 2004 ; Promwikorn *et al.* 2005). Plus précisément, la minéralisation de la cuticule a lieu à des endroits particuliers/spécifiques de la cuticule, notamment autour des fibres protéo-chitineuses, mais également à l'intérieur et autour des canaux poreux formés par l'extension cytoplasmique des cellules épidermiques (Roer & Dillaman, 1984 ; Giraud-Guille *et al.* 2004 ; Romano *et al.* 2007). Jusqu'au milieu des années 2000, les connaissances acquises attribuaient les formes cristallisées de calcium (*i.e.* calcite)

comme principales formes de minéralisation de la cuticule des crustacés (Richards, 1951 ; Travis, 1963 ; Luquet, 2012). Cependant, des recherches ultérieures ont également mis en évidence la présence non négligeable de formes amorphes de carbonate de calcium (Becker *et al.* 2005 ; Dillaman *et al.* 2005 ; Neues *et al.* 2007, Mergelsberg *et al.* 2019). Les deux formes de cristallisation des minéraux peuvent être présentes de manière simultanée mais uniquement à des endroits restreints de la cuticule (Levi-Kalishman *et al.* 2002 ; Hild *et al.* 2008 ; El Sawalmih *et al.* 2009 ; Mergelsberg *et al.* 2019). La différence d'occurrence entre les deux formes de cristallisation réside dans les propriétés intrinsèques à celles-ci. La forme calcite requiert davantage de place au sein de l'organisme afin d'être pleinement cristallisée tandis que la forme amorphe, plus soluble, sera davantage utilisée par l'organisme comme étant la forme de stockage ou de transition du calcium (Becker *et al.* 2005). De plus, la forme cristalline est plus rigide que la forme amorphe, ce qui engendre une résistance accrue aux chocs, tandis que la forme amorphe bénéficie d'une plus grande tolérance à la contrainte de déformation et au risque de cassure (Dendinger & Alterman, 1983).

Outre les formes de calcium, généralement prépondérantes au sein de la cuticule des crustacés, des formes « secondaires » de carbonates incluant des atomes de phosphore et de magnésium peuvent être observées, parfois avec des teneurs assez élevées (Luquet, 2012 ; Bentov *et al.* 2016). Par exemple, Becker *et al.* (2005) ont estimé la masse de carbonate de phosphate amorphe dans les cuticules à 11-12 % chez plusieurs espèces d'isopodes. Ces formes phosphatées ont été observées comme étant inhibitrices des formes cristallisées de calcium (Bachra *et al.* 1963 ; Reddy, 1977 ; Hild *et al.* 2008). De la même manière, les ions magnésium favorisent la stabilisation des formes amorphes de calcium (Aizenberg *et al.* 2002 ; Loste *et al.* 2003). Ainsi, le phosphore et le magnésium favorisent la mise en place de formes amorphes de calcium au sein de la cuticule des crustacés, plus propices à la transition et au transport notamment au cours du cycle de mue.

Enfin, de manière minoritaire, la cuticule des crustacés contient de nombreux ions inorganiques. Ainsi, des éléments tels que le strontium, le zinc, le cuivre, le fer, le cobalt, le nickel, le manganèse ou encore le chrome ont été dosés dans des fractions cuticulaires de différents crustacés (Dodd, 1967), comprenant notamment des brachyours (Gibbs & Bryan, 1972 ; Pratoomchat *et al.* 2002b ; Calhoun & Zou, 2016), des espèces de Palaemonidae (Brannon & Rao, 1978 ; Adeyeye & Adubiaro, 2004) et de Penaeidae (Ibrahim *et al.* 1999 ; Adeyeye *et al.* 2008). Si ces éléments jouent un rôle global dans la fortification de la cuticule, leurs rôles précis au sein de cette structure restent à déterminer, d'autant plus en prenant en

compte la variabilité importante de la teneur de ces composés dans les cuticules des différentes espèces de crustacés.

2.2.1.4. La cuticule : une structure conservée soumise à des variations

La structure de la cuticule a majoritairement été étudiée sur de grands décapodes tels que les homards et les crabes mais des informations sont disponibles pour de nombreuses espèces et des profils très variés dans la composition et la minéralisation de leur cuticule peuvent être observés. A ce titre, Fabritius *et al.* (2016) ont proposé une revue exhaustive des différences majeures observées à l'intérieur de la phylogénie des crustacés au niveau de la structure cuticulaire et de sa composition minéralogique. Les auteurs expliquent ainsi que « *la variété des compositions possibles, la variabilité de l'organisation hiérarchique, incluant des aspects quantitatifs et géométriques, ainsi que la variabilité résultante sur les propriétés physiques et leurs combinaisons font de la cuticule de crustacé un modèle intéressant [...]. Pour explorer ce potentiel, il est nécessaire de comprendre les principes structurels de tels matériaux, ainsi que leurs fonctions spécifiques* ». De telles explorations sont permises par l'observation histologique et histochimique de la cuticule, ainsi que l'analyse des propriétés chimiques, mécaniques, rhéologiques (*i.e.* analyse des déformations d'un matériau), physiques de celle-ci, soutenues par l'organisation et la composition des matériaux constituant cette structure. Certaines de ces analyses, utilisées au cours de ce travail doctoral, seront davantage détaillées dans le [Chapitre 2 - Matériels et Méthodes](#).

Ces variations de composition et de structure de la cuticule, bien que majoritairement reportées sur la base d'observations de cuticules de différentes espèces, et *in fine* la mise en évidence de particularités spécifiques, sont également observables localement au sein d'un même individu. De telles différences peuvent être mises en évidence à différentes échelles d'observation, que ce soit au niveau de *i*) la composition en éléments primaires (*i.e.* abondance de chitine et de protéines), *ii*) le nombre de couches cuticulaires observées, *iii*) l'épaisseur des couches cuticulaires et *iv*) la minéralisation et le type de minéralisation de la cuticule observée. Les auteurs attribuent ces variabilités intra et interspécifiques des propriétés physiques, mécaniques et structurales de la cuticule à plusieurs causes, dont *i*) l'adaptation du tissu à des contraintes morphologiques (*i.e.* locomotion, préhension des pinces), mais aussi *ii*) à des contraintes écophysiologiques en lien avec les relations proies-prédateurs, les contraintes de l'habitat mais également parfois l'économie de matériel et d'énergie lorsque cela est possible

(Hilton *et al.* 1984 ; Roer & Dillaman, 1984 ; Pütz & Buchholz, 1991 ; Skinner *et al.* 1992 ; Becker *et al.* 2005 ; Bosselmann *et al.* 2007 ; Neues *et al.* 2007 ; Frabritius *et al.* 2012 ; Fabritius *et al.* 2016 ; Mergelsberg *et al.* 2019 ; Katsikini *et al.* 2020).

Au niveau de la composition élémentaire peuvent apparaître des variations en teneur protéiques et/ou en chitine. Celles-ci sont toutefois moins documentées que les différences observées au niveau de la minéralisation ou de la structure tissulaire de la cuticule. A titre d'exemple, Skinner *et al.* (1992) ont mis en évidence la présence de variations de teneurs protéiques entre plusieurs espèces de crustacés. Les protéines concernées sont cependant majoritairement des groupements de petite taille (*i.e.* inférieurs à 31 kDa), ce qui complexifie l'identification et la différenciation de celles-ci. Plus récemment, Neues *et al.* (2007) ont utilisé des analyses rhéologiques afin de caractériser la cuticule de huit espèces d'isopodes : quatre espèces terrestres et quatre espèces marines. Après analyses, les auteurs ont notamment observé que les espèces terrestres disposaient d'une teneur en matrice organique, c'est-à-dire en protéines et en chitine, plus conservée que les espèces marines. Ce constat a été argumenté par les différences importantes des modes de vie des organismes entre écosystèmes terrestres et marins, notamment en lien avec les stratégies de défense des organismes. En milieu terrestre, lorsqu'un isopode est prédaté, il n'a d'autres choix que de courir ou de se mettre en boule, ce qui nécessite une souplesse mécanique influencée entre autres par le niveau de matrice organique. A l'inverse, le milieu marin est constitué de différentes strates, permettant une diversité accrue dans la stratégie de défense, symbolisée par la variation de teneur en matrice organique.

De manière similaire, des analyses mécaniques et rhéologiques ont permis de mettre en évidence des variations interspécifiques de la composition de la cuticule *i)* au niveau de pièces spécifiques de crustacés (pinces et céphalothorax du homard vs crabe : Bosselmann *et al.* 2007 ; Zhou *et al.* 2010 ; céphalothorax de crabe vs crevette : Shahidi & Synowiecki, 1991), *ii)* entre différentes espèces d'eaux douces (Hilton *et al.* 1984), *iii)* entre différentes espèces de malacostracés aquatiques (Pütz & Buchholz, 1991) ou encore *iv)* dans le cadre de l'étude de l'adaptation de certaines espèces de crustacés à des biotopes particuliers (Hild *et al.* 2009).

En outre, au-delà de variations au niveau de la composition de la cuticule, des études ont montré des variations interspécifiques de la nature et de l'abondance de la chitine cuticulaire (Acosta *et al.* 1993 ; Rhazi *et al.* 2000 ; Wang *et al.* 2013). Si la teneur en chitine est connue pour exercer une influence sur les propriétés structurales de la cuticule, il est légitime de se

demander si cela a également des conséquences sur la structure et l'organisation générale des couches de la cuticule.

Au niveau de l'organisation générale de la cuticule, d'importantes variations sont à noter entre les différentes espèces chez les crustacés. A ce sujet, Skinner *et al.* (1992) exposent dans une revue une liste d'exemples de diversité cuticulaire. Parmi les exemples cités, il est intéressant de mentionner le cas d'espèces de crustacés parasites ne possédant uniquement qu'une fine épicuticule en guise de structure cuticulaire totale (Hubert *et al.* 1979 ; Bresciani & Jespersen, 1985), les auteurs justifiant alors la disparition des trois autres couches comme une adaptation en lien avec le mode de vie singulier de ces organismes. La plupart des autres crustacés mentionnés varient uniquement par l'absence d'une des quatre couches cuticulaire. Par exemple, Buchholz & Buchholz (1989) ont montré chez le krill *Euphausia superba* que la couche membranaire était absente. Foster & Howse (1978) ont également observé une absence de la couche membranaire au niveau des branchies de la crevette brune *Penaeus aztecus*, soulignant alors la possible variation de structure de la cuticule selon les organes considérés. De plus, Fabritius *et al.* (2016) ont souligné les possibles variations d'épaisseur des couches cuticulaires entre les espèces de crustacés, ainsi que l'implication de sous-couches ayant des rôles complémentaires (*e.g.* présence de plusieurs couches hydrophobes formant la cuticule des isopodes terrestres afin d'éviter l'évaporation de l'eau). Ainsi, l'organisation générale, c'est-à-dire l'épaisseur et le nombre de couches cuticulaires, semblent s'adapter à la fonction du tissu, mais également au mode de vie de l'organisme considéré.

De la même manière que pour l'organisation de la cuticule, plusieurs auteurs ont reporté une adaptation de la minéralisation cuticulaire des crustacés par rapport à leurs contraintes morphologiques et environnementales (Hilton *et al.* 1984 ; Becker *et al.* 2005 ; Bosselmann *et al.* 2007 ; Neues *et al.* 2007 ; Zhou *et al.* 2010 ; Mergelsberg *et al.* 2019 ; Katsikini *et al.* 2020). Au sein d'un même individu, le type de minéralisation va être prépondérant pour l'ensemble des propriétés physiques et structurales conférées à un organe donné. Par exemple, un crabe disposera de formes de minéralisations cristallines prépondérantes au niveau de la carapace ou du bout des pinces car ces pièces doivent être solides et résistantes, au contraire des périopodes qui bénéficieront d'une abondance de formes amorphes de calcium car ces organes ont besoin de souplesse et d'adaptation mécanique (Bosselmann *et al.* 2007 ; Katsikini *et al.* 2020 : **Figure II-14**). Dans le même ordre d'idées, il est également possible d'observer de telles différences au regard du mode de vie des crustacés. Ainsi Pütz & Buchholz (1991) observent non seulement des différences dans la minéralisation des cuticules, mais également dans l'organisation globale

de cette structure en comparant des crustacés selon leurs modes de vie benthiques, nectobenthiques ou pélagiques.

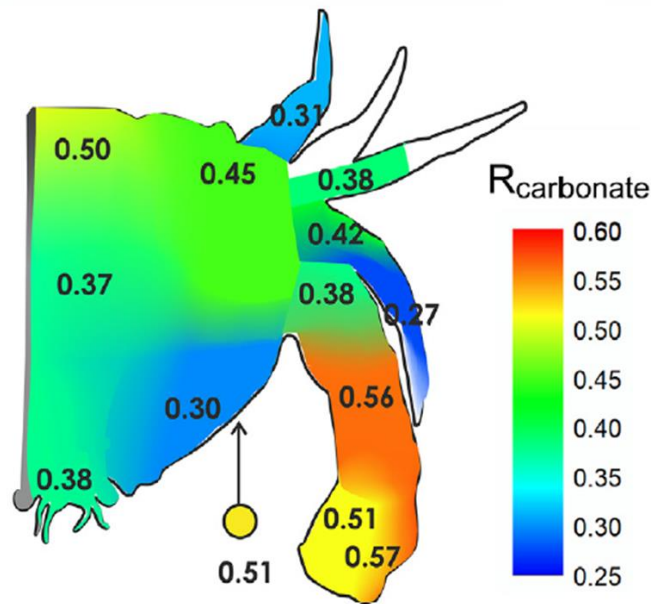


Figure II-14 Distribution spatiale du ratio de calcification dans l'exosquelette du crabe *Calappa granulata*. Le ratio $R_{\text{carbonate}}$ traduit le degré de calcification. Un fort ratio correspond à une minéralisation élevée (e.g. calcite) tandis qu'un ratio faible signifie une faible minéralisation (e.g. forme amorphe, d'après Katsikini *et al.* 2020)

Ainsi, il apparaît que de nombreux facteurs, outre le cycle de mue non mentionné ici, influencent la structure et la composition de la cuticule chez les crustacés. Cette importante variabilité naturelle de la cuticule souligne le fait qu'il est primordial d'étudier en détail les structures cuticulaires d'une espèce de crustacé donnée avant d'envisager d'utiliser cette structure dans un contexte de changements induits par des stress par exemple. En ce qui concerne les Palaemonidae, les mécanismes de régulation en lien avec la minéralisation et l'étude du cycle de mue sont relativement bien documentés mais les structures cuticulaires n'ont été que très peu étudiées, la majorité des études portant sur des espèces de crabes ou de homards. Selon Drach & Tchernigovtzeff (1967), les Palaemonidae sont des espèces de décapodes avec une cuticule faiblement calcifiée, par opposition avec les espèces de crabes et de homards dont la cuticule a été grandement décrite. Cependant, Park (1999), dans une étude sur la structure cuticulaire de la crevette *Palaemon serrifer*, n'a pas observé de couche membranaire dans la cuticule de cette espèce alors que c'est généralement le cas chez les espèces faiblement calcifiées comme les crevettes (Skinner *et al.* 1992). Ce constat souligne l'importante variabilité des structures cuticulaires à l'intérieur même des Palaemonidae et l'absence de règle générale

commune aux différentes espèces de ce groupe. Il apparaît alors important d'améliorer les connaissances autour des structures cuticulaires des Palaemonidae. De plus, ces auteurs soulignent la forte influence du stade de mue sur la structure de la cuticule et l'importance de bien suivre et identifier les différents stades représentant le cycle de mue des crustacés lors des études.

2.2.2. *Le cycle de mue : un processus régulier immuable*

2.2.2.1. Les étapes du cycle de mue au sein du cycle de développement

Le cycle de mue chez les crustacés a été initialement décrit par Drach (1939) comme une succession d'événements regroupés en trois phases principales : *i*) la postmue, période durant laquelle un organisme venant de s'extirper de son ancienne cuticule, réalise sa croissance puis fini de synthétiser et rigidifier sa nouvelle carapace ; *ii*) l'intermue, période caractérisée par une grande stabilité tégumentaire et *iii*) la prémue, démarrant par le phénomène d'apolyse (*i.e.* détachement entre les cellules épidermiques et la cuticule les bordant) et marquée par la dégradation partielle de l'ancienne cuticule menant à l'exuvie, ainsi que la synthèse de la nouvelle carapace. Depuis cette première discrétisation du cycle de mue en phases successives, de nouvelles propositions ainsi que des modifications ont été proposées, basées sur l'observation de la sétogénèse au niveau d'organes présents aux extrémités de l'organisme (*e.g.* périopodes, uropodes, brachiostégites) permettant une description plus précise. On retrouve ainsi des études comparant le déroulement du cycle de plusieurs groupes de crustacés, calcifiés ou non (Drach, 1944 ; Drach & Tchernigovtzeff, 1967). En parallèle, une description précise des stades a été réalisée sur différentes familles telles que les stomatopodes Gonodactylidae, Squillidae et Lysiosquillidae (Reaka, 1975), les crabes de l'ordre des brachyours (Skinner, 1962 ; O'Halloran & O'Dor, 1988), les homards Nephropidae (Hepper, 1965 ; Aiken, 1973), les amphipodes Gammaridae (Charniaux-Cotton, 1957 ; Geffard *et al.* 2010), les crevettes Penaeidae (Robertson *et al.* 1987 ; Chan *et al.* 1988) ou bien encore les crevettes Palaemonidae (*Macrobrachium* : Kamaruding *et al.* 2016 ; *Palaemonetes* : Freeman, 1990 ; *Palaemon* : Park, 1999 ; Erraud *et al.* 2018).

Bien que cette méthode soit communément utilisée et permette d'estimer relativement finement le déroulement du cycle de mue, l'observation de la sétogénèse au niveau des individus présente plusieurs limites (*e.g.* Longmuir 1983 ; Buchholz, 1989), dont : *i*) cette méthode est basée sur l'observation par l'expérimentateur de critères subtils et dynamiques

d'une durée parfois très courte qui peuvent être pris en compte ou non et ainsi faire varier le nombre de stades de mues décrits. Par exemple, pour ce qui concerne la prémue, la caractérisation des différents stades est basée sur l'observation de micro-événements, se déroulant sur une ou deux heures qui peuvent conduire selon les auteurs à une grande subdivision ou non de cette phase (*e.g.* Reaka, 1975) ; *ii*) cette méthode ne peut être appliquée que sur des organismes ayant les organes nécessaires pour l'identification des stades en bon état. Cependant, lors du maintien en captivité de crustacés (*e.g.* au laboratoire ou dans des systèmes d'encagement sur le terrain), la présence de membres manquants ou nécrosés est régulièrement observée (*i.e.* autotomie, combats), rend difficile les observations et la détermination des stades. Ainsi, l'identification du stade de mue par l'observation de la sétogénèse des tissus est parfois complétée par d'autres observations et analyses, favorisant la bonne identification des stades de mue. Par exemple, la mesure de mécanismes hormonaux et moléculaires sous-jacents, intervenants dans la mise en place et la dynamique de la cuticule, et produisant les changements morphologiques à l'échelle individuelle, peuvent permettre de mieux aborder le déroulement du cycle de mue en améliorant la discrimination des différents stades. De la même manière, le suivi de l'intégrité de la cuticule, et de ses propriétés pourraient permettre d'améliorer le suivi de ce processus physiologique.

Outre l'observation de la sétogénèse au niveau de membres situés aux extrémités, les premières définitions de stades étaient complétées par des observations tactiles sur l'organisme. Ainsi, aux abords de l'exuvie (*i.e.* fin prémue et début postmue), il est possible de constater un ramollissement général de la cuticule (Drach, 1939). Ce ramollissement a été d'ailleurs relativement nivelé, de telle sorte que la rigidification de certaines parties du corps pouvait aider à définir un stade de mue, particulièrement en postmue (Drach & Tchernigovtzeff, 1967). Toutefois, cette méthode semble être délicate et dépend beaucoup des capacités sensorielles de l'observateur.

2.2.2.2. La dynamique cuticulaire au cours du cycle de mue

La cuticule des crustacés voit sa structure se modifier au cours des différentes phases du cycle de mue. Ce phénomène a été décrit notamment par Skinner (1962) et Skinner *et al.* (1992) (**Figure II-15**). En intermue (**Figure II-15, Stade C**), l'organisme est dans une phase de stabilité physiologique et la cuticule est retrouvée sous sa forme basale. Ensuite, la prémue est enclenchée avec le début de l'apolyse et est caractérisée par la formation d'un espace de plus en plus important entre la couche membranaire et l'épiderme sous-jacent. A partir de ce phénomène, l'épiderme et les structures associées (*i.e.* glandes tégumentaires, cellules lipodermiques) vont s'hypertrophier pour soutenir la production de la nouvelle cuticule qui va peu à peu se mettre en place. Ainsi, en milieu de prémue, (**Figure II-15, Stade D₂ Précoce**), l'épicuticule se forme progressivement à partir des matériaux acheminés aux cellules épidermiques, tandis que l'épiderme sécrète un fluide de mue contenant les enzymes chitinolytiques, permettant de dégrader les couches inférieures de la cuticule : la couche membranaire puis l'endocuticule. Le matériel ainsi dégradé va être réabsorbé *via* les cellules bordantes puis transporté par l'hémolymphe pour être utilisé ailleurs ou stocké. En fin de prémue, l'endocuticule est dégradée tandis que l'exocuticule se forme au niveau de la nouvelle structure. Lors de l'exuvie, seules l'épicuticule et l'exocuticule seront présentes (*i.e.* aussi appelées couches pré-ecdysiales). Après l'exuvie, l'organisme entre alors en postmue (**Figure II-15, Stades A et B**). La structure épidermique va progressivement diminuer en taille afin de retrouver un niveau basal en intermue (Roer & Dillaman, 1984). Parallèlement, la minéralisation et le tannage de la cuticule vont peu à peu prendre place *via* le transport, par les canaux poreux néo-formés, des minéraux et des protéines respectivement. Le stade B est caractérisé par la synthèse progressive de l'endocuticule, qui s'achèvera en début d'intermue, tandis que la couche membranaire sera produite durant l'intermue (*i.e.* formation des couches post-ecdysiales).

Cette dynamique structurelle durant le cycle de mue est observable également sur des jeunes stades de vie, comme chez *Palaemon serrifer* (Park, 1999) où l'auteur a observé les mêmes dynamiques sur différents stades larvaires.

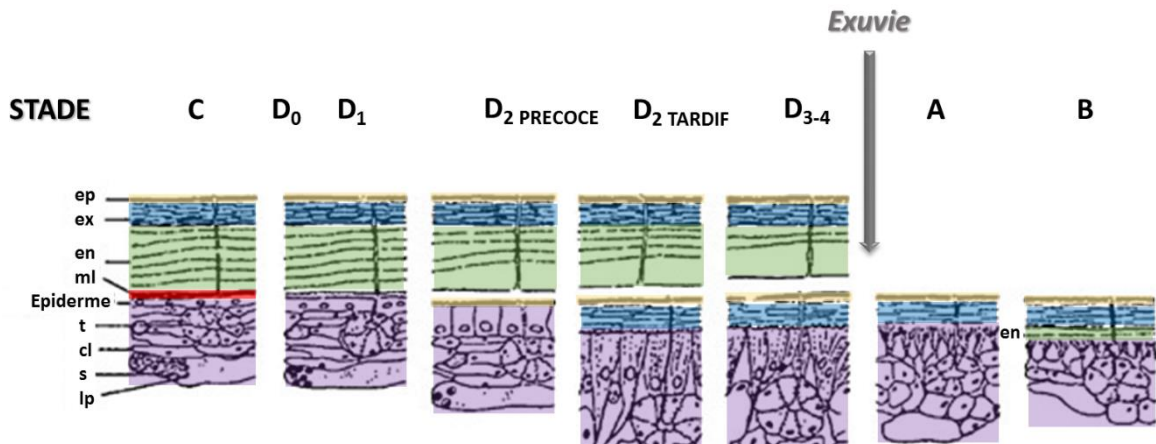


Figure II-15 Dynamique de la cuticule au cours du cycle de mue chez les crustacés. Ep : épicuticule (jaune), ex : exocuticule (bleu), en : endocuticule (vert), ml : couche membranaire (rouge), épiderme (violet) comprenant t : glande tégumentaire, cl : cellules de Leydig, s : sinus hémolymphatique, lp : cellule lipoprotéique (d'après Skinner, 1962).

Le suivi de la structure cuticulaire, de l'épaisseur des différentes couches, ou des propriétés liées à celle-ci (*e.g.* composition élémentaire, teneur en protéines, suivi de l'arrangement du réseau formé par les matériaux) est intéressant dans l'aide au suivi de la qualité de la mue chez les crustacés (Stevenson, 1985 ; Skinner *et al.* 1992 ; Pratoomchat *et al.* 2002a, b ; Promwikorn *et al.* 2005). A ce titre, Skinner *et al.* (1992) ont proposé d'utiliser les changements cuticulaires en complément des analyses sétogénétiques classiquement réalisées afin d'améliorer la définition et les limites de chaque stade de mue. Cependant, lors de telles études, il est important de bien définir l'organe d'étude sur lequel le suivi cuticulaire s'effectue, en raison de la non-synchronisation de la dynamique cuticulaire au niveau de différents organes étudiés sur un même individu (Williams *et al.* 2003 in Dillaman *et al.* 2013 ; Waugh *et al.* 2009).

2.2.2.3. La postmue : période régie par la minéralisation de la cuticule

Chez les crustacés, la minéralisation de la cuticule est une période critique pour la survie de l'organisme : sans exosquelette endurci, le maintien et le développement de l'organisme sont rapidement compromis. Pour ces organismes, l'homéostasie des éléments inorganiques et particulièrement du calcium, élément minéral majoritaire, est primordial durant le cycle de mue. Pour cela, les crustacés arborent différentes stratégies dans l'absorption et le maintien des teneurs en calcium.

Tout d'abord, l'homéostasie du calcium dépend grandement du milieu environnant de l'organisme. En effet, les teneurs internes en calcium, et par extension la minéralisation des nouvelles cuticules au cours des cycles de mues successifs, dépendent en grande partie du calcium exogène présent sous deux formes : majoritairement le calcium dissous dans le milieu et minoritairement le calcium contenu dans la nourriture. En fonction de l'abondance relative de ces deux sources de calcium dans leur milieu de vie, les organismes vont présenter des stratégies différentes. Ainsi, les crustacés terrestres et dulçaquicoles vivent généralement dans des milieux pauvres en calcium et vont entre autres *i*) profiter de la mue pour absorber et stocker de grandes quantités de calcium exogène présent dans le milieu, *ii*) déployer plusieurs stratégies visant à améliorer l'internalisation du calcium (*e.g.* transport actif du calcium *via* la mise en place de pompes de transport au niveau de zones peu cuticularisées, changements du gradient électrique et chimique au niveau de l'épithélium) , *iii*) consommer des aliments calcifiés, *iv*) réabsorber une partie du calcium présent dans l'ancienne cuticule lors de sa dégradation en prémue, voire *v*) consommer leur exuvie, source remarquable de calcium (Greenaway, 1985 ; Neufeld & Cameron, 1992 ; Wheatly, 1999 ; Zanotto & Wheatly, 2002 ; Ahearn *et al.* 2004 ; Luquet, 2012). En ce qui concerne les crustacés marins, ils ont à disposition une ressource quasi-illimitée de calcium dans leur environnement et la plupart des espèces mettent en place une absorption continue par diffusion à travers les parties faiblement cuticularisées (*e.g.* branchies : Luquet, 2012).

De plus, les crustacés, à l'exception des copépodes et cirripèdes, possèdent un système de stockage du calcium, complexifiant alors l'homéostasie de cet élément. Ces systèmes présentent une localisation et une configuration diversifiées selon les espèces. On retrouve par exemple la formation de concrétions calcaires associées au système digestif (*i.e.* caeca digestifs), des structures associées à l'hépatopancréas ou à l'estomac (*e.g.* gastrolithes chez les organismes fortement minéralisée), ou encore des formations calciques associées à une matrice organique, telles que les sphérules présentes chez les isopodes. Chez les Palaemonidae, les organes responsables du stockage du calcium sont peu connus. La majorité des études se sont intéressées à l'espèce commerciale *Macrobrachium rosenbergii* qui est une espèce majoritairement dulçaquicole et de grande taille. Ainsi, il est difficile d'extrapoler les voies de stockage de calcium de cette espèce sur des espèces de Palaemonidae de plus petite taille et vivant dans des écosystèmes marins, telles que *Palaemonetes pugio* ou *Palaemon serratus*. Selon Fieber & Lutz (1985), les acteurs majeurs de l'homéostasie du calcium chez *M. rosenbergii* sont la cuticule, en tant que zone de déposition, et l'hémolymph, en tant que

transporteur. L'hépatopancréas quant à lui possède un rôle secondaire dans l'homéostasie du calcium et ne représente que 2,3 % des réserves calciques de l'organisme. Lors du cycle de mue, les teneurs en calcium varient chez les Palaemonidae (Fieber & Lutz, 1985 ; Arlot-Bonnemains *et al.* 1986 ; Wang *et al.* 2003 ; Wilder *et al.* 2009). En prémue, elles vont augmenter dans l'hémolymph mais diminuer dans la cuticule. Des tendances similaires ont également été observées chez d'autres familles/groupes de crustacés marins (revue : Greenaway, 1985 ; brachyours : Pratoomchat *et al.* 2002b ; Calhoun & Zou, 2016). Ainsi en début de prémue, une partie des minéraux de l'ancienne cuticule est réabsorbée, augmentant les teneurs hémolymphatiques. Le calcium ainsi résorbé est alors soit stocké dans l'hépatopancréas, soit excrété par l'organisme (Greenaway, 1985). En fin de prémue, les teneurs calciques hémolymphatiques et cuticulaires augmentent en raison de l'entrée d'eau en lien avec la fragilisation de la cuticule qui survient progressivement au cours de cette période (Wilder *et al.* 2009).

Lors de l'exuvie, la teneur en calcium est la plus basse au niveau de la cuticule, se caractérisant par une structure molle. C'est au travers de ce phénomène que certains crustacés, notamment les brachyours, peuvent perdre jusqu'à 96 % de leur masse calcique (Greenaway, 1983, 1985). En postmue, les teneurs hémolymphatiques diminuent peu à peu tandis que la cuticule se calcifie progressivement, soulignant les échanges unidirectionnels entre ces deux compartiments pour que la cuticule puisse être pleinement minéralisée. A titre d'exemple, le stade B de la postmue chez *Palaemon serratus* représente le stade avec les niveaux calciques les plus faibles au niveau de l'hémolymph, puis les teneurs en calcium augmenteront ensuite jusqu'à la fin du cycle de mue (Arlot-Bonnemains *et al.* 1986). L'intermue, quant à elle, est symbolisée par la minéralisation complète de la cuticule, et, pour les crustacés en disposant, la formation complète des formes de stockages calciques. La venue de cette phase² est d'ailleurs influencée par la teneur en calcium dont dispose l'organisme : plus la concentration du calcium exogène est importante, plus le temps où le crustacé est mou est raccourci (Perry *et al.* 2001). En conséquence, le suivi des teneurs internes en calcium est potentiellement intéressant comme complément dans la détermination et la définition des stades de la postmue des crustacés.

² Concerne au moins les crustacés fortement calcifiés selon la détermination des stades de Drach (Drach & Tchernigovtzeff, 1967)

2.2.2.4. Le contrôle neuroendocrinien de la prémue

Chez l'ensemble des Arthropodes, la réalisation de la prémue est sous le contrôle principal d'une famille d'hormones communément appelées hormones de mue : les ecdystéroïdes. Chez les malacostracés, leur production est permise par la synthèse d'un précurseur, l'ecdysone, au niveau de la glande de mue, l'organe Y, situé dans le céphalothorax de l'organisme, plus précisément au niveau des pièces mandibulaires ou antennaires selon les espèces (Passano, 1960 ; Lachaise *et al.* 1993 ; Fingerman, 1997). Pour les autres classes de crustacés anciennement dits « inférieurs » (*i.e.* branchiopodes, ostracodes, cephalocarides, maxillopodes et rémipèdes), cet organe n'a pas encore été identifié. Une voie alternative pour ces derniers seraient la synthèse de cette hormone par les cellules épithéliales de l'estomac (Sumiya *et al.* 2016). La transformation des précurseurs³ en hormones actives (*i.e.* 20 hydroecdysone ou 20-HE ; ponastérone A ou PoA) est bien documentée et s'avère être similaire entre insectes et crustacés (Lachaise *et al.* 1993 ; Song *et al.* 2017). Malgré l'ensemble de ces connaissances, l'activité de la PoA chez les crustacés demeure encore inconnue, mais s'avère nécessaire pour que l'organisme réalise la mue (Techa & Chung, 2015). En ce qui concerne la 20-HE, cette hormone est aussi impliquée dans de nombreux phénomènes physiologiques chez les crustacés tels que la reproduction, la métamorphose ou encore la régénération des membres (revue par Soin *et al.* 2009).

Des dosages de la 20-HE dans l'hémolymphe et l'organe Y au cours du cycle de mue ont montré que cette hormone est présente et produite en faible quantité dans l'organisme, variant en intensité lors de la prémue (Freeman & Bartell, 1975 ; Blanchet *et al.* 1979 ; Soumoff & Skinner, 1983 ; Graf & Debelcque, 1987). Le niveau faible d'ecdystéroïdes observé au début du cycle de mue est maintenu par des sécrétions épisodiques de deux hormones neuropéptidiques : *i)* l'hormone inhibitrice de mue (MIH) qui est l'hormone connue pour avoir un rétrocontrôle sur la synthèse de 20-HE (Techa & Chung, 2015), ainsi qu'une action antagoniste de la 20-HE au niveau des tissus cibles (Freeman & Bartell, 1976) ; *ii)* l'hormone hyperglycémiante (CHH) qui est également reconnue pour avoir une action inhibitrice envers la sécrétion d'ecdysone (Chung & Webster, 2003).

³ Selon les espèces, les crustacés peuvent produire plusieurs types d'ecdysones en tant que précurseurs d'ecdystéroïdes (Chang, 1995 ; Song *et al.* 2017)

Ces hormones sont sécrétées au niveau des pédoncules oculaires des crustacés, par un complexe neuroendocrinien composé de l'organe X, centre sécrétoire des hormones, et de la glande sinusale, site terminal de stockage des produits neuro-sécrétoires (Chang, 2011).

De nombreuses études ont confirmé la localisation de ces organes par des tests d'ablation des pédoncules oculaires, qui ont conduit, lorsque l'organisme n'était pas en prémue et donc ne possédait pas des niveaux d'ecdystéroïdes élevés, à l'accélération du cycle de mue (Chang, 1995). De manière réciproque, des organismes en prémue recevant des extraits de pédoncules oculaires montraient alors un retard de mue (Freeman & Bartell, 1976). Des analyses complémentaires ont mis en évidence le potentiel de rétrocontrôle de la 20-HE sur l'organe X et la production de MIH, ainsi que sur l'ecdystéroïdogénèse elle-même (Soin *et al.* 2009 ; Chang, 2011). Ces nouvelles connaissances permettent de comprendre l'action inhibitrice d'injections exogènes de 20-HE sur la mue, occasionnant des délais dans le cycle (Chang, 1993). Ainsi, pour chaque cycle de mue, des sécrétions épisodiques de MIH/CHH sont réalisées en postmue, empêchant la synthèse d'ecdysone (Soumoff & O'Connor, 1982 ; Nakatsuji *et al.* 2009). Les demi-vies des sécrétions inhibitrices de la mue étant très faibles, cela conduit à la présence de niveaux hémolymphatiques faibles de MIH/CHH en intermue. Cette diminution permet de lever l'inhibition au niveau de l'organe Y, qui en début de prémue va synthétiser progressivement de l'ecdysone. La synthèse d'un tel composé à faible niveau va provoquer l'inhibition de la synthèse de MIH/CHH ce qui va stimuler davantage la production d'ecdysone. Ainsi, un pic de synthèse est produit en fin de mue, atteignant de grandes concentrations hémolymphatiques de 20-HE, qui vont inhiber la synthèse d'hormones par l'organe Y. Le pic de 20-HE, suivi du déclin de sa concentration hémolymphatique, permettra le déclenchement de la mue (Chang & Mykles, 2011).

Le pic d'ecdystéroïdes en fin de mue est indispensable lors de la mise en place de la mue chez les crustacés. L'hormone ainsi présente en grande quantité va agir à de nombreux endroits de l'organisme *via* la présence de récepteurs à ecdysone (EcR). La transmission du signal se poursuivra alors grâce à ces récepteurs et activeront l'expression de nombreux gènes, impliqués notamment dans la synthèse de la nouvelle cuticule, la reproduction, ou encore la dégradation cuticulaire (revue de Song *et al.* 2017, **Figure II-16**).

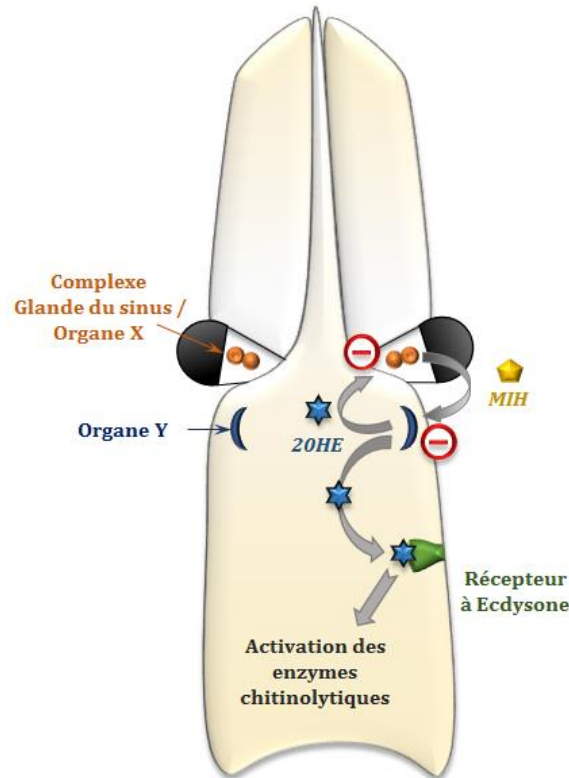


Figure II-16 Régulation de la mue chez les crustacés (d'après Song *et al.* 2017). Exemple chez les Palaemonidae : le complexe glande du sinus et organe X permet la sécrétion de la Molting Inhibiting Hormone (MIH) qui inhibe la synthèse des ecdystéroïdes (20-HE) par l'organe Y, au cours de la mue. Au cours de la prémue, les niveaux de MIH vont diminuer progressivement, favorisant la synthèse de la 20-HE qui aura un rétrocontrôle négatif sur l'organe X. La 20-HE se concentrera dans l'hémolymphe permettant sa rencontre avec les récepteurs à ecdysone (EcR) présents dans l'organisme. Parmi les EcR connus se trouvent les initiateurs de la transcription des ARNm codant pour la production d'enzymes chitinolytiques (chitinase et NAGase), dont le rôle permettra *in fine* le déclenchement de la mue (crédit : A. Duflot)

Concernant la dégradation cuticulaire, la 20-HE va activer les récepteurs EcR responsables de l'induction de l'expression et de l'activité des enzymes chitinolytiques associées à la mue (Zou & Fingerman, 1999a,d). Ces enzymes sont produites au niveau de l'épiderme sous-cuticulaire lors de la prémue, et agiront au sein du fluide de mue situé dans l'espace entre l'épiderme et l'ancienne cuticule. Le fluide de mue est composé principalement par deux types d'enzymes chitinolytiques : les chitinases et la N-acétyl- β -D-glucosaminidase (NAGase ou chitobiase), ainsi que des protéases variées, dont le rôle est de digérer l'ancienne cuticule (Reynolds *et al.* 1996). Pour ce faire, les chitinases vont hydrolyser les chaînes de chitine de manière à obtenir des oligomères glycosylés, tandis que la NAGase poursuit l'hydrolyse des oligomères en monomères appelés N-acétyl-glucosamine (NAG ; Jeuniaux, 1975). Cette action simple s'avère primordiale pour l'organisme afin de réaliser avec succès sa mue. *A contrario*, le silence de gènes exprimant les enzymes chitinolytiques a conduit à la mort en mue des organismes étudiés (revue Song *et al.* 2017).

L'expression des gènes, la purification et la caractérisation des propriétés des enzymes chitinolytiques chez les crustacés ont fait l'objet de nombreuses études (Spindler & Buchholz, 1988 ; Nanjo *et al.* 1990 ; Spindler-Barth *et al.* 1990 ; Spindler & Hopfner, 1991 ; Espie & Roff, 1995 ; Zou & Fingerman, 1999a ; Xie *et al.* 2004 ; Zhang *et al.* 2006 ; Zhang *et al.* 2014). Toutefois, malgré la diversité des crustacés étudiés, la caractérisation des propriétés (*i.e.* préférendums réactionnels) des enzymes chitinolytiques des Palaemonidae n'a pas encore été réalisée. En revanche, le suivi de la NAGase au cours du cycle de mue a été réalisé chez *Palaemon serratus*, révélant, à l'instar d'autres crustacés, un pic d'activité en fin de prémue (Buchholz, 1989 ; Spindler-Barth *et al.* 1990 ; Kono *et al.* 1995 ; Zou & Fingerman, 1999a). Ce pic est ainsi étroitement lié au pic de 20-HE le précédant (Zou & Fingerman, 1999d). Pour renforcer cet argument, il est intéressant de noter que, tout comme la 20-HE, la coupe des pédoncules oculaires entraîne une augmentation de l'expression des gènes codant pour les enzymes chitinolytiques épidermiques (Salma *et al.* 2012). L'ensemble des connaissances acquises sur ces enzymes chitinolytiques, la facilité technique pour suivre leur activité (du moins pour l'activité de la NAGase, voir le chapitre 'Matériel et Méthodes' en section 3.2.2.), ainsi que le lien direct avec la mue font des enzymes chitinolytiques des cibles de choix pour étudier le bon déroulement de la mue en fin de cycle, ainsi que pour identifier le moment où survient l'exuvie.

2.2.2.5. La mue : un processus sous l'influence de facteurs physiologiques et environnementaux

Malgré la nécessité pour les crustacés de réaliser avec succès leur cycle de mue, plusieurs facteurs physiologiques et environnementaux peuvent exercer une influence sur celui-ci, accélérant ou retardant sa réalisation.

Parmi les facteurs physiologiques, nous avons déjà cité l'ablation des pédoncules oculaires, empêchant l'inhibition de la synthèse de 20-HE ce qui conduit, pour les organismes en postmue ou en intermue, au raccourcissement drastique de la durée du cycle de mue. Un autre facteur physiologique ayant fait l'objet de plusieurs investigations est l'autotomie des membres ainsi que la régénération succédant ce processus. L'autotomie est la perte d'un membre qui survient majoritairement après un stress important ou à la suite de comportements de prédation. Ce processus de défense physiologique a été montré comme exerçant une influence sur le cycle de mue, plus particulièrement selon le moment où survient la perte du ou

des membres (Skinner, 1985 ; Mykles, 2001). Ainsi, lorsque l'autotomie survient en début de cycle de mue, celui-ci est raccourci tandis que lors de la prémue, la fin du cycle est décalée pour permettre au membre de se régénérer partiellement (McCarthy & Skinner, 1977 ; Skinner, 1985). De la même manière, l'influence sur la mue semble dépendre du nombre de membres perdus et de l'importance de ceux-ci. Ainsi, une perte d'un simple membre semble avoir peu d'influence comparée à des pertes multiples (Smith, 1990). De plus, la perte d'une pince chez un crabe engendre un effet plus important que la perte d'un périopode (Darnell *et al.* 2018). L'ablation du pédoncule oculaire, couplée à l'ablation de membres importants conduisent également au rallongement du cycle de mue chez des crustacés en prémue, suggérant la présence d'un facteur indépendant des hormones MIH/CHH (Skinner, 1985 ; Mykles, 2001). Les effets sur la mue semblent néanmoins être visibles qu'à la première mue observée, le cycle de mue suivant permettant de stabiliser la régulation interne (Smith, 1990). En parallèle, les changements d'osmolalité de l'hémolymph, en particulier chez des familles hypo-osmorégulatrices comme les crevettes Palaemonidae et Penaeidae, pourraient également aboutir à une dérégulation du cycle de mue (Ferraris *et al.* 1987 ; Charmantier *et al.* 1994 ; Lignot *et al.* 2000). Cette hypothèse permettrait d'expliquer les inductions de mue observées de manière empirique sur des crevettes ayant subi une ponction hémolymphatique, réalisant leur mue dans les jours succédant cette manipulation.

Afin de réaliser avec succès leur cycle de mue, les crustacés dépendent également du milieu dans lequel ils se développent. Plusieurs facteurs environnementaux ont été identifiés comme pouvant accroître ou raccourcir la période de réalisation du cycle de mue, l'exemple le plus connu étant la température du milieu. Ainsi, une élévation de température génère un raccourcissement du cycle de mue (Richard, 1978 ; Campillo, 1979 ; Poleck & Denis, 1982 ; Montagna, 2011 ; Chaumot *et al.* 2019). Ce constat semble logique compte tenu de l'élévation métabolique due aux hausses de températures chez les organismes poïkilothermes. Toutefois, ce propos est à nuancer avec des températures extrêmes, entraînant la mort des organismes. De manière réciproque, une température trop froide du milieu est à l'origine d'un ralentissement du cycle de mue (Passano, 1960). Ce ralentissement explique les observations obtenues sur les populations en hiver, ayant un ralentissement de leur mue et de leur reproduction (Campillo, 1979).

Couplée à ce constat saisonnier, la photopériode semble jouer un rôle dans la réalisation du cycle de mue, plus précisément dans la production d'hormones telles que la 20-HE ou la MIH. Selon Aiken (1969), d'après les résultats observés sur des écrevisses *Orconectes virilis*

in situ et en laboratoire, la sécrétion de MIH serait inhibée par la lumière, tandis que la 20-HE le serait par l'obscurité (**Figure II-17**). Cependant, des résultats similaires ont été observés sur des écrevisses résidant au sein de cavernes dépourvues de lumière, remettant en cause cette hypothèse (Jegla, 1965). Aujourd'hui, si le rythme circadien des crustacés est soupçonné d'influencer le cycle de mue, les raisons quant à cet effet demeurent encore mal connues (Dalley, 1980 ; Dolnik & Gavrilov, 1980 ; Song *et al.* 2017).

Enfin, la qualité physico-chimique du milieu où résident les organismes est important pour leur développement, des changements naturels pouvant influencer le déroulement du cycle de mue. Par exemple, les organismes marins soumis à des salinités extrêmes présenteront des difficultés à réguler leur osmolarité interne, entraînant des défauts dans la régénération des membres et l'exuvie de l'exosquelette (Shock *et al.* 2009). L'exuvie et la mise en place de la nouvelle cuticule étant des processus très coûteux en énergie et en matériaux (*i.e.* calcium, phosphore, nutriments), le milieu de vie apparaît comme un élément très important dans la capacité de l'organisme à assurer un bon développement. Ainsi, une étude sur le crabe bleu *Callinectes sapidus* (Perry *et al.* 2001) a montré dans des environnements pauvres en calcium une augmentation du temps nécessaire pour le ramollissement de la cuticule au moment de l'exuvie. De même, des délais de mue ont été observés chez des crustacés d'eau douce vivant dans des environnements avec de faibles apports en calcium, phosphore ou acides gras lors de leur développement (Meyran, 1998 ; Rukke, 2002 ; Cairns & Yan, 2009 ; Rollin *et al.* 2018). De tels délais pourraient être attribués au temps nécessaire pour que l'organisme puisse achever avec succès sa mue (Meyran, 1998). Chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum*, espèce où le cycle de mue et le cycle de reproduction sont fortement corrélés, l'allongement du cycle de mue a été montré comme pouvant avoir des conséquences sur la dynamique des populations (Coulaud *et al.* 2015), soulignant l'importance de l'environnement dans le développement des crustacés, ainsi que la réalisation de leur cycle de mue.

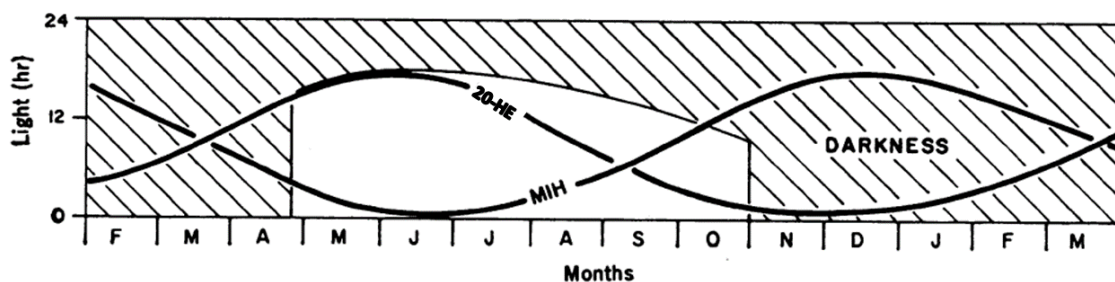


Figure II-17 Influence supposée des ecdystéroïdes (20-HE) et de la Moulting Inhibiting Hormone (MIH) sur les crustacés selon la photopériode (d'après Aiken, 1969)

Synthèse de la partie 2

La mue chez les crustacés

- **La mue, une particularité physiologique clé**
 - Intervient dans la réalisation des traits de vie
 - Intervient dans la respiration, résistance aux chocs (Olesen *et al.* 2013)
 - Rôle de barrière et de résistance à la dessiccation, permettant la colonisation de tous les écosystèmes

- **La cuticule, une structure conservée et variable**
 - Trois matériaux prépondérants : chitines, protéines et sels inorganiques
 - Quatre couches principales : épicuticule, exocuticule, endocuticule et couche membranaire
 - Adaptation de la composition et de la structure selon l'espèce, le milieu et le mode de vie
 - Très peu de données chez les crevettes Palaemonidae.

- **Le cycle de mue, du stade larvaire à la mort des organismes**
 - Trois phases principales : postmue, intermue et prémue
 - Des modifications morphologiques sous l'influence de mécanismes neuroendocriniens
 - Une succession d'événements pouvant aider à caractériser chaque stade de mue (minéralisation en postmue, activités chitinolytiques en prémue...)
 - Une réalisation influencée par des facteurs intrinsèques et extrinsèques tels que la régénération des membres, la photopériode, la température et la chimie du milieu environnant.

2.3. La perturbation de la mue : connaissances et marqueurs disponibles

2.3.1. La mue : une perturbation silencieuse mais visible

A partir des années 1950, l'essor des études centrées sur la biologie des Arthropodes a apporté de nombreuses connaissances relatives au développement de ces organismes ainsi qu'à la réalisation de leurs traits de vie, essentiellement la reproduction et la croissance (auxquelles la mue est associée). Concernant le phénomène de mue, cela s'est traduit par l'acquisition de savoirs centrés sur le déroulement du cycle de mue, l'influence de paramètres environnementaux et la régulation du processus de mue (Travis, 1954 ; Passano, 1960 ; voir section 2.2.2.). Ce dernier savoir permettra, entre autres, la production d'insecticides efficaces contre les organismes ravageurs, mais entraînera également des conséquences néfastes sur les espèces non-cibles (Leblanc *et al.* 1999). Parallèlement, c'est à cette même période que commenceront à apparaître les faisceaux de preuves de la toxicité des rejets anthropiques sur les espèces, dont les crustacés (*e.g.* Freeman & Fauler, 1953 ; Sanders, 1969). Ces preuves mettent principalement en évidence l'altération par les xénobiotiques de la survie des organismes, sans toutefois mentionner d'effets sur les traits de vie. Ce n'est que plus tard, dans les années 1970, que l'émergence de données mentionnant l'apparition d'altérations de la mue chez des crustacés exposés à des contaminants modèles (*i.e.* insecticides, métaux lourds) se réalise (Epifanio, 1971 ; Shealy *et al.* 1975 ; Weis & Mantel, 1976). Par la suite, l'avènement progressif *i)* d'espèces modèles étudiables en laboratoire et permettant la réalisation d'un screening de molécules, *ii)* de nouvelles technologies améliorant les connaissances en biochimie et biologie moléculaire, ainsi que *iii)* d'une nouvelle sous-discipline de l'écotoxicologie appelée « perturbation endocrinienne » et relançant l'effort de recherche dans la compréhension des altérations sub-individuelles par les xénobiotiques (McLachlan, 2001), apporteront un élan dans la recherche des mécanismes de régulation et d'altération de la mue chez les crustacés (**Figure II-18**). A l'heure actuelle, le constat est toutefois paradoxal : si une quarantaine de composés chimiques a été révélée comme perturbant la réalisation de la mue (**Tableau II-2**), et si l'action de plusieurs dizaines d'autres molécules peut atteindre des cibles moléculaires intervenant dans la mise en place du cycle de mue, la majorité des études permettant ce constat a été réalisée en conditions contrôlées de laboratoire. Ainsi, en raison du manque de méthodologie permettant la transition entre l'observation du processus de mue en laboratoire et celle *in situ*, le diagnostic de la qualité de mue des populations sauvages est encore à ce jour très compliqué.

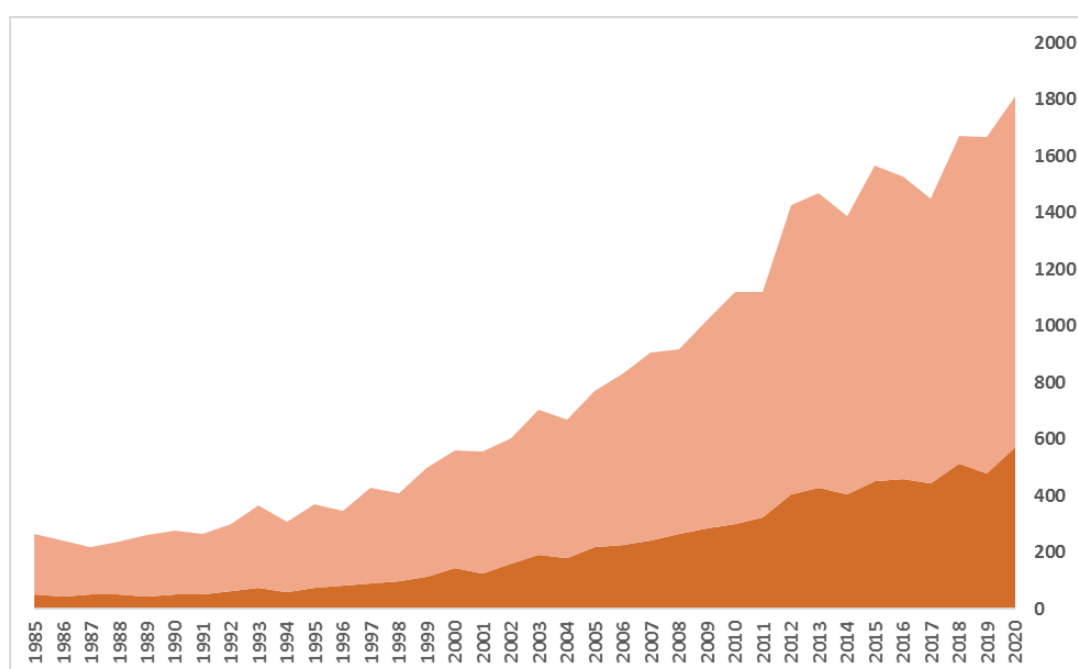


Figure II-18 Bibliométrie relative aux recherches sur la régulation et l'altération du processus de mue chez les crustacés. L'aire en rose et celle en orange représentent respectivement le nombre d'itérations obtenues par la recherche de « molt regulation crustacea » et « molt disruption crustacea » sur le moteur de recherche Google scholar.

Tableau II-2 Liste des composés chimiques induisant l'altération des descripteurs individuels de la mue chez les crustacés (adapté de Zou, 2020).

Substance	Espèce	Marqueur individuel	Effet	Auteur
5-chloro-1-H-benzotriazole	<i>Daphnia magna</i>	Nombre de mue après 21 jours	Inhibition	Giraud et al. (2017a)
5-méthyl-1-H-benzotriazole	<i>Daphnia magna</i>	Nombre de mue après 21 jours	Stimulation	Giraud et al. (2017a)
Aroclor 1242	<i>Daphnia magna</i> <i>Uca pugilator</i>	Taux de mue Durée de réalisation de 4 mues	Inhibition Inhibition	Fingerman & Fingerman (1977) Zou & Fingerman (1999b)
Atrazine	<i>Daphnia magna</i>	Durée d'intermue	Inhibition	Palma et al. (2009)
Benzène	<i>Callinectes sapidus</i>	Durée d'intermue	Inhibition	Cantelmo et al. (1981)
Bisphénol A	<i>Porcellio scaber</i>	Taux de mue	Inhibition	Lemos et al. (2009)
Cadmium	<i>Chasmagnatus granulata</i> <i>Uca pugilator</i>	Taux de mue Durée d'intermue	Inhibition Inhibition	Moreno et al. (2003) Weis (1986)
Carbamazépine	<i>Daphnia similis</i>	Nombre de mue après 21 jours	Inhibition	Chen et al. (2019)
Chlorpyrifos	<i>Palaemonetes argentinus</i> <i>Homarus americanus</i>	Durée d'intermue Durée d'intermue	Inhibition Inhibition	Chen et al. (2019)
Clomitrazone	<i>Palaemon serratus</i>	Durée d'intermue	Inhibition	Gonzalez-Ortegon et al. (2015)
Chrysène	<i>Penaeus monodon</i>	Nombre de mues	Stimulation	Vrinda et al. (2019)
Cuivre	<i>Eriocheir sinensis</i>	Taux de mue	Inhibition	Yang et al. (2006)
Cyperméthrine	<i>Palaemonetes argentinus</i>	Durée d'intermue	Inhibition	Collins & Capello (2006)
P-p' DDT	<i>Uca pugilator</i>	Taux de mue	Stimulation	Weis & Mantel (1976)
Deltaméthrine	<i>Daphnia magna</i>	Nombre de mue après 21 jours	Inhibition	Toumi et al. (2013)
Diéthylphthalate	<i>Daphnia magna</i>	Durée de réalisation de 4 mues	Inhibition	Zou & Fingerman (1997)
Diéthylstibestrol	<i>Daphnia magna</i>	Fréquence de mue Durée de réalisation de 4 mues	Inhibition Inhibition	Baldwin et al. (1995) Zou & Fingerman (1997)
Diméthylnaphtalène	<i>Callinectes sapidus</i>	Durée d'intermue	Inhibition	Cantelmo et al. (1982)
Dioxyde de titane	<i>Daphnia magna</i>	Durée d'intermue	Inhibition	Dabrunz et al. (2011)
Benzoate d'émaméctine	<i>Homarus americanus</i>	Induction de mue prématurée	Stimulation	Waddy et al. (2002)
Endosulfan	<i>Daphnia magna</i> <i>Palaemonetes argentinus</i>	Durée d'intermue Durée d'intermue	Inhibition	Palma et al. (2009) Montagna & Collins (2007)
Sulfate d'endosulfan	<i>Daphnia magna</i>	Durée d'intermue	Inhibition	Zou & Fingerman (1997)
Etofenprox	<i>Daphnia magna</i>	Taux de mue	Inhibition	Sancho et al. (2018)

Tableau II-2 (suite)

Substance	Espèce	Marqueur individuel	Effet	Auteur
Fenoxycarb	<i>Homarus americanus</i>	Durée d'intermue	Inhibition	Arnold et al. (2009)
Heptachlor	<i>Homarus americanus</i>	Durée d'intermue	Inhibition	Snyder & Mulder (2001)
Képone	<i>Callinectes sapidus</i>	Nombre de mues après 56 jours	Inhibition	Schimmel et al. (1977)
Mercure	<i>Uca pugilator</i>	Durée d'intermue	Inhibition	Weis et al. (1986)
Méthoprene	<i>Daphnia magna</i>	Durée d'intermue	Inhibition	Omstead & Leblanc (2001)
Méthoxychlor	<i>Daphnia magna</i>	Nombre de mues après 21 jours	Inhibition	Baer & Owens (1999)
Nitrite	<i>Daphnia similoides</i>	Nombre de mues après 21 jours	Inhibition	Xiang et al. (2011)
Nonylphénol	<i>Americamysis bahia</i>	Nombre de mues	Inhibition	Hirano et al. (2009)
Noradrénaline	<i>Daphnia magna</i>	Durée d'intermue	Inhibition	Overturf et al. (2015)
PBDE 28	<i>Daphnia magna</i>	Durée de réalisation de 4 mues	Inhibition	Davies & Zou (2012)
PBDE 47	<i>Daphnia magna</i>	Nombre de mue après 5 jours	Inhibition	Davies & Zou (2012)
PCB 29	<i>Daphnia magna</i>	Durée de réalisation de 4 mues	Inhibition	Zou & Fingerman (1997)
Pétrole brut (fraction soluble)	<i>Callinectes sapidus</i>	Durée d'intermue	Inhibition	Wang & Stickle (1987)
Plomb	<i>Uca pugilator</i>	Durée d'intermue	Inhibition	Weis (1976)
Ponastérone A	<i>Daphnia magna</i>	Succès de mue	Inhibition	Baldwin et al. (2001)
RH 5849	<i>Rhithropanopeus harrisii</i>	Durée jusqu'à métamorphose	Stimulation	Clare et al. (1992)
Selenium	<i>Daphnia magna</i>	Taux de mue	Inhibition	Schultz et al. (1980)
Simazine	<i>Daphnia pulex</i>	Durée d'intermue	Inhibition	Fitzmayer et al. (1982)
Triclosan	<i>Daphnia magna</i>	Nombre de mues après 21 jours	Inhibition	Peng et al. (2013)
Tris (2-butoxyéthyl) phosphate	<i>Daphnia magna</i>	Nombre de mues après 21 jours	Inhibition	Giraud et al. (2017b)
Vinclozolin	<i>Porcellio scaber</i>	Taux de mue	Inhibition	Lemos et al. (2009)
Zinc	<i>Neohelice granulata</i>	Durée d'intermue	Inhibition	Beltrame et al. (2010)

2.3.2. Quels sont les marqueurs adaptés à la détection d'altérations de la mue in natura ?

Au cours des différentes études portant sur l'altération du processus de mue, de multiples marqueurs ont été utilisés afin d'améliorer la compréhension du mode d'action des contaminants. Ces marqueurs, bien qu'inégalement utilisés, peuvent être répartis en trois groupes selon leur position dans le déroulement de la mue et l'échelle d'observation utilisée (**Figure II-19**). Parmi ces groupes, les descripteurs individuels (ou descripteurs généraux de la mue), figurent parmi les paramètres les plus utilisés dans un contexte de monitoring de la mue chez les crustacés. Ces descripteurs, centrés sur l'observation globale du bon déroulement du cycle de mue, ont été les principaux paramètres mesurés dans un contexte précis d'altération de mue (*i.e.* mesure du bon déroulement de la mue dans au moins 39 % des 146 publications comptabilisées). Cette valeur est d'ailleurs sous-estimée compte tenue de l'utilisation de tels paramètres couramment employés lors d'analyses de croissance, comprenant une exposition sur un ou plusieurs cycles de mue (*e.g.* Geffard *et al.* 2010 ; Rollin *et al.* 2018). En second lieu figurent les descripteurs moléculaires de la mue, pouvant être séparés en deux groupes distincts : les descripteurs associés à la régulation hormonale et ceux présents en aval de ladite régulation. Ces deux catégories de descripteurs sont majoritairement représentées par respectivement l'analyse de la synthèse et de l'activité des ecdystéroïdes (19 %) et par l'évaluation de l'activité de la NAGase (23 %).

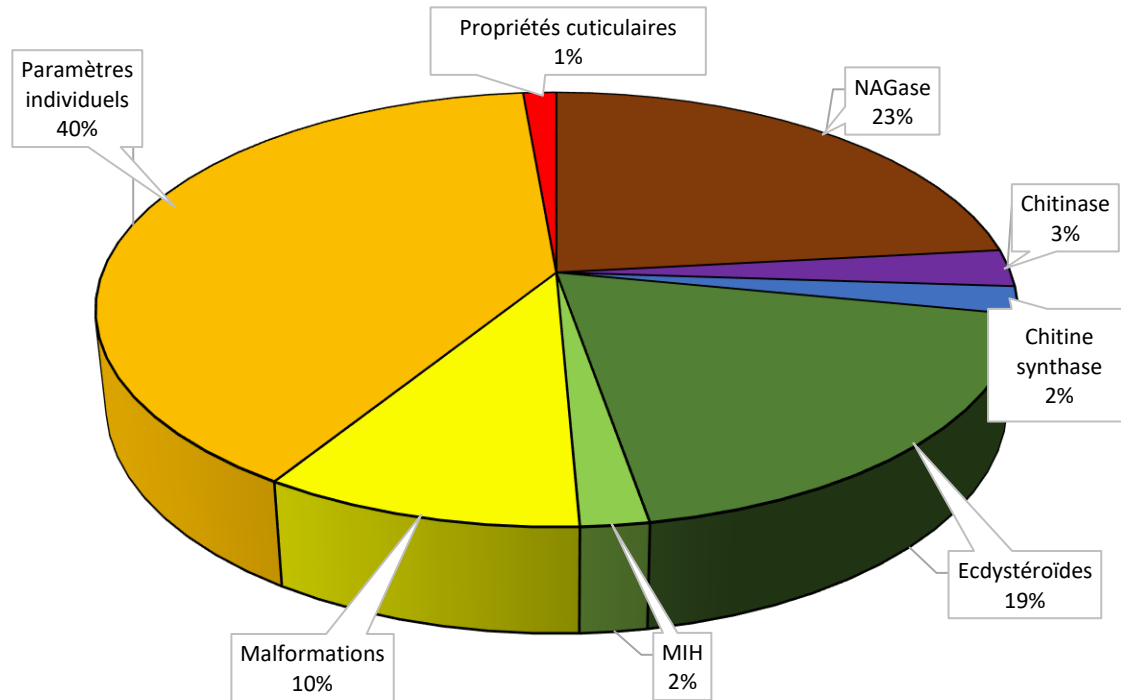


Figure II-19 Marqueurs de mue utilisés pour diagnostiquer l'altération du processus de mue chez les crustacés. Chaque pourcentage a été calculé sur les 146 publications scientifiques recensées dans ce travail bibliographique (crédit : M. Rollin).

Parmi les 146 publications dénombrées sur le diagnostic d'altération du processus de mue, seules 11 d'entre elles étaient réalisées en condition *in natura*, traduisant le fort manque de connaissances sur la qualité de la mue des populations sauvages de crustacés. Ce large contraste tire en partie son origine de la complexité à déployer et interpréter les différents descripteurs disponibles. En effet, si l'utilisation des marqueurs de mue requiert certains prérequis tels que la synchronicité des stades de mue des organismes, ces conditions sont encore plus difficiles à obtenir *in natura*. Une alternative possible serait d'accroître le nombre d'organismes étudiés, afin de couvrir une vaste gamme de stade, cependant cette mesure « haut débit » serait difficilement réalisable pour des mesures logistiquement lourdes (*e.g.* mesure de la teneur en ecdystéroïdes). Chez les décapodes, l'ablation des pédoncules oculaires permet en un sens d'obtenir une majorité d'individus synchronisés dans leur stade de mue. Cette technique consiste à retirer le complexe organe X / glande sinusale, retirant ainsi la MIH dans l'équation du déroulement de la mue, ce qui *in fine* déclenche la mue dans de brefs délais après l'opération (*e.g.* Bizot-Espiard, 1980 ; Chang, 1985 ; Okumura & Aida, 2001 ; Tamone *et al.* 2005). Cette technique, déjà utilisée au cours de bioessais visant à diagnostiquer la présence d'altérations de mue (*e.g.* Reddy *et al.* 1994 ; Rodriguez *et al.* 2002 ; Luo *et al.* 2015), pourrait ainsi être utilisée

lors d'encagements d'individus. Toutefois, le stress occasionné par la dissection est susceptible d'interférer dans la réponse des marqueurs suivis, pouvant induire des biais d'interprétation. Face à ces difficultés, il apparaît clairement que le déploiement de marqueurs de mue sur le terrain repose au préalable sur l'optimisation des protocoles de mesures des marqueurs analysés, et l'adaptation des réponses mesurées face aux nombreux facteurs de variation partiellement maîtrisables dans ce contexte (*e.g.* température ; salinité ; physiologie des organismes)

2.3.2.1. Les descripteurs généraux de la mue : ultimes observations avant l'atteinte à la survie

Parmi les descripteurs généraux de la mue classiquement analysés chez les crustacés à la suite d'exposition à des contaminants, le temps d'intermue, le succès de mue et le nombre de mue en un temps donné ont été les premiers à permettre de mettre en évidence des altérations de la mue (*e.g.* Freeman & Fauler, 1953). Ces descripteurs individuels présentent l'intérêt d'être relativement faciles à étudier et représentent souvent le dernier maillon visible lors d'une dérégulation de la mue : le silence ou la dérégulation de gènes en amont mènent bien souvent à des retards de mue voire la mort de l'organisme tentant d'effectuer cette dernière (Song *et al.* 2017). A ce jour, de tels marqueurs ont été utilisés pour évaluer la capacité de 59 composés à perturber la mue chez les crustacés. Parmi ces composés, 46 ont montré une telle capacité, regroupant diverses familles de molécules telles que des métaux lourds, HAPs, pesticides, substances médicamenteuses, ou encore substances émergentes, à l'image des nanoparticules (**Tableau II-2**). De l'ensemble des 46 composés, seuls cinq ont été mis en évidence pour stimuler le déroulement de la mue, dont deux substances utilisées dans les pesticides (*e.g.* benzoate d'émamectine, p'-p- DDT), un hydrocarbure (*e.g.* chrysène), un agoniste des ecdystéroïdes (*e.g.* RH5849) et un additif anticorrosif (*e.g.* 5-méthyl-1-H-benzotriazole). Toutefois, l'utilisation de ces marqueurs seuls ne permet pas de renseigner précisément la nature de la perturbation. Ce point est d'autant plus important que la perturbation observée à cette échelle, à l'image d'un délai de mue, peut tirer son origine d'autres causes qu'une dérégulation du processus de mue, et être issue de perturbations métaboliques ou de dérégulations de la balance énergétique mise à contribution pour lutter contre l'entrée du contaminant. Ainsi, pour obtenir un diagnostic fiable grâce à ces marqueurs, il est nécessaire d'inclure en parallèle d'autres mesures, telles que l'analyse des réserves énergétiques, dans tout plan expérimental dont l'objectif est de détecter de manière spécifique des altérations de mue, complexifiant alors le processus.

Les descripteurs généraux de la mue ont très majoritairement été utilisés en conditions contrôlées de laboratoire et très peu lors d'études *in situ*. En effet, pour mettre en œuvre ces marqueurs lors d'approches *in situ*, il est nécessaire de pouvoir bénéficier de mesures dynamiques sur le terrain, généralement *via* l'encagement d'organismes, et de pouvoir monitorer précisément le cycle de mue des organismes (*i.e.* des prélèvements passifs d'organismes ne sont alors pas pertinents). De telles approches ont pu être menées sur des petits crustacés, notamment chez l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*, cette espèce étant pertinente pour étudier des altérations des marqueurs généraux de la mue *in situ* car *i)* les organismes sont de petite taille et souvent présents en densités importantes au sein des cours d'eau facilitant la logistique de manipulations *in situ* ; *ii)* elle est couramment encagée lors d'expérimentation *in situ* (Lacaze *et al.* 2011 ; Coulaud *et al.* 2011 ; Chaumot *et al.* 2015 ; Chaumot *et al.* 2019) ; *iii)* elle présente une synchronicité entre état de reproduction et état de mue permettant la disponibilité de nombreux individus synchronisés au niveau de leur cycle de mue (Geffard *et al.* 2010). Ainsi, Lopes *et al.* (2020) ont pu mettre en évidence des délais de mue important lors d'encagement réalisés dans des sites contaminés. Pour des organismes plus grands tels que les décapodes, l'analyse *in situ* des paramètres généraux de la mue est possible, mais requiert en premier lieu de fortes connaissances zootechniques pour l'encagement des organismes, ainsi qu'une lourde logistique quant à la recherche d'organismes synchronisés en taille et dans leur cycle de mue.

Décrites depuis quelques décennies, les déformations morphologiques et cuticulaires observées chez les crustacés questionnent quant au lien potentiel de ce phénomène à d'éventuelles altérations de la mue. La présence de ce genre d'anomalies a principalement été documentée lors de collecte d'organismes *in natura* (Béguer *et al.* 2008 ; Grave & Mentlak, 2008 ; Feuillassier *et al.* 2012 ; Zambrano *et al.* 2017), mais également à la suite d'expositions *in vivo* à des xénobiotiques (Samuelsen *et al.* 2014 ; Gonzalez-Ortegón *et al.* 2015a ; Olsvik *et al.* 2019). Des déformations morphologiques en lien avec l'exposition à des xénobiotiques ont été décrites sur divers décapodes, incluant des Nephropidae (Samuelsen *et al.* 2014), des Portunidae (Pates *et al.* 2017), des Thalassanidae (Nanri *et al.* 2010) ; des Ocypopidae (Oliveira *et al.* 2012 ; Zambrano *et al.* 2017), ainsi que des Penaeidae (Hendrickx & Aguirre, 2005 ; Betancourt-Lazano *et al.* 2006). En Europe, la majorité des études a été réalisée sur des crevettes Palaemonidae incluant les espèces *Palaemon adspersus*, *Palaemon longirostris* et *Palaemon serratus* (Aurousseau, 1984 ; Béguer *et al.* 2008 ; Béguer *et al.* 2010 ; Feuillassier *et al.* 2012 ; Gonzalez-Ortegón *et al.* 2015a ; Lévesque *et al.* 2018). Les malformations sont généralement

observées majoritairement au niveau des organes situés aux extrémités de l'organisme, tels que le rostre, les branchiostégites, le céphalothorax, les péréiopodes, les uropodes ou le telson (**Figure II-20**), et peuvent être cumulées. A ce titre, Lévesque (2018) a proposé une échelle de sévérité des malformations selon l'endroit où celles-ci surviennent, et leur létalité potentielle. Si la cause des déformations observées est majoritairement liée à l'exposition à un stress chimique, la présence de ces anomalies peut avoir d'autres origines telles que la suite de blessures (Shelton *et al.* 1981), la présence de parasites (Primavera & Quinitio, 2000), l'exposition à de basses températures (Pandourski & Evtimova, 2009), voire des causes génétiques (Oliveira *et al.* 2012). En ce sens, l'application des anomalies morphologiques en tant que potentiel marqueur d'altération de mue est à réaliser avec précaution, notamment à travers l'utilisation de marqueurs complémentaires retranscrivant l'état de la mue et des réserves énergétiques.

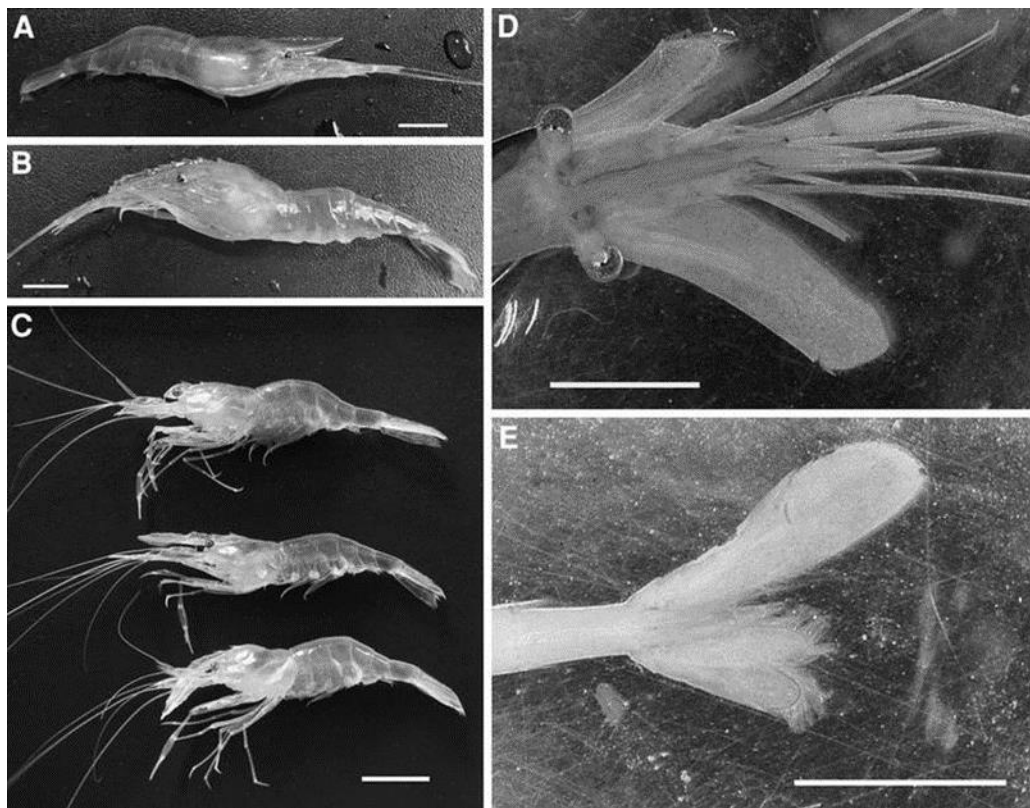


Figure II-20 Exemples d'anomalies morphologiques observées chez la crevette blanche *Palaemon longirostris* : organisme normal (A), déformations du rostre et du céphalothorax (B), déformations du rostre (C), hypertrophie des scaphocértes (D), hypertrophie des uropodes (E) (source : Béguer *et al.* 2008).

2.3.2.2. L'altération de la régulation hormonale : une atteinte directe au processus de mue ?

Hormis quelques études ponctuelles présentant l'action des contaminants sur la synthèse de MIH (*e.g.* De Melo *et al.* 2019a), la majorité des connaissances établies sur la perturbation de la régulation hormonale de la mue se focalise sur une cible générale : les ecdystéroïdes. Ces hormones de mue ont d'ailleurs été les cibles moléculaires les plus étudiées lors des études sur l'altération du processus de la mue chez les insectes et les crustacés (**Tableau II-3**). De manière générale, les contaminants exercent deux mécanismes d'action différents sur ces cibles moléculaires : la perturbation de la synthèse et du niveau général d'ecdystéroïdes, ainsi que la perturbation de l'activité de celles-ci (*i.e.* compétition au niveau des récepteurs EcR, différence de transcription des EcR). De tels constats reposent sur des études réalisées exclusivement en conditions contrôlées de laboratoire (*in vitro* et *in vivo*). Au cours de ces études, la perturbation du niveau d'ecdystéroïdes a été le paramètre le moins mis en évidence. Il a été mesuré principalement lors d'expositions *in vivo*, dont l'analyse reposait sur la mise en place de techniques d'immunomarquage parfois lourdes à mettre en place. Ces techniques ont néanmoins permis de révéler des altérations du niveau d'ecdystéroïdes à la suite d'une exposition au cadmium chez les Gammaridae (Abidi *et al.* 2016), au cuivre chez les Carcinidae (Lye *et al.* 2008), ou encore au 4-nonylphenol chez les Varunidae (Yang *et al.* 2008). Chez les Palaemonidae, cette technique a été utilisée afin de démontrer le pouvoir inhibiteur du fénoxycarbe, et stimulateur du pyriproxifène sur le niveau d'ecdystéroïdes chez la crevette *Palaemonetes pugio* (Tuberty & McKenney, 2005).

Parallèlement, plusieurs essais ont été réalisés afin de démontrer une perturbation de l'activité des ecdystéroïdes par les contaminants. Par exemple, Dinan *et al.* (2001) ont réalisé un screening de contaminants modèles et présents dans l'environnement (*e.g.* HAP, pesticides, composés pharmaceutiques) à partir d'un test réalisé sur les cellules B_{II} de la drosophile *Drosophila melanogaster*. Ces cellules, disposant d'EcR spécifiques, ont été mises dans un milieu contenant de la 20-HE, ainsi que le contaminant d'intérêt, permettant alors de mettre en évidence l'action agonistique ou antagonistique de la substance par rapport à l'activité 20-HE. Ainsi, sur les 110 composés testés, 30 substances ont présenté une activité antagoniste, tandis que 5 autres composés ont montré une activité agoniste à la 20-HE. Plus récemment, avec le progrès des techniques de biologie moléculaire, le séquençage et l'expression des gènes associés aux EcR a permis de tester l'effet des contaminants sur davantage d'espèces, modèles ou non. Chez les Palaemonidae, cette technique a été employée sur la crevette *Macrobrachium potiuna*, permettant de mettre en évidence une élévation significative du niveau de transcription

des gènes *ecr* chez des mâles exposés à des herbicides à base de glyphosate (De Melo *et al.* 2019b).

Ainsi, l'étude des altérations de la régulation hormonale de la mue, plus particulièrement de la synthèse et de l'activité des ecdystéroïdes, offre des marqueurs pertinents dans la détection d'altération directe de l'altération de la mue (Soin *et al.* 2009). La mise en place de techniques d'évaluation de ces marqueurs a d'ailleurs permis de montrer le potentiel perturbateur du processus de mue de nombreux contaminants, modèles ou présents dans l'environnement. De plus, les fluctuations naturelles de ces marqueurs ont été évaluées à travers l'analyse de l'influence du stade de mue (Soumoff & Skinner, 1983 ; Tuberty & McKenney, 2005 ; Blanchet *et al.* 2012), ou encore de paramètres abiotiques tels que la température ou la salinité (Gong *et al.* 2015 ; Goff *et al.* 2017). Toutefois, malgré les connaissances acquises sur ces techniques, celles-ci n'ont, à ce jour et à notre connaissance, pas été déployées en conditions *in situ*. Ce constat rend difficilement faisable l'évaluation de l'état de la qualité de mue chez les populations de crustacés présentes *in natura*. De plus, un autre reproche pouvant être fait à ces marqueurs, plus particulièrement aux marqueurs associés aux niveaux d'ecdystéroïdes, est la pertinence et la signification des réponses observées. Plus précisément, il est encore difficile de répondre à des questions comme : que signifie une hausse/ baisse de niveaux d'ecdystéroïdes à l'échelle de l'organisme ? Existe-t-il une valeur seuil pour engendrer un effet ? Est-ce que la fin du cycle de mue se déroule anormalement ? De la même façon que pour les marqueurs généraux de mue, les marqueurs de la régulation hormonale de la mue nécessitent le déploiement simultané de plusieurs marqueurs macroscopiques afin de confirmer l'impact de l'altération directe de la mue à l'échelle de l'organisme.

Tableau II-3 Utilisation des ecdystéroïdes en tant que marqueur d'altération de mue chez les crustacés

Substance	Espèce	Stade de développement	Exposition	Dose	Marqueur	Effet	Auteur
Tris 2-butoxyethyl phosphate	<i>Daphnia magna</i>	Adulte F0	<i>in vivo</i>	10µg.L ⁻¹	EcR transcription	Stimulation	Giraud et al. (2017b)
Tamoxifène	<i>Daphnia magna</i>	Juvéniles	<i>in vivo</i>	100µg.L ⁻¹	EcR transcription Niveau d'ecdystéroïdes	Inhibition	Jo et al. (2018)
Testosterone	<i>Daphnia magna</i>	Kcell drosophile	<i>in vitro</i>	Na	Activité au niveau EcR	Inhibition	Mu & LeBlanc (2002)
Cadmium	<i>Gammarus fossarum</i>	Organe Y	<i>in vitro</i>	900 µg.L ⁻¹	Production ecdystéroïdes	Stimulation	Abidi et al. (2016)
Fénarimol	<i>Monoporeia affinis</i>	Adultes	<i>in vivo</i>	0.3 mg.L ⁻¹	Niveau d'ecdystéroïdes	Pas d'effet	Jacobson & Sundelin (2006)
Hepatochlor	<i>Homarus americanus</i>	Larves	<i>in vivo</i>	1ppm	Niveau d'ecdystéroïdes	Inhibition cycle dépendant	Snyder & Mulder (2001)
Aroclor 1242	<i>Uca pugilator</i>	Adultes femelles	<i>in vitro</i>	1 µmol.L ⁻¹	Transcription EcR	Stimulation	Meng & Zou (2009)
Endosulfan	<i>Uca pugilator</i>	Adultes femelles	<i>in vitro</i>	1 µmol.L ⁻¹	Transcription EcR	Stimulation	Meng & Zou (2009)
PCB29	<i>Uca pugilator</i>	Adultes femelles	<i>in vitro</i>	1 µmol.L ⁻¹	Transcription EcR	Stimulation	Meng & Zou (2009)
Heptachlor	<i>Uca pugilator</i>	Adultes femelles	<i>in vitro</i>	1 µmol.L ⁻¹	Transcription EcR	Pas d'effet	Meng & Zou (2009)
Képone	<i>Uca pugilator</i>	Adultes femelles	<i>in vitro</i>	1 µmol.L ⁻¹	Transcription EcR	Stimulation	Meng & Zou (2009)
Bisphénol A	<i>Macrobrachium japonicus</i>	Adultes	<i>in vivo</i>	30 µg.L ⁻¹	Transcription EcR	Effet temps dépendant	Park et al. (2019)
DEHP	<i>Macrobrachium japonicus</i>	Adultes	<i>in vivo</i>	30µg.L ⁻¹	Transcription EcR	Effet temps dépendant	Park et al. (2019)

Tableau II-3 (Suite)

Substance	Espèce	Stade de développement	Exposition	Dose	Marqueur	Effet	Auteur
Irgarol	<i>Macrophthalmus japonicus</i>	Adultes	<i>in vivo</i>	30 µg.L ⁻¹	Transcription EcR	Effet organe dépendant	Park <i>et al.</i> (2016)
Fipronil	<i>Callinectes sapidus</i>	Juvéniles	<i>in vivo</i>	0.5 µg.L ⁻¹	Transcription EcR	Pas d'effet	Goff <i>et al.</i> (2017)
4-nonyphenol	<i>Carcinus maenas</i>	Adultes mâles	<i>in vivo</i>	100 µg.L ⁻¹	Niveau d'ecdystéroïdes	Inhibition	Lye <i>et al.</i> (2008)
Cuivre	<i>Eriocheir sinensis</i>	Juvéniles	<i>in vivo</i>	5 mg.L ⁻¹	Niveau d'ecdystéroïdes	Inhibition	Yang <i>et al.</i> (2008)
RoundUp® (glyphosate)	<i>Macrobrachium potiana</i>	Adultes	<i>in vivo</i>	65 µg.L ⁻¹	Transcription EcR	Effet sexe dépendant	De Melo <i>et al.</i> (2019b)
Fénoxycarbe	<i>Palaemonetes pugio</i>	Larves	<i>in vivo</i>	100 µg.L ⁻¹	Niveau d'ecdystéroïdes	Stimulation stade dépendant	Tuberty & McKenney (2005)
Fénoxycarbe	<i>Rhithropanopeus harrisii</i>	Larves	<i>in vivo</i>	100 µg.L ⁻¹	Niveau d'ecdystéroïdes	Stimulation stade dépendant	Tuberty & McKenney (2005)
Pyriproxyfène	<i>Palaemonetes pugio</i>	Larves	<i>in vivo</i>	10 µg.L ⁻¹	Niveau d'ecdystéroïdes	Stimulation stade dépendant	Tuberty & McKenney (2005)
Pyriproxyfène	<i>Rhithropanopeus harrisii</i>	Larves	<i>in vivo</i>	10 µg.L ⁻¹	Niveau d'ecdystéroïdes	Stimulation stade dépendant	Tuberty & McKenney (2005)
Fipronil	<i>Amphiascus tenuiremi</i>	juvéniles adultes	<i>in vivo</i>	0.2 µg.L ⁻¹	Transcription EcR	Stimulation stade dépendant	Gaertner <i>et al.</i> (2012)
Ponastérone A	<i>Amphiascus tenuiremi</i>	juvéniles adultes	<i>in vivo</i>	0.1 µg.L ⁻¹	Transcription EcR	Stimulation stade dépendant	Gaertner <i>et al.</i> (2012)
Nonyphénol	<i>Americamysis bahia</i>	Adultes femelles	<i>in vivo</i>	30 µg.L ⁻¹	Production ecdystéroïdes	Stimulation	Hirano <i>et al.</i> (2009)

2.3.2.3. Perturbation des enzymes chitinolytiques : effecteurs de la mue en aval de la régulation hormonale

Parmi les effecteurs présents en aval des mécanismes de régulation gérés par le système neuroendocrinien, les enzymes chitinolytiques (*i.e.* chitobiase/NAGase et chitinase) figurent parmi les cibles les plus étudiées dans un contexte d'altération de la mue (*i.e.* ces enzymes sont les marqueurs les plus analysés après la 20-HE et les marqueurs généraux de la mue, dans un contexte d'altération de la mue). Ces enzymes sont facilement mesurables et permettent de faire le lien entre la régulation hormonale en amont, et les mécanismes physiologiques découlant de leur activité. A titre d'exemple, Meng & Zou (2009) ont mis en évidence l'induction de l'expression d'un gène codant pour la synthèse de la NAGase par l'injection de doses croissantes de 20-HE chez le crabe *Uca pugilator*, faisant de cette enzyme un marqueur intéressant pour l'étude des perturbations de l'activité de la 20-HE (ainsi que de l'ensemble des mécanismes hormonaux de la régulation de la mue) chez les crustacés.

En raison de cette place stratégique dans le déroulement de la mue, l'activité de la chitinase (**Tableau II-4**) et de la NAGase (**Tableau II-5**) ont fait l'objet de nombreuses études afin de connaître leur sensibilité lors d'expositions à différents xénobiotiques. En comparant ces deux enzymes, il apparaît que la perturbation de l'activité de la chitinase est nettement moins documentée. Si l'activité de celle-ci a été majoritairement étudiée chez des souches fongiques et bactériennes, démontrant le pouvoir inhibiteur de plusieurs molécules (*e.g.* les méthylxanthines dont la pentoxifylline ; Cohen, 2010), son utilisation chez les crustacés a été plus rare. Une raison possible du faible nombre d'études mesurant l'activité de la chitinase chez les crustacés vient de la complexité de la méthode employée pour suivre l'activité enzymatique. En effet, dans la majorité des cas, le suivi de l'activité de la chitinase est permis grâce à l'action de cette enzyme, suivi en seconde étape du dosage colorimétrique réalisé traditionnellement pour la NAGase, tout en utilisant une NAGase purifiée (Zou & Bonvillain, 2004 ; Husen *et al.* 2015 ; Giraudo *et al.* 2017). Le dosage de l'activité NAGase devient alors plus simple à réaliser pour de telles études. Néanmoins, la mesure de l'activité de la chitinase a mis en évidence le pouvoir inhibiteur de xénobiotiques. A titre d'exemple, Zou & Bonvillain (2004) ont réalisé un screening *in vivo* de contaminants sur cette enzyme, démontrant ainsi l'inhibition de la chitinase par l'*o,p*-DDT, ainsi qu'une tendance à l'inhibition par la képone et le méthoxychlore. L'ensemble des études mettant en avant la perturbation de l'activité chitinase chez les crustacés a été réalisée en condition *in vivo*, lors d'essais en laboratoire, rendant difficile l'interprétation de ce marqueur sur les populations naturelles. Il est toutefois intéressant de mentionner Husen

et al. (2015), qui ont confirmé le pouvoir inhibiteur *in vivo* et *in vitro* de la pentoxifylline sur l'activité des enzymes chitino lytiques chez le termite *Rhinotermitidae flavipes*. Ce constat étant similaire à celui obtenu chez les souches fongiques et bactériennes, il pourrait être intéressant de tester davantage de composés sur les arthropodes, d'après les molécules ayant montré un pouvoir inhibiteur chez les familles de chitinases fongiques notamment.

En revanche, l'activité de la NAGase a été davantage étudiée chez les crustacés. Ce paramètre est mesurable selon deux méthodes relativement similaires : le dosage colorimétrique et le dosage fluorimétrique. Déterminée comme plus sensible (Espie & Roff, 1995), la quantification de l'activité NAGase par fluorimétrie est davantage utilisée lors de la manipulation de petits organismes, voire dans un contexte de mesure de la productivité zooplanctonique par analyse d'échantillon d'eau (Oosterhuis *et al.* 2000 ; Sastri & Roff, 2000 ; Avila *et al.* 2012 Sastri *et al.* 2012). En parallèle, la méthode colorimétrique a permis d'estimer l'activité enzymatique des NAGases présentes dans l'épiderme (Spindler, 1976 ; Buchholz, 1989 ; Spindler-Barth *et al.* 1990), mais aussi le corps entier des crustacés (Buchholz & Vetter, 1993). Ces deux méthodologies rendent alors possible la mesure de l'activité de la NAGase sur la grande majorité des crustacés, des Daphnidae de petites tailles aux grands décapodes. Ainsi, des études *in vivo* en conditions contrôlées de laboratoire réalisées sur de nombreuses espèces (*e.g.* Brachyura, Penaeidae, Gammaridae, Daphnidae, mais aussi chez les Palaemonidae) ont démontré le pouvoir inhibiteur de nombreux composés sur l'activité de la NAGase (**Tableau II-5**). A titre d'exemple, Luo *et al.* (2015) ont réalisé une épédonculation oculaire sur des crabes *Carcinus maenas*, afin que ceux-ci aient un pic d'activité de la NAGase. Ceux-ci ont ensuite été exposés à des doses croissantes de cadmium, montrant une inhibition dose-dépendante de l'activité de la NAGase. En parallèle, de larges screening *in vitro* ont mis en évidence l'inhibition de l'activité de la NAGase par des composés tels que les métaux lourds (*e.g.* cadmium, zinc, cuivre), les solvants (*e.g.* éthanol, méthanol, DMSO, acétone) ou encore des substances médicamenteuses (voir **Annexe 4**). Cependant, ces screening comprenaient généralement d'une part des NAGases présentes dans l'épiderme, voire l'organisme entier, mais également des NAGases présentes dans les viscères, dont le rôle, digestif ou associé à la mue, n'est pas certain. Pour les composés testés sur les NAGases digestives, l'altération observée sera à confirmer pour les NAGases associées au processus de mue. L'activité de la NAGase a également été mesurée dans une approche *in situ* (Mesquita *et al.* 2015). Afin d'appréhender la sensibilité d'organismes provenant de différents sites plus ou moins contaminés, les auteurs se sont intéressés à deux populations de crabes *Carcinus maenas*

provenant d'un site pollué au cadmium et d'un autre non et les ont exposés au laboratoire à différentes doses de cadmium. Ainsi, les crabes présents en site pollué présentaient des niveaux d'activité de NAGase plus faibles que les crabes présents en site propre. En tant qu'outils d'évaluation de la production de biomasse zooplanctonique, ce marqueur a également été montré comme intéressant pour évaluer l'état de santé d'écosystèmes aquatiques (Hanson & Lagadic, 2005). A ce titre, Conley *et al.* (2009) ont trouvé une corrélation négative entre le niveau de NAGase dosé dans l'eau prélevée au sein d'un écosystème et la teneur de cette eau en produits pharmaceutiques, révélant le pouvoir perturbateur de ces composés sur le zooplancton présent.

En résumé, contrairement à la chitinase, l'activité de la NAGase est un marqueur plus connu et plus utilisé chez les crustacés. Ce paramètre, utilisé à la fois en conditions contrôlées de laboratoire, mais aussi lors d'approches *in situ*, a permis de mettre en évidence le pouvoir perturbateur de la mue des crustacés de plusieurs dizaines de xénobiotiques, présents ou non dans l'environnement. En ce sens, aux vues des connaissances acquises, l'activité de la NAGase semble très prometteuse pour étudier des phénomènes de perturbation de la mue chez des crustacés présents dans des milieux pollués.

Tableau II-4 Utilisation de l'activité de la chitinase en tant que marqueur d'altération de la mue chez les crustacés.

Substance	Espèce	Stade de développement	Dose maximale	Origine chitinase	Effet	Auteur
20-Hydroecdysone	<i>Uca pugilator</i>	Adultes femelles	25 $\mu\text{g.g}^{-1}$	Epiderme	Stimulation	Zou & Bonvillain (2004)
Atrazine	<i>Uca pugilator</i>	Adultes femelles	1 mg.L^{-1}	Epiderme	Pas d'effet	Zou & Bonvillain (2004)
o,p'-DDT	<i>Uca pugilator</i>	Adultes femelles	0,2 mg.L^{-1}	Epiderme	Inhibition	Zou & Bonvillain (2004)
p,p'-DDT	<i>Uca pugilator</i>	Adultes femelles	0,1 mg.L^{-1}	Epiderme	Pas d'effet	Zou & Bonvillain (2004)
Tributhyl étain	<i>Uca pugilator</i>	Adultes femelles	1 mg.L^{-1}	Epiderme	Pas d'effet	Zou & Bonvillain (2004)
Méthoprène	<i>Uca pugilator</i>	Adultes femelles	1,5 mg.L^{-1}	Epiderme	Pas d'effet	Zou & Bonvillain (2004)
Perméthrine	<i>Uca pugilator</i>	Adultes femelles	5 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Epiderme	Pas d'effet	Zou & Bonvillain (2004)
Képone	<i>Uca pugilator</i>	Adultes femelles	0,5 mg.L^{-1}	Epiderme	Pas d'effet	Zou & Bonvillain (2004)
Méthoxychlor	<i>Uca pugilator</i>	Adultes femelles	0,2 mg.L^{-1}	Epiderme	Pas d'effet	Zou & Bonvillain (2004)
Diéldrine	<i>Uca pugilator</i>	Adultes femelles	0,1 mg.L^{-1}	Epiderme	Pas d'effet	Zou & Bonvillain (2004)
Cadmium	<i>Sinopotamon henanense</i>	Adultes	29 mg.L^{-1}	Epiderme	Inhibition	Luo <i>et al.</i> (2015)
Sédiments de différents sites	<i>Macrophthalmus japonicus</i>	Adultes	NA	Organisme	Effet site dépendant	Park <i>et al.</i> (2019)
5-méthyl-1H-benzotriazole	<i>Daphnia magna</i>	Nouveaux nés	2 mg.L^{-1}	Organisme	Pas d'effet	Park <i>et al.</i> (2019)
5-chloro-1H-benzotriazole	<i>Daphnia magna</i>	Nouveaux nés	2 mg.L^{-1}	Organisme	Stimulation	Park <i>et al.</i> (2019)
1H-benzotriazole	<i>Daphnia magna</i>	Nouveaux nés	2 mg.L^{-1}	Organisme	Pas d'effet	Park <i>et al.</i> (2019)
Pentoxifylline	<i>Reticulitermes flavipes</i>	Adultes	70 g.L^{-1}	Organisme	Effet temps dépendant	Husen <i>et al.</i> (2015)

Tableau II-5 Utilisation de l'activité de la NAGase lors d'exposition *in vivo* de crustacés à des contaminants.

Substance	Espèce	Stade de développement	Dose maximale	Origine chitobiase	Effet	Auteur
PBDE	<i>Gammarus pulex</i>	Adultes	1 µg.L ⁻¹	Organisme	Inhibition	Gismondi & Thomé (2014)
PBDE	<i>Gammarus pulex</i>	Adultes	1 µg.L ⁻¹	Organisme	Inhibition	Gismondi & Thomé (2014)
4-Octylphenol	<i>Uca pugilator</i>	Adultes	10 mg.L ⁻¹	Hépatopancréas Epiderme	Effet organe dépendant	Zou & Fingerman (1999c)
Diéthylstilbestrol	<i>Uca pugilator</i>	Adultes	5 mg.L ⁻¹	Hépatopancréas Epiderme	Effet organe dépendant	Zou & Fingerman (1999c)
Aroclor 1242	<i>Uca pugilator</i>	Adultes	8 mg.L ⁻¹	Hépatopancréas Epiderme	Effet organe dépendant	Zou & Fingerman (1999c)
Endosulfan	<i>Uca pugilator</i>	Adultes	0,2 mg.L ⁻¹	Hépatopancréas Epiderme	Effet organe dépendant	Zou & Fingerman (1999c)
Diéthylphthalate	<i>Uca pugilator</i>	Adultes	50 mg.L ⁻¹	Hépatopancréas Epiderme	Effet organe dépendant	Zou & Fingerman (1999b)
PCB 29	<i>Uca pugilator</i>	Adultes	2 mg.L ⁻¹	Hépatopancréas Epiderme	Effet organe dépendant	Zou & Fingerman (1999b)
Triclosan	<i>Uca pugilator</i>	Adultes	2,5 mg.L ⁻¹	Hépatopancréas Epiderme	Stimulation	Hagen & Zou (2017)
Endosulfan & hypoxie	<i>Callinectes sapidus</i>	Adultes	33 ppm	Hépatopancréas Epiderme	Inhibition en mélange	Williams (2012)
Endosulfan	<i>Callinectes sapidus</i>	Adultes	33 ppm	Hépatopancréas Epiderme	Pas d'effet	Williams (2012)
Fluoxétine	<i>Carcinus maenas</i>	Adultes	750 µg.L ⁻¹	Hépatopancréas Epiderme	Pas d'effet	Mesquita <i>et al.</i> (2011)
Cadmium	<i>Carcinus Maenas</i>	Adultes	2 mg.L ⁻¹	Hépatopancréas Epiderme	Inhibition	Mesquita <i>et al.</i> (2015)

Tableau II-5 (suite)

Substance	Espèce	Stade de développement	Dose maximale	Origine chitobiase	Effet	Auteur
Cadmium	<i>Sinopotamon henanense</i>	Adultes	29 mg.L ⁻¹	Epiderme	Inhibition	Luo <i>et al.</i> (2015)
Hypoxie & Naphtalène	<i>Penaeus aztecus</i>	Adultes	40 mg.kg ⁻¹	Epiderme	Inhibition	Zou (2009)
Hypoxie	<i>Penaeus aztecus</i>	Adultes	1 mg.L ⁻¹	Epiderme	Pas d'effet	Zou (2009)
Naphtalène	<i>Penaeus aztecus</i>	Adultes	40 mg.kg ⁻¹	Epiderme	Pas d'effet	Zou (2009)
RoundUp® (glyphosate)	<i>Macrobrachium potiuna</i>	Adultes	0,28 mg.L ⁻¹	Muscle	Inhibition	De Melo <i>et al.</i> (2020)
Chlordécone	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Juvéniles	20 µg.L ⁻¹	Muscle	Inhibition	Lafontaine <i>et al.</i> (2016)
Pentoxifylline	<i>Reticulitermes flavipes</i>	Adultes	70 g.L ⁻¹	Organisme	Effet temps dépendant	Husen <i>et al.</i> (2015)
Carbamazepine	<i>Daphnia similis</i>	Juvéniles	200 µg.L ⁻¹	Eau	Inhibition	Chen <i>et al.</i> (2019)
Lovastatine	<i>Daphnia magna</i>	Juvéniles	1 µg.L ⁻¹	Eau	Pas d'effet	Richards <i>et al.</i> (2008)
Lovastatine	<i>Daphnia magna</i>	Juvéniles	1 µg.L ⁻¹	Eau	Pas d'effet	Richards <i>et al.</i> (2008)
Fluoxétine	<i>Daphnia magna</i>	Juvéniles	1 µg.L ⁻¹	Eau	Effet temps dépendant	Richards <i>et al.</i> (2008)
Fluoxétine	<i>Daphnia magna</i>	Juvéniles	1 µg.L ⁻¹	Eau	Pas d'effet	Richards <i>et al.</i> (2008)
Sertraline	<i>Daphnia magna</i>	Juvéniles	1 µg.L ⁻¹	Eau	Pas d'effet	Richards <i>et al.</i> (2008)
Sertraline	<i>Daphnia magna</i>	Juvéniles	1 µg.L ⁻¹	Eau	Pas d'effet	Richards <i>et al.</i> (2008)
Atorvastatine	<i>Daphnia magna</i>	Juvéniles	1 µg.L ⁻¹	Eau	Pas d'effet	Richards <i>et al.</i> (2008)
Atorvastatine	<i>Daphnia magna</i>	Juvéniles	1 µg.L ⁻¹	Eau	Pas d'effet	Richards <i>et al.</i> (2008)
20-HE	<i>Daphnia magna</i>	Juvéniles	0,1 mmol.L ⁻¹	Eau	Inhibition	Song <i>et al.</i> (2017b)
Tébuconazole	<i>Daphnia magna</i>	Juvéniles	0,4 mg.L ⁻¹	Eau	Inhibition	Qi <i>et al.</i> (2018)
R-tébuconazole	<i>Daphnia magna</i>	Juvéniles	0,4 mg.L ⁻¹	Eau	Inhibition	Qi <i>et al.</i> (2018)
S-tébuconazole	<i>Daphnia magna</i>	Juvéniles	0,4 mg.L ⁻¹	Eau	Inhibition	Qi <i>et al.</i> (2018)

2.3.2.4. Perturbation de la structure cuticulaire : garante du bon fonctionnement de la cuticule des crustacés

Située en aval des mécanismes de régulation ainsi que des effecteurs de la mue tels que les enzymes chitinolytiques, la cuticule s'avère être un intéressant intégrateur des perturbations survenant sur les cibles moléculaires de la mue. Cependant, comme exposé auparavant, la perturbation de la cuticule survient *via* des anomalies morphologiques, lorsqu'elles sont observables, ou dans une majorité des cas à travers des délais de mue, voire la mort de l'organisme. Un compromis afin de voir des effets sur la cuticule sans utiliser les marqueurs généraux est d'analyser les propriétés inhérentes à la structure de la cuticule (*i.e.* propriétés thermiques, chimiques, physiques et/ou mécaniques). Ces propriétés ont été montrées comme fluctuantes au cours du cycle de mue des crustacés sans entraîner de perturbations des fonctions de la cuticule à l'échelle macroscopique (Skinner *et al.* 1992 ; Strus & Compère, 1996 ; Park, 1999 ; Pratoomchat *et al.* 2002a, b ; Promwikorn *et al.* 2005 ; Calhoun & Zou, 2016). Il serait possible alors d'imaginer que certains contaminants pourraient entraîner des changements dans la composition et l'organisation des composants présents dans la cuticule, sans altérer définitivement cette structure. Toutefois, ces propriétés n'ont à ce jour que très peu été analysées dans un contexte d'exposition à un stress toxique. Les faisceaux de preuves obtenus, permettant d'envisager ces propriétés comme d'intéressants marqueurs de perturbations de la mue, sont présentés par des dégradations forcées de la cuticule en conditions contrôlées. Ainsi, lors d'expositions *in vitro* de cuticules de homards *Homarus americanus* à l'éthylènediaminetétraacétique (EDTA) et à la soude (NaOH), Romano *et al.* (2007) ont mis en évidence des changements de propriétés thermiques et d'organisations de la structure cuticulaire, liés à l'action de décalcification et de déprotéinisation de l'EDTA et du NaOH respectivement. De plus, lors de la purification de la cuticule de crustacés en chitine, Gbenebor *et al.* (2016) et Zhao *et al.* (2019) ont rapporté des changements de composition de la cuticule, générale et surfacique, à la suite de l'acidification de celle-ci. Par extension, la chitine associée à la cuticule présente aussi des changements d'état lors de sa transformation en chitosan, ce phénomène étant davantage documenté en raison de l'intérêt commercial des deux matériaux (*e.g.* Rinaudo, 2006 ; Kumari *et al.* 2017 ; Montroni *et al.* 2019). Actuellement, une seule publication *in vivo* a permis de mettre en évidence le changement de composition de la cuticule de la crevette *Penaeus Kerathurus* par l'exposition au perturbateur endocrinien diflubenzuron. Ainsi, cette approche innovante de diagnostic de la perturbation de la mue chez les crustacés s'avère intéressante aux vues des quelques publications disponibles faisant part des modifications structurales à la suite de l'exposition à un stress chimique. Toutefois, l'étude de

la structure cuticulaire chez des populations présentes *in natura* fait cruellement défaut à ce marqueur pour pouvoir être utilisé dans un contexte de diagnostic de l'état de santé des populations sauvages de crustacés.

Synthèse de la partie 3

La perturbation de la mue : connaissances et marqueurs disponibles

Tableau II-6 : Bilan des avantages et inconvénients des différents marqueurs de mue dans une approche de diagnostic de perturbation sur des populations de crustacés présentes *in natura*.

Marqueurs	Avantages	Inconvénients	Intérêt en tant que marqueur
Marqueurs généraux (délais, retards)	● Fortement documenté sur un grand nombre de crustacés ● Facilement mesurable en laboratoire	● Nécessite l'analyse complémentaire d'autres marqueurs pour démontrer un réel impact sur la mue ● Difficile à déployer <i>in natura</i>	Faible
Anomalies morphologiques	● Observable en laboratoire et <i>in natura</i> ● Présente un degré de sévérité selon l'exposition	● Présence de facteurs génétiques confondants ● Différence d'occurrence selon les espèces observées	Moyen
Niveau d'ecdystéroïdes	● Marqueur d'effets directs sur le processus de mue ● Connaissances des variations naturelles du signal	● Pas de déploiement <i>in natura</i> connu chez les crustacés ● Pas d'informationnel sur le déroulement de la mue	Faible
Activité ecdystéroïdienne (EcR)	● Marqueur d'effets directs sur le processus de mue ● Bien documenté dans un contexte de perturbation de la mue (<i>i.e.</i> essais modèles mis au point)	● Pas de déploiement <i>in natura</i> connu chez les crustacés ● Pas d'informationnel sur le déroulement de la mue	Moyen
Activité chitinase	● Intégration des perturbations de la régulation hormonale de la mue ● Lien avec la physiologie de l'organisme	● Peu développé dans le contexte d'exposition des crustacés ● Pas de déploiement <i>in natura</i> connu chez les crustacés	Moyen
Activité NAGase	● Intégration des perturbations de la régulation hormonale de la mue ● Bien documenté dans un contexte de perturbation de la mue (<i>i.e.</i> essais modèles <i>in vitro</i>) ● Facilement déployable <i>in natura</i>	● Peu d'études <i>in natura</i> chez les grands crustacés ● Peu d'utilisation chez les Palaemonidae	Fort
Propriétés inhérentes à la structure cuticulaire	● Approche innovante dans le contexte de perturbation de la mue ● Documenté dans le cadre de dégradations induites (<i>in vitro</i>)	● Peu de recul dans le contexte de perturbation de la mue ● Pas de déploiement <i>in natura</i> connu	Innovant

III. Matériels et méthodes

Ce chapitre présente de manière générale les méthodologies mises en œuvre au cours de ces travaux de thèse. Les expérimentations évoquées ici seront davantage détaillées au travers des articles et notes reprenant les résultats.

La première partie de ce chapitre se focalise sur la caractérisation de la baie de Seine et de sa problématique en termes de contamination. La seconde partie permet de caractériser les sites de prélèvements des spécimens de *Palaemon serratus*, les techniques d'échantillonnage mises en place, ainsi que la procédure de maintien des organismes, en conditions de laboratoire, avant leur utilisation. La troisième partie reprend les expérimentations mises en place au cours de ces travaux de thèse. Enfin, la quatrième partie dresse les méthodologies utilisées pour la mesure des différents marqueurs biologiques étudiés.

3.1. Provenance et maintien au laboratoire des spécimens de *Palaemon serratus*

3.1.1. Provenances des crevettes

Les spécimens de *Palaemon serratus* utilisés pour la phase d'optimisation méthodologique (voir publication n°1, section 4.1., et publication n°3, section 5.1.) et les tests de toxicité *in vitro* et *in vivo* (voir publication n°2, section 4.2., et publication n°4, section 6.1.) ont été récupérés auprès d'un pêcheur professionnel du Havre (DYFLO) opérant dans la zone des 2 miles marins au large des côtes situées entre Octeville-sur-mer et Cauville-sur-mer (Normandie, France). Cette solution d'approvisionnement offrait la possibilité d'obtenir des effectifs importants individus (*i.e.* plusieurs dizaines) de classe d'âge homogènes (*i.e.* classes 2 et/ou 3 : LCT > 36 mm), étant de fait particulièrement appropriés pour les approches de laboratoire. La disponibilité des organismes auprès des pêcheurs était, toutefois, limitée à la période d'activité de ces derniers – *i.e.* de la fin du mois d'octobre à la mi-mars.

Des populations de crevettes autochtones de la baie de Seine ont par ailleurs été collectées, en pêche à pied, sur différentes stations distribuées le long du littoral, au cours d'une campagne de prospections *in situ*, effectuée en 2019 (voir note n°1, section 6.2.). La baie de Seine est une zone intéressante en raison du gradient géographique de contamination qui y est observé. Une part de la contamination chimique s'explique par les activités agricoles, urbaines et industrielles locales, occasionnant l'apport de molécules chimiques notamment *via* les petits et moyens cours d'eau au sud, ainsi que par un réseau karstique très développé au nord de la baie. Toutefois, la plus grande part de la contamination est sans doute celle apportée par la dérive sédimentaire s'opérant depuis l'estuaire de Seine vers le nord de la baie. Ce panache de particules charrie avec lui des contaminants accumulés pour certains depuis l'amont du fleuve, sédimentant au fur et à mesure le long des sites au nord de la baie de Seine. Ainsi, durant la période de présence de *P. serratus* au niveau des zones intertidales, plus précisément entre octobre et novembre 2019, six stations d'échantillonnages positionnées au niveau du gradient de contamination présent en baie de Seine ont été prospectées, (**Figure III-1**) – *i.e.* une station au sud de la baie, Longues-sur-mer, et cinq stations présentes au nord dont une à proximité de l'embouchure de l'estuaire de Seine, Cap de la Hève ; deux présentes dans la zone d'influence du panache sédimentaire, Octeville-sur-mer, et Antifer sud ; ainsi que deux stations au nord du port d'Antifer, Antifer Nord et Yport. Il est important de souligner que l'enceinte du port d'Antifer est constituée d'une digue de près de 4 km. Cette superstructure dévie la dérive

sédimentaire, atténuant fortement l'apport de sédiment sur le linéaire côtier sur plusieurs kilomètres au Nord de l'édifice.

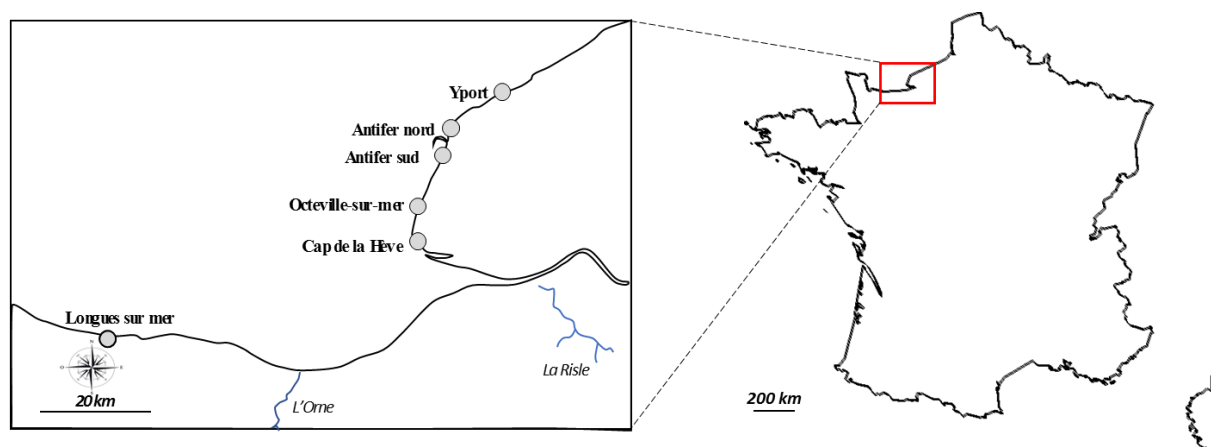


Figure III-1. Répartition des stations d'échantillonnage de *Palaemon serratus* le long du littoral de la baie de Seine (Normandie, France).

3.1.2. Techniques de prélèvement

Au cours des différents travaux, les techniques de prélèvement se sont diversifiées selon la disponibilité et l'accessibilité des organismes, ainsi que la nature des fonds de la zone prospectée. De novembre à mars, les crevettes récupérées auprès du pêcheur professionnel du Havre (DYFLO), étaient collectées en profondeur, au large des côtes, au moyen de casiers à bouquets. Lors des prospections *in situ*, de mai à novembre, les échantillonnages de crevettes ont été réalisés par pêche à pied à l'aide d'épuisettes ou de havenets (**Figure III-2**). Ces prélèvements ont systématiquement été menés en fin de marée descendante par un minimum de deux pêcheurs, afin de minimiser le temps de prélèvement (*i.e.* environ une heure et demie). Selon la disponibilité et l'accessibilité des « cachettes » de crevettes, deux techniques différentes étaient réalisées. Sur les terrains accidentés, à l'exemple d'Antifer sud et nord dont le paysage est façonné par des blocs escarpés, l'utilisation des havenets (*i.e.* maille nylon de 6 mm, diamètre 20 cm) a été privilégiée, permettant d'accéder aux populations de crevettes présentes entre ces blocs. *A contrario*, sur des terrains relativement dégagés (*e.g.* Longues-sur-mer, Cap de la Hève), l'utilisation d'épuisettes, plus ou moins larges (*i.e.* maille nylon de 0.5 mm, largeur 13 cm), est préconisée, afin de prospecter les moindres recoins des fonds rocaillieux. Une fois la collecte réalisée, les crevettes étaient immédiatement ramenées au laboratoire, entre 10 et 45 minutes selon le site prospecté, des seaux en polypropylène d'une contenance de 30 L, remplis d'eau de mer du lieu de prélèvement pour les collectes *in situ*, ou

de l'eau de mer « contrôle » (*i.e.* Eau de Deauville, voir section 3.1.3.) préalablement acclimatée à la température du milieu naturel.

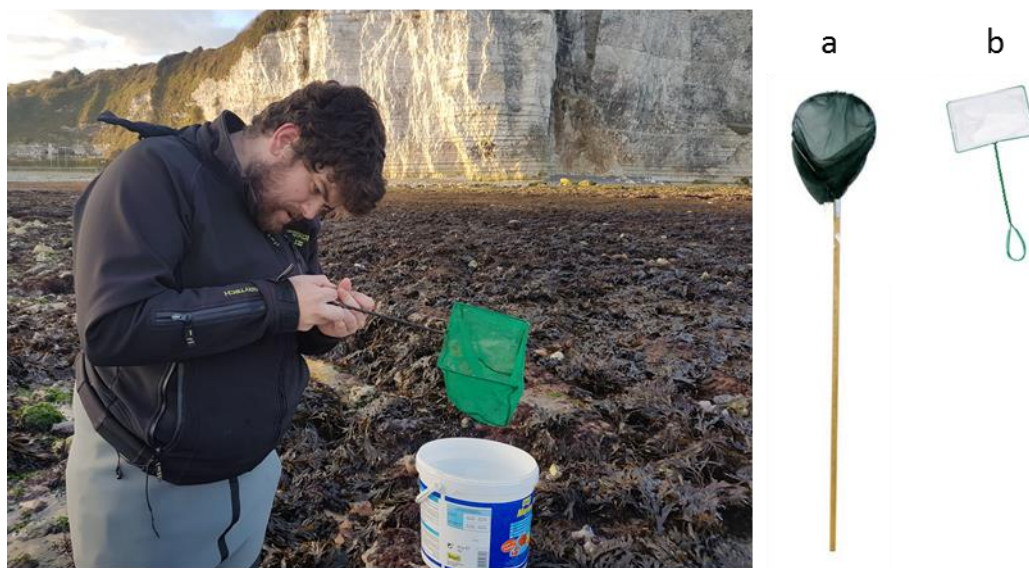


Figure III-2 Méthode de prélèvement des crevettes *Palaemon serratus* sur le littoral de la baie de Seine. a : havenet de 20 cm de diamètre avec un maillage de 6 mm, b : épuisette en nylon de 13x19 cm avec une maille de 0,5 mm (source : M. Burlion Giorgi).

3.1.3. Stabulation au laboratoire

En raison de la présence d'espèces homologues au sein de la baie, une détermination spécifique était systématiquement réalisée de retour au laboratoire, selon la méthode de détermination décrite par Gonzalez-Ortegón & Cuesta (2006) basée sur la forme du rostre et du céphalothorax, pour assurer l'utilisation exclusive de crevettes bouquets *P. serratus*. Une fois ce tri effectué, la détermination du sexe était réalisée au regard de la présence des caractères sexuels secondaires propres à l'espèce (voir section 3.2.1.). Les individus mâles et femelles étaient ensuite séparés. Les crevettes ainsi triées étaient distribuées dans plusieurs seaux contenant 15 L d'eau de prélèvement, puis placées sous oxygénation constante dans une enceinte thermostatée à 20°C. Pour les crevettes utilisées dans les 24 h après leur arrivée au laboratoire (*e.g.* individus collectés lors des approches passives *in situ*), les individus étaient constamment maintenus dans les seaux. Pour un maintien à plus long terme, les organismes étaient transférés en batterie de 1000 L après leur maintien temporaire en seaux, permettant leur acclimatation à la température de l'enceinte thermostatée. À l'exception des crevettes collectées par approches passives au niveau de littoral de baie de Seine, les systèmes de stabulation du laboratoire étaient alimentés avec une réserve d'eau provenant de la station thermale de Deauville, située au sud de la baie de Seine. La qualité de cette eau a été vérifiée par la

réalisation d'analyses chimiques dont les résultats ont indiqué des niveaux inférieurs au seuil de détection pour 425 des 426 molécules, comprenant des HAPs, métaux, PCBs ou encore des pesticides. A titre indicatif, l'unique molécule retrouvée au-dessus du seuil de détection fut le fongicide carbendazime, retrouvé à $0,03 \mu\text{g.L}^{-1}$, dont la $\text{LC}_{50_{48\text{h}}}$ mesurée chez le crustacé d'eau saumâtre *Americamysis bahia* était estimée à $0,09 \text{mg.L}^{-1}$ (source : pesticide properties database). Au laboratoire, l'eau était stockée dans un IBC d'un m^3 , sous filtration, oxygénation et traitement UV constants. Une fois mises en stabulation, les crevettes ont été nourries tous les deux jours avec une alimentation à base de krills et de mysides (Europrix®). Les batteries de stabulation étaient enrichies avec des refuges constitués de grilles en propylène (18x15 mm de Lxl et 5 mm de maille), ainsi que de pots et briques en terre cuite, inertes, réduisant ainsi le risque de cannibalisme.

3.1.4. *Expérimentation d'expositions in vivo, sous conditions contrôlées de laboratoire*

Une expérimentation d'exposition *in vivo* a été conduite pour évaluer les effets de deux molécules, le cadmium (Cd) et la pentoxifylline (Px), sur les réponses associées à la mue suivies dans le cadre de ces travaux de thèse (*i.e.* l'activité de la NAGase et l'analyse des propriétés structurales de la cuticule). Pour cela, des spécimens mâles de *Palaemon serratus* ont été exposés à $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de CdCl_2 et $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Px, durant un cycle de mue – *i.e.* de la gamme de stades D1'-D1'', en prémue, au stade D2 à la prémue suivante – soit durant $21 \pm 0,5$ jours.

L'expérimentation a été menée dans des béciers de 2 L adaptés à la nature du contaminant, afin de limiter l'absorption et garantir la meilleure biodisponibilité possible. L'exposition à la Px a ainsi été conduite dans des béciers en verre, tandis que la condition « contrôle » et l'exposition au Cd ont été réalisées dans des contenants en propylène. Dans le même but, l'ensemble de la verrerie, soit 20 béciers par condition, a été acclimaté aux conditions d'expositions (**Figure III-3**), la semaine précédant l'introduction des organismes. Brièvement, les béciers ont été remplis avec 1 L de leur milieu d'exposition respectif. Des grilles de propylène de 5 mm de maille, servant de supports et refuges aux organismes ont été disposés dans chaque bécier. Un couvercle a également été placé sur chaque surverse pour réduire l'évaporation. Les milieux contaminés ont été obtenus par ajout de 1 mL de solution mère, respectivement, de 0,5 mM et 100 mM de chlorure de cadmium et de pentoxifylline, dans

1 L d'eau de mer naturelle (*i.e.* eau provenant de Deauville, 33 ‰, voir section 3.1.3). Les milieux, oxygénés continuellement par le biais d'un système d'aération constante, ont été renouvelés tous les deux jours pour garantir le maintien de la concentration en contaminant et minimiser la quantité de déchets métaboliques et nutritifs. La salinité et la température du stock d'eau de mer utilisée pour constituer les milieux, était systématiquement contrôlée avant chaque renouvellement. L'expérimentation a été conduite en chambre thermostatée, à 19 ± 1 °C, selon une photopériode de 16 h/8 h jour/nuit. Des prélèvements de milieux ont été effectués avant et après renouvellement du milieu (*i.e.* ayant lieu toutes les 48 h) pour une vérification des concentrations effectives en Cd et Px, en prestation auprès du laboratoire Labéo (Labéo, Caen, France : voir publication n°4, section 6.1.)



Figure III-3 Dispositifs mis en place lors des manipulations *in vivo*. L'oxygène est acheminé à chaque bécher par des bulleurs reliés à des pipettes Pasteur, afin d'obtenir un bullage fin. La température lors de l'exposition est vérifiée à l'aide d'une sonde température immergée dans 1 L d'eau de mer naturelle (crédit : M. Rollin)

Des spécimens *P. serratus* mâles (*i.e.* longueur totale homogène : $5,8 \pm 0,5$ cm) récupérés auprès d'un pêcheur professionnel du port du Havre ont été rentrés au laboratoire et maintenus en stabulation selon la méthode décrite en section 3.1.3., une semaine avant le lancement de l'exposition. L'avant-veille, les spécimens ont été triés sur la base de l'observation de leur stade de mue au moyen d'une méthode non-invasive (décrite en section 3.2.1.). En effet, il semblait absolument indispensable de procéder à cette synchronisation pour garantir l'interprétation de réponses biologiques liées au processus de mue telles que l'activité de la NAGase ou les propriétés structurales de la cuticule. Les organismes sélectionnés étaient tous aux stades de prémue D1' et D1'', stades montrés comme ayant une activité NAGase et

des propriétés structurelles de la cuticule relativement stables et similaires ([voir publication n°1, section 4.1.](#), et [publication n°3, section 5.1.](#)).

Au démarrage de l'expérimentation, un lot de dix crevettes a été traité et conditionné pour une analyse des biomarqueurs à T0. Parallèlement, deux crevettes ont été placées dans chaque bécards (soit $n = 40$ par condition). Les spécimens ont ainsi été exposés durant tout un cycle de mue, jusqu'au stade D2 de la prémue suivante (*i.e.* $D2_{n+1}$), soit $21 \pm 0,5$ jours. Durant cette période, les crevettes ont été nourries quotidiennement avec des granulés Vanna Starter (Le Gouessant®), selon les recommandations du fabricant. A cette occasion, la mortalité et la présence d'exuvie indiquant la mue d'un organisme, ont été systématiquement surveillées. Les crevettes mortes étaient retirées immédiatement des dispositifs, alors que les exuvies étaient laissées dans les dispositifs, assurant une source de nutriments et d'éléments métalliques importantes pour la formation de la nouvelle cuticule. Un contrôle non-invasif du stade de mue était effectué régulièrement sur les organismes, pour suivre l'avancée du cycle. Dix crevettes par condition ont été séquentiellement collectées et disséquées, une fois le stade $D2_{n+1}$ atteint, en vue de l'analyse des marqueurs biologiques [présentés en section 3.2](#). En plus des marqueurs de mue d'intérêt, d'autres paramètres ont été analysés, tels que l'indice de condition des organismes *via* le calcul de l'indice de Fulton, ainsi que la mesure des réserves énergétiques - *i.e.* réserves en protéines, glycogène et lipides présentes dans l'hépatopancréas. Ces marqueurs, analysés régulièrement sur les crevettes au sein du laboratoire SEBIO, ont été mesurés comme indices complémentaires au sein de ces travaux. Le détail de la méthode de mesure est indiqué au sein de la [publication n°4 présente en section 6.1](#). Dans le cas présent, les tissus de l'abdomen (*i.e.* muscles, tube digestif et chaîne nerveuse) ont été conservés pour effectuer des mesures de bioaccumulation, en prestations auprès du laboratoire Labéo (Labéo, Caen, France, [voir publication n°4 présente en section 6.1](#)).

Il peut être noté que l'expérimentation avait initialement été dimensionnée pour une exposition des spécimens durant deux cycles de mue, avec un arrêt au bout d'un cycle (*i.e.* $D2_{n+1}$), tel que cela a pu être réalisé, et un second arrêt au stade D2 du cycle suivant (*i.e.* $D2_{n+2}$). Malheureusement, l'expérimentation a dû être interrompue prématurément après 30 jours, en raison du premier confinement lié à la pandémie de COVID 19. Par conséquent, seules les analyses sur les crevettes en $D2_{n+1}$ ont pu être réalisées.

3.2. Mesures biologiques

3.2.1. Détermination des stades de mue et du sexe des organismes

La détermination des stades de mue a été effectuée sur la base des critères développés par Drach (1939) et adaptés par Erraud *et al.* (2018a). Cette méthode repose sur l'observation microscopique du développement des soies aux extrémités des uropodes. Les uropodes, peu épais et relativement transparents, permettent alors d'observer l'invagination de la matrice tégumentaire, le décollement de l'épiderme et la cuticularisation des nouvelles soies survenant au cours de la mue (**Figure III-4**).

De manière plus précise, le cycle de mue de la crevette bouquet est composée de huit stades de mue différents. Les stades A et B représentent la postmue, le stade C représente la période d'intermue tandis que les stades D0, D1', D1'', D1''' et D2 forment la prémue. Le stade A, survenant juste après l'exuvie, est marquée par la présence de matrice remplissant l'intégralité des soies situées aux extrémités des uropodes (**Figure III-4 A**). La rétractation de la matrice présente à l'intérieur des soies s'opère de manière progressive au cours de la postmue. Le stade B est atteint lorsque la matrice s'est invaginée aux deux tiers de la soie (**Figure III-4 B**). Le passage de la postmue à l'intermue (*i.e.* stade C, **Figure III-4 C**) s'accompagne par la formation d'un cône à la base des soies, témoignant de la rétractation maximale de la matrice à l'intérieur de ces structures. Le début de la prémue est caractérisé par le stade D0, dont les prémices sont marquées par le décollement de l'épiderme par rapport à l'ancienne cuticule. Ce décollement a lieu à la base des boucles cuticulaires, puis s'étend de manière parallèle à la cuticule délimitant l'uropode. A la fin de ce stade, le décollement de l'épiderme reste parallèle à la cuticule, formant un plateau basal interrompu de manière régulière par l'invagination des soies (**Figure III-4 D0**). L'invagination des soies s'effectue en parallèle dans l'épiderme, formant un sillon d'invagination où naîtront les nouvelles soies, ainsi qu'une ondulation au niveau du plateau épidermique, formant deux protubérances s'observant de part et d'autre de chaque sillon (*i.e.* stade D1', **Figure III-4 D1'**). Au sein de chaque espace inter-setae, cette ondulation apparaît comme étant dysymétrique en début de stade, avec la présence d'une petite et d'une grande protubérance épidermique. La progression du stade D1' est marquée par la progression de l'invagination de la soie au sein du sillon, ainsi que l'uniformisation et le rapprochement des deux protubérances présentes dans chaque espace inter-setae. Le stade D1'' marque l'invagination maximale des soies, ainsi que l'accolement des protubérances épidermiques (**Figure III-4 D1''**). Le stade D1''' s'observe par l'épaississement des parties

pariétales et distales des nouvelles soies, issu de la sclérotisation de ces structures (**Figure III-4 D1'''**). Enfin le stade D2 est marqué par la cuticularisation des nouvelles soies, observable par la coloration progressive des nouvelles soies en jaune-oranger (**Figure III-4 D2**).

Afin de déterminer les stades de mue sur les organismes, les observations ont systématiquement été réalisées sur des tissus vivants. Toutefois, la méthode différait selon la nécessité de minimiser le stress chez les organismes. Pour la plupart des expérimentations réalisées au cours de cette thèse, les crevettes étaient sacrifiées afin de collecter les organes d'intérêt. Dans ce cas de figure, la section d'un uropode a été réalisée à la base de celui-ci, afin de ne pas perturber l'organisation des différents tissus. Les uropodes internes étaient préférés aux externes car les derniers montraient plus souvent des anomalies – *e.g.* des marques et/ou nécroses issues d'anciennes attaques de congénères de la même espèce ou de prédateurs, ou des stades de reformations incomplets à la suite de la perte d'un bout d'appendices – gênant la lecture des stades. Les uropodes collectés étaient montés sur une lame dans une goutte de milieu salin (*i.e.* eau de mer artificielle ou eau contrôle filtrée) isosmotique au milieu interne de *P. serratus*, puis observés au microscope optique aux grossissements x 4 et x 10.

Au cours des déterminations de stades de mue, une procédure de suivi des stades non invasive a été développée (**Figure III-5**). Cette procédure avait pour objectif de pouvoir déterminer de manière continue et régulière la progression du cycle de mue sans occasionner de blessures sur les organismes. Cette procédure constituait un prérequis indispensable pour le suivi continu de crevettes dans le cadre de bioessais *in vivo*, tels que [décrits en section 2.1.4](#). Pour cela, chaque crevette était placée sur un support en mousse, partiellement entravée à l'aide d'épingles enchevêtrées disposées de chaque côté du céphalothorax et de l'abdomen. L'extrémité de l'abdomen, comprenant les uropodes, était placée au-dessus d'une lame, sur laquelle du milieu salin était ajoutée. Ce dispositif était ensuite disposé sous un microscope optique, en utilisant délicatement une épingle afin d'écarter les uropodes, permettant ainsi la bonne observation de l'uropode interne souhaité. Chaque détermination ainsi réalisée ne durait que quelques secondes, permettant de remettre les crevettes dans leur milieu le plus rapidement possible. Une fois la détermination réalisée, la crevette était remise aussitôt dans son milieu d'exposition.

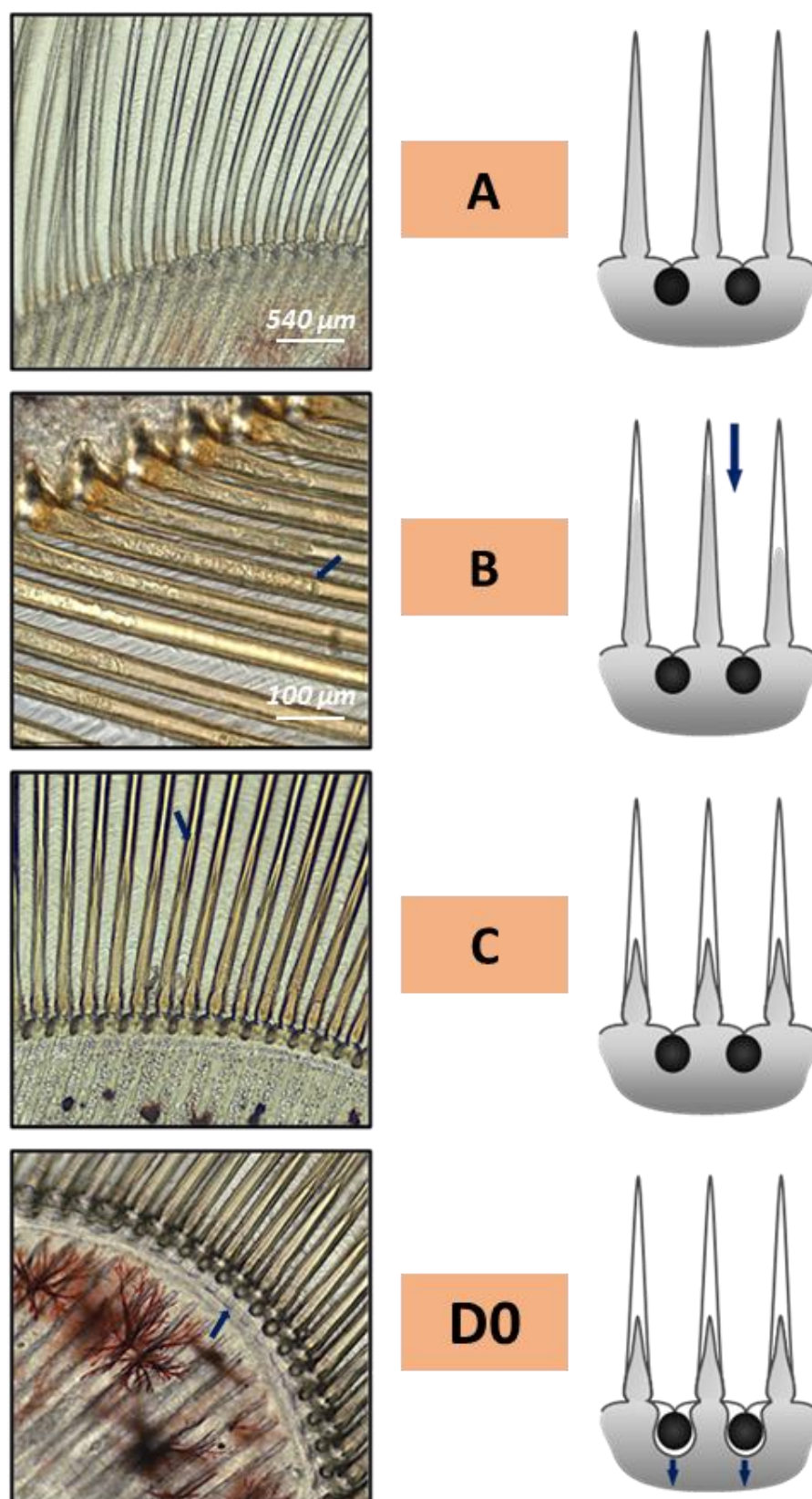


Figure III-4 Détermination des stades de mue de la crevette *Palaemon serratus* par observation de la sétogenèse au niveau des uropodes (crédit : A. Duflot)

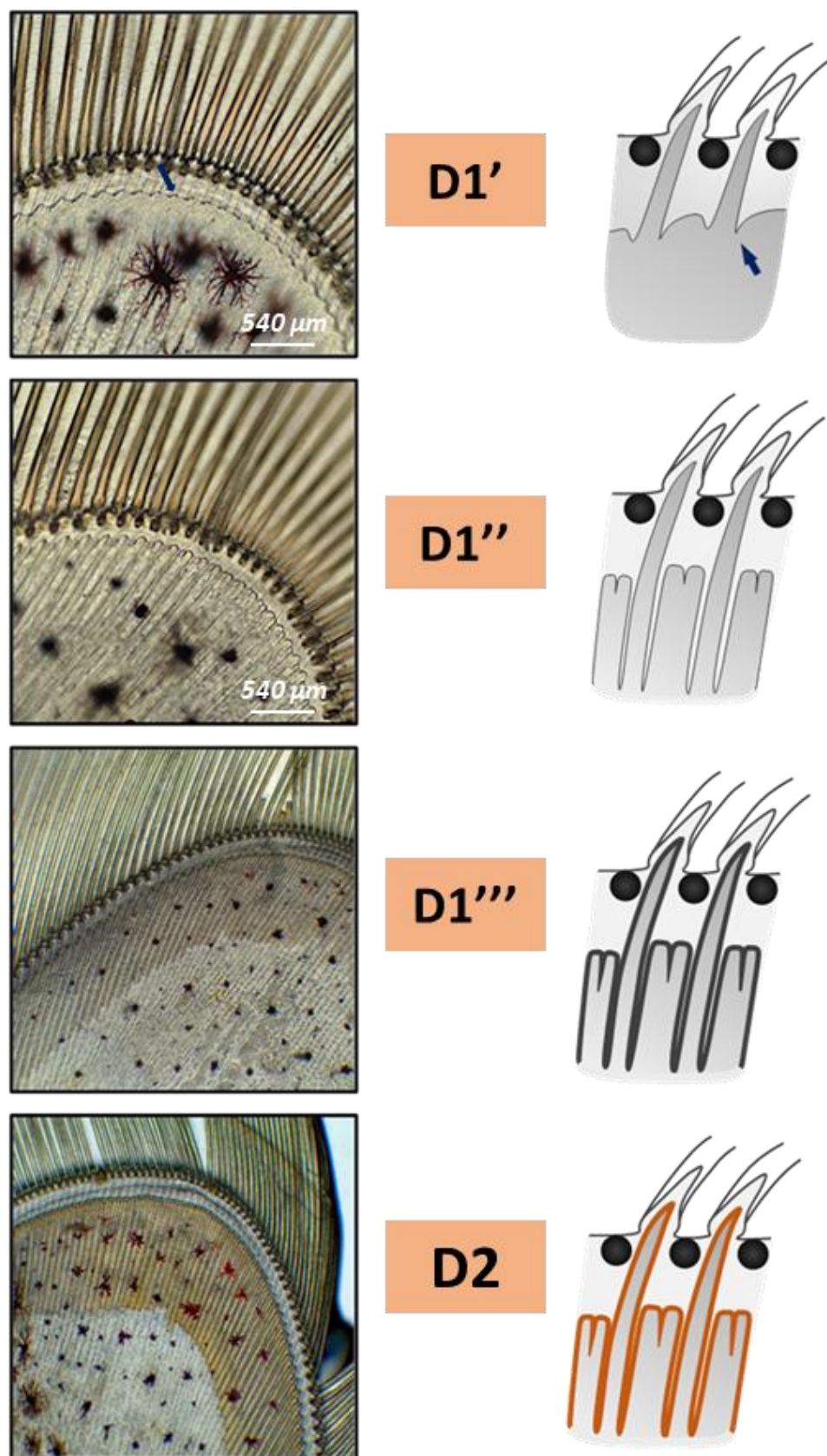


Figure III-4 (suite)

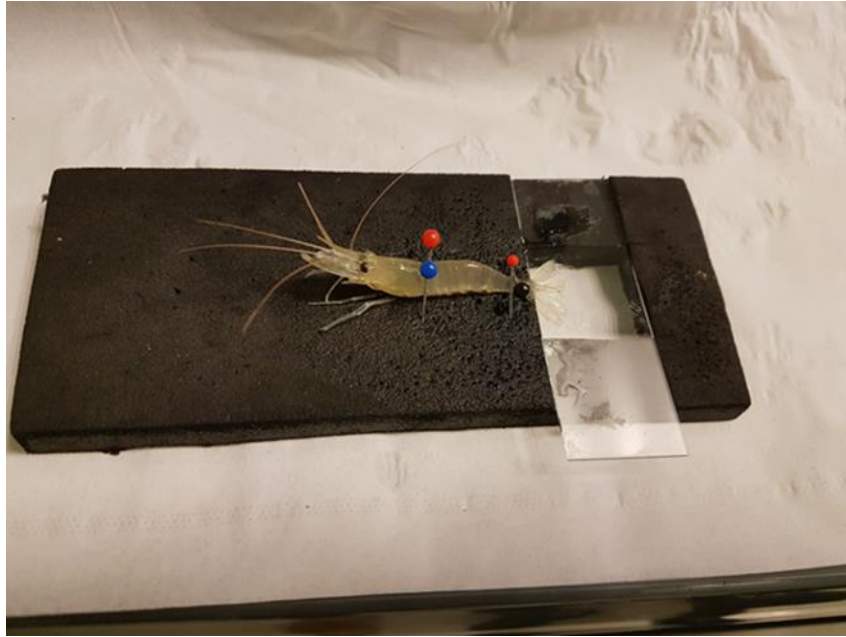


Figure III-5. Dispositif non invasive permettant la détermination des stades de mue chez la crevette *Palaemon serratus* (crédit : M. Rollin)

La détermination du sexe des individus a été réalisée selon la présence de caractères sexuels secondaires (**Figure III-6**). Brièvement, les spécimens mâles disposent d'une protubérance localisée en face ventrale entre les 5^{èmes} paires de périopodes, tandis que les spécimens femelles en sont dépourvus, disposant d'un bourrelet continu entre ces deux périopodes. De plus, les individus femelles présentent des paires de périopodes de plus en plus espacées selon une progression antéro-postérieure, alors que les individus mâles présentent un écartement moins prononcé qui reste relativement constant.

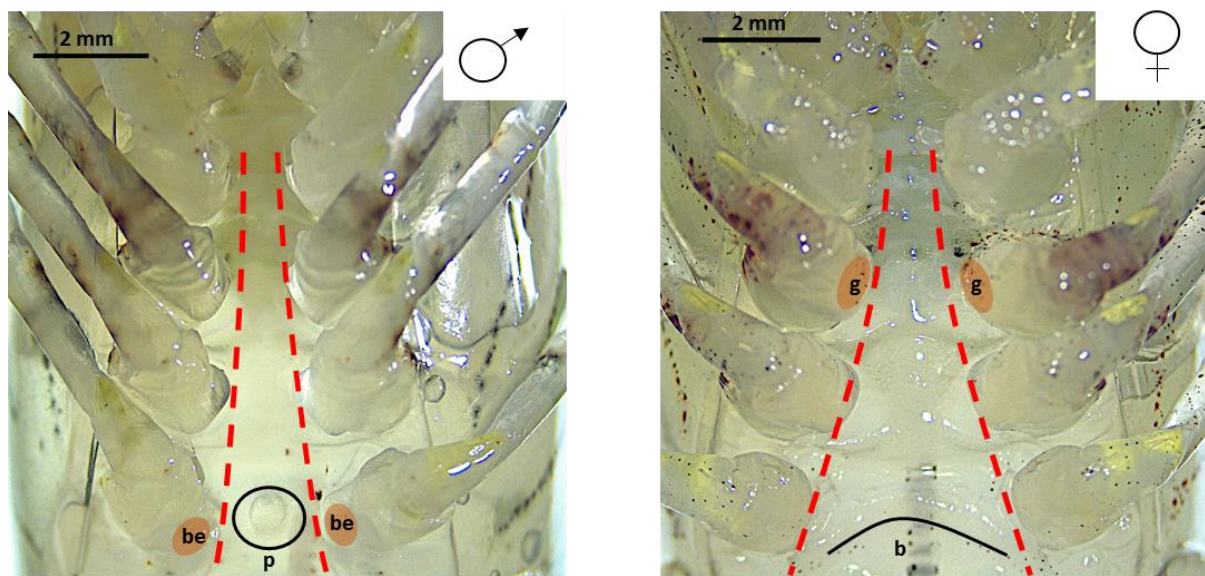


Figure III-6 Observations sous loupe binoculaire (x8) des caractères sexuels secondaires de *Palaemon serratus*. Le mâle (gauche) est reconnaissable par la présence de la protubérance (p) visible au milieu de la cinquième paire de périopodes, de bulbes éjaculateurs à la base de chaque périopode de la cinquième paire (be), ainsi que par l'arrangement resserré des périopodes, tandis que la femelle (droite) dispose d'un bourrelet (b) à la place de la protubérance, de gonopores à la base de chaque périopode de la troisième paire (g), et de périopodes relativement élargis (source : A. Duflot).

3.2.2. Mesure de l'activité de la *N*-acétyl- β -D-glucosaminidase (NAGase) par dosage colorimétrique

Conditionnement des échantillons. Des mesures de l'activité de la NAGase ont été réalisées à partir de différents organes de crevettes - *i.e.* épiderme abdominal, dernier segment abdominal, uropodes, périopodes, telson. Les spécimens étaient systématiquement pesés, mesurés et leur sexe ainsi que leur stade de mue étaient déterminés, comme vu précédemment, avant toutes dissections. En effet, un effort particulier a été fourni pour travailler sur des lots organismes homogènes. Une fois cette caractérisation effectuée, les crevettes étaient disséquées sur un tapis de glace de la manière suivante. Le telson et les 3 uropodes restants (un uropode interne ayant été utilisé pour la détermination des stades de mue ; voir section 3.2.1.) étaient sectionnés à leurs bases. Le dernier segment abdominal était sectionné, puis sa cuticule était retirée pour ne conserver que les tissus internes. L'épiderme abdominal était collecté en le séparant du muscle et de la cuticule le juxtaposant. Tous les organes étaient individuellement pesés, conditionnés dans des microtubes, puis congelés dans de l'azote liquide avant d'être stockés à -80°C jusqu'au dosage enzymatique.

Obtention des extraits enzymatiques. Le jour du dosage, les organes étaient broyés à l'aide d'un homogénéiseur à billes Precellys® à une vitesse de 6 000 g, selon un programme

de deux sessions d'homogénéisation de dix secondes, entrecoupées d'une pause de cinq secondes. Notons que pour les organes cuticularisés (*i.e.* périopodes, uropodes et telson), un second run d'homogénéisation était réalisé, après avoir refroidi les échantillons dans la glace, afin de correctement broyer la cuticule et *in fine* obtenir un broyat homogène. Le broyage était effectué au moyen de billes de verre d'un millimètre de diamètre, dans du tampon citrate phosphate (17,5 mmol.L⁻¹, pH 5,15) selon un ratio poids/volume adapté à l'organe considéré : 1/8 pour le dernier segment abdominal, 1/10 pour l'épiderme et 1/20 pour les périopodes, uropodes et le telson. Les homogénats récupérés étaient centrifugés à 10 000 g durant 20 minutes à 4 °C. Le surnageant formé à l'issue de cette étape de centrifugation (*i.e.* fraction S9) était collecté et conservé dans de la glace jusqu'à son utilisation en tant que source enzymatique.

Dosage enzymatique. Les dosages de l'activité de la NAGase ont été réalisés selon la méthode colorimétrique utilisée par Spindler (1976), Buchholz (1989) et Spindler-Barth *et al.* (1990) (**Figure III-7**). Cette méthode permet de suivre la réaction entre la NAGase, et son substrat préférentiel, le N-Acétyle-β-D-Glucosaminide (NAG), auquel est greffé un ligand chromogénique composé de nitrophénol, pour donner le 4-nitrophényl-N-Acétyle-β-D-Glucosaminide (4-NAG). Lors de la réaction, l'hydrolyse du substrat libère le groupement nitrophényl, devenant alors du nitrophénol qui colore progressivement le milieu réactionnel en jaune. Une fois le temps de réaction souhaité, de la soude (NaOH 1 mol.L⁻¹) est rajoutée afin de stopper la réaction et intensifier la coloration à pH basique (Roberts & Selitrennikoff, 1988).

Les mesures d'activité ont été réalisées dans des microplaques de 96 puits à fond plat. La coloration du milieu réactionnel par le mélange nitrophénol / soude était mesurée par lecture de la densité optique (DO) d'absorbance à 410 nm au moyen d'un spectrophotomètre lecteur de microplaque, TECAN® Infinite 2000. Pour cela, la réaction enzymatique était incubée à 37 °C et analysée entre deux temps d'incubation permettant des mesures durant la phase linéaire de l'augmentation de la DO 410 nm. Ainsi, pour un lot d'échantillons analysés, deux plaques étaient systématiquement produites : l'une pour permettre la mesure au premier temps arrêt après ajout de 20 µL de NaOH 1 mol.L⁻¹, sans perturber la réaction se déroulant en parallèle dans la seconde, jusqu'au second temps d'arrêt de la réaction. Les mesures de DO étaient effectuées en triplicats pour chaque échantillon testé et chaque temps d'arrêt effectué.

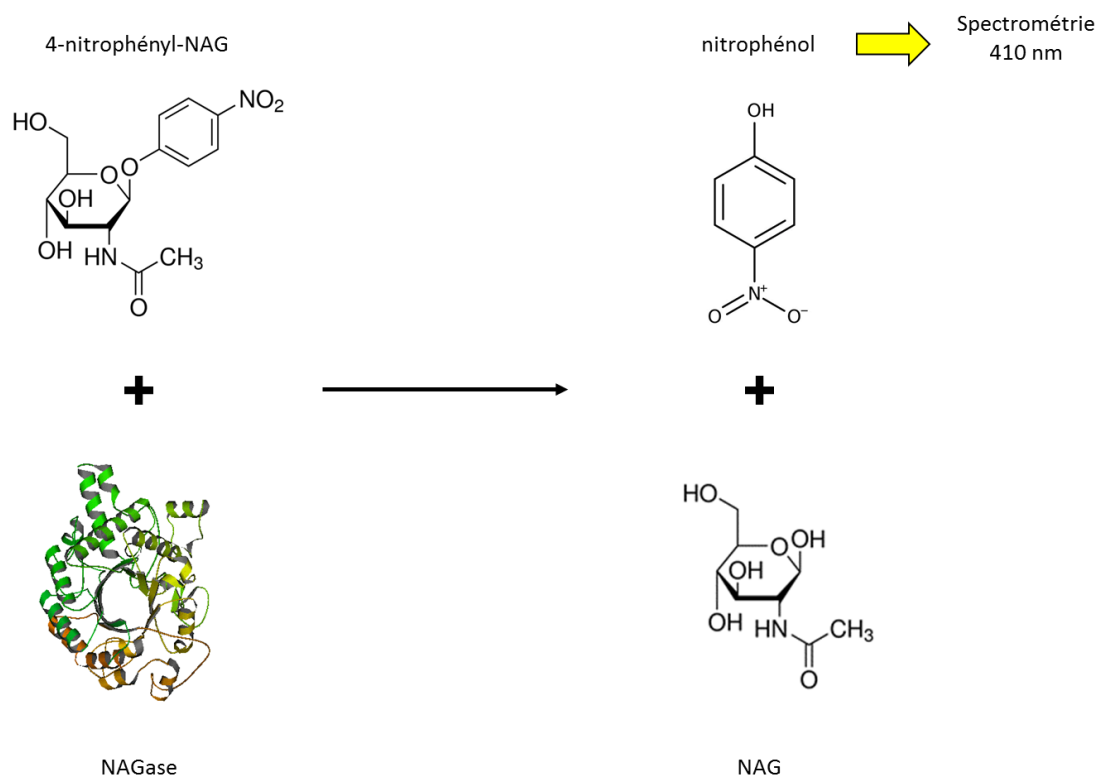


Figure III-7 Principe de la réaction colorimétrique permettant de quantifier l'activité de la N-Acétyle-β-D-Glucosaminidase (NAGase), utilisée par Spindler (1976). La NAGase hydrolyse la liaison entre le substrat N-Acétyle-Glucosamine (NAG) et le ligand chromogénique, libérant du nitrophénol qui *in fine* colore le milieu réactionnel en jaune. Le résultat est détectable à 410 nm.

La réaction enzyme-substrat produisant la formation d'une molécule de nitrophénol libérée par hydrolyse d'un complexe 4-NAG, la cinétique d'absorption était convertie en nanomoles de nitrophénol libérées par minute d'après le coefficient d'absorption molaire du 4-nitrophénol ($\epsilon = 18,3 \text{ L.mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et de la valeur de trajet optique ($l = 0,486 \text{ cm}$ pour la référence de microplaque utilisée), selon la formule suivante :

$$\text{Activité NAGase (nmol.min}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta \text{ Absorbance.min}^{-1}}{\epsilon.l} \times \text{volume réactionnel (}\mu\text{L)}$$

Une phase d'optimisation de la mesure l'activité NAGase a permis de tester, pour chaque organe d'intérêt, la nature et le pH du milieu réactionnel, la concentration optimale en 4-NAG, le volume enzymatique, ainsi que la période de linéarité de la réaction (*i.e.* temps d'arrêt) (le détail des protocoles optimisés est présenté en [Article n°1, section 4.1.](#)). L'utilisation des protocoles optimisés a permis d'obtenir une mesure intra-individuelle répétable, avec un coefficient de variation inférieur à 8 %. Au cours des différentes sessions de dosage, la coloration spontanée du substrat était estimée par la réalisation de blancs sans fraction S9. De même, la vérification que la fraction S9 ne contenait pas de résidus de nitrophénol, était

systématiquement réalisée au moyen de blancs sans 4-NAG. L'activité mesurée dans les blancs n'a jamais dépassée $8,80.10^{-3} \text{ nmol.min}^{-1}$. De même, la DO d'absorbance à 410 nm était acquise selon une cinétique d'un enregistrement toutes les 30 secondes pendant trois minutes de sorte à s'assurer de l'arrêt de la réaction par l'ajout de NaOH. L'activité résiduelle observée ne dépassait jamais la valeur de $6,60.10^{-3} \text{ nmol.min}^{-1}$. La limite de quantification d'activité de la NAGase a ainsi été estimée à trois fois l'activité retrouvée dans les blancs, soit un seuil estimé à $2,64.10^{-3} \text{ nmol.min}^{-1}$.

Essai d'exposition *in vitro*. Dans le cadre de ces travaux de thèse, une méthodologie d'essai d'exposition *in vitro* a été développée dans le but de screener la capacité d'un panel de contaminants à interférer directement avec l'activité de la NAGase (les informations relatives aux contaminants sélectionnés et les gradients de concentrations testés sont détaillés dans la [publication n°2 présente en section 4.2.](#)). Il a été résolument choisi de conduire ces essais sur des fractions enzymatique non-purifiées pour garder la complexité de la fraction S9, afin de se placer dans un contexte davantage réaliste d'un point de vue de l'altération de la mue. Pour cela, les fractions S9 de segments abdominaux de crevettes mâles étaient extraites ([tel que décrit en section 2.2.2.2](#)) et poolées ($n \geq 8$ crevettes / pool) pour disposer de suffisamment d'extraits pour tester un gradient de concentrations élargi, sans injecter de variabilité inter-individuelle. Une attention particulière a été portée sur la synchronisation des individus aux stades D1''' et D2, période au cours de laquelle l'activité de la NAGase est la plus élevée ([voir publication n°1 présente en section 4.1.](#)). Les pools d'extrait étaient distribués en trois à quatre aliquots de 2 mL, stockés à -20°C dans l'attente de la réalisation de l'essai *in vitro*, chaque aliquot d'extrait permettant de traiter un contaminant.

Le jour de l'essai, une solution mère était produite pour chaque contaminant testé, par dissolution dans du tampon citrate phosphate pour les molécules hydrosolubles ou dans de l'éthanol pour les composés organiques hydrophobes (le choix de l'éthanol en tant que solvant est justifié dans la [publication n°2 présente en section 4.2.](#)). Sa concentration était fixée à la moitié du seuil de solubilité de la molécule, respectivement, dans l'eau ou dans un solvant organique, au regard de la littérature. Les solutions mères ainsi préparées étaient conservées à température ambiante, avant leur utilisation dans la journée. Une gamme étendue de solutions de travail était ensuite réalisée par dilution de la solution mère dans du tampon citrate phosphate ($17,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) ou de l'éthanol, selon la cascade de dilution 1/1, 1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1000 et 1/10000. Concernant les composés organiques, les solutions de travail

étaient diluées une nouvelle fois au 1/2 pour garantir l'innocuité de l'éthanol dans le milieu réactionnel final.

L'exposition de l'extrait enzymatique était réalisée dans des flacons adaptés au type de contaminant (*i.e.* flacons en verre et en propylène pour les substances organiques et métalliques respectivement) en incubant 150 μ L d'extrait enzymatique décongelé avec 50 μ L de solution de travail, durant une heure à température ambiante. Le temps d'incubation d'une heure avait préalablement été défini comme adéquat dans la mesure où aucun effet sur l'activité NAGase et plus globalement sur l'intégrité du pool protéique n'avaient été observées (**Figure III-8**). Durant cette période, le milieu était mélangé toutes les 15 minutes au moyen d'un vortex pour favoriser l'interaction entre le contaminant et l'enzyme. A l'issue de l'incubation, l'activité NAGase était mesurée comme indiqué en section 4.2. dans la publication n°2.

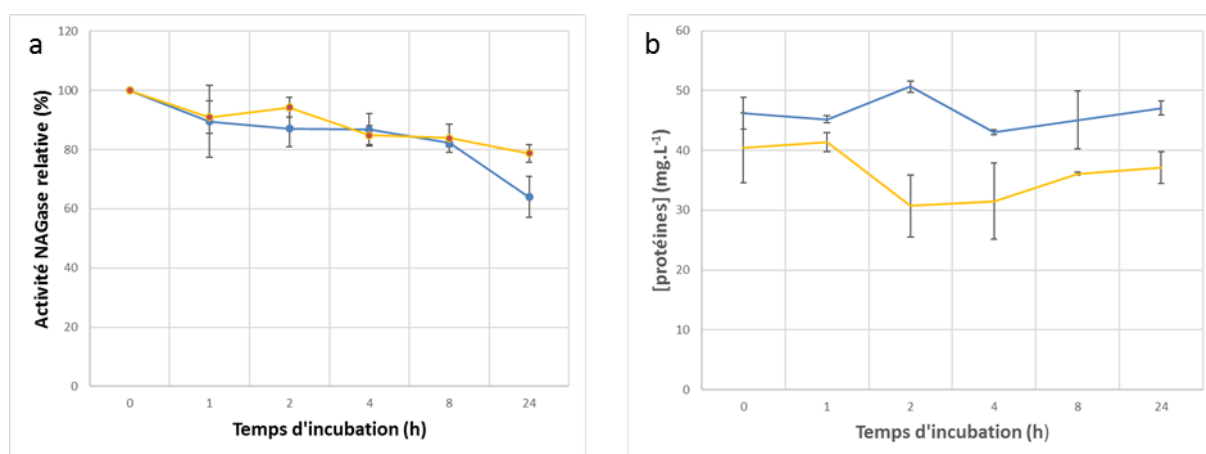


Figure III-8 Variation de la stabilité de l'activité de la NAGase (a) et de la teneur protéique (b) des extraits enzymatiques, au cours du temps. Les données jaunes et bleues représentent respectivement les valeurs obtenues lorsque l'extrait a été incubé à 37°C et à température ambiante (20°C).

Dosages des protéines. Par convention avec l'ensemble des réactions enzymatiques, de nombreux auteurs ont normalisé l'activité de la NAGase par la quantité de protéines présentes dans le volume d'extrait étudié. Cette normalisation est principalement appliquée afin de corriger les éventuelles différences de rendement d'extraction, ayant pour causes potentielles l'efficacité de broyage ou les biais de pesées et d'ajouts de volume.

Les concentrations en protéines des fractions S9 étaient dosées selon la méthode de Bradford (1976), adaptée pour la lecture en microplaque 96 puits. Pour cela, une courbe d'étalonnage est obtenue par dosage d'une gamme d'albumine de sérum bovin (BSA) : 0 ; 2 ;

4 ; 6 ; 8 ; 10 ; 12 ; 12 ; 14 ; 16 et 18 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Les fractions S9 ont été diluées au 1/20^{ème} (volume/volume) dans de l'eau ultrapure afin que leur concentration protéique soit comprise dans la gamme d'étalonnage. Le dosage a été réalisé en mettant 5 μL de fraction S9 diluée ou de solution de BSA en présence de 345 μL de réactif de Bradford, puis en laissant le mix incubé à température ambiante et à l'obscurité durant 15 min. A l'issu de ce temps d'incubation, la DO était mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre TECAN® Infinite 2000.

3.3. Caractérisations des propriétés structurales de la cuticule de *Palaemon serratus*

3.3.1. Collecte et stockage des cuticules

En raison de la taille moyenne avantageuse des individus, la caractérisation des propriétés structurales de la cuticule de *P. serratus* était séparée en deux. Ainsi, les propriétés thermiques et chimiques étaient mesurées sur la cuticule abdominale des crevettes, tandis que les propriétés mécaniques étaient évaluées sur la cuticule du céphalothorax⁴, matériau composé d'une seule pièce cuticulaire et par conséquent plus approprié pour ces mesures. De la même manière que pour l'étude de la NAGase, un effort particulier a été fourni pour sélectionner des organismes de même sexe et de taille et stade de mue homogènes. Ainsi, après mesure et détermination du poids des individus, les crevettes ont été disséquées sur un tapis de glace. Dans un premier temps, le céphalothorax et l'abdomen ont été séparés à l'aide de scalpels. En raison de son utilisation, la cuticule du céphalothorax a reçu une attention particulière afin de ne pas être cassée. Pour ce faire, des incisions précises ont été réalisées comme indiquées par la **Figure III-9**, afin d'aboutir à la formation de deux échantillons cuticulaires gauches et droits. De là, une pince fine a été utilisée afin de libérer les échantillons cuticulaires aux tissus organiques sous-jacents. Ces échantillons ont alors été placés dans des microtubes. En parallèle, la cuticule abdominale a été récupérée après incision longitudinale sur la partie dorsale et ventrale de l'abdomen. Les demi-cuticules abdominales ont alors été séparées des tissus biologiques restant (*i.e.* muscles, épiderme) à l'aide de fines pinces, puis placées respectivement dans des microtubes. Pour chaque crevette disséquée, quatre microtubes contenant les deux échantillons de cuticule provenant du céphalothorax, ainsi que ceux de l'abdomen, ont ainsi été préparés. En raison de la dégradabilité des matériaux biologiques et de l'évolution très probable de leurs propriétés physico-chimiques dans le temps (*e.g.* Aberle *et al.* 2017), la méthode de conservation des cuticules avant analyse a été étudiée. A l'issue de pré-tests menés sur la durabilité et la conservation des cuticules, la lyophilisation des échantillons a été retenue comme un bon compromis pour mesurer les propriétés physico-chimiques inhérentes à la structure des matériaux, tout en permettant une conservation durable des échantillons stockés. Par ailleurs, des mesures exploratoires sur les propriétés thermiques indiquaient une forte variabilité intra et inter échantillons imputable à la charge en eau des matériaux. En ce sens la

⁴ Des mesures exploratoires ont été réalisées sur les propriétés mécaniques de la cuticule de *P. serratus*. Néanmoins, en raison de difficultés techniques, ces efforts n'ont pas été poursuivis. Les cuticules restent néanmoins disponibles pour poursuivre les mesures après les travaux de thèse.

lyophilisation permet d'« uniformiser » la teneur en eau des échantillons, en ne conservant que l'eau liée (*i.e.* évaporable au-delà de 100°C) présente dans les structures.

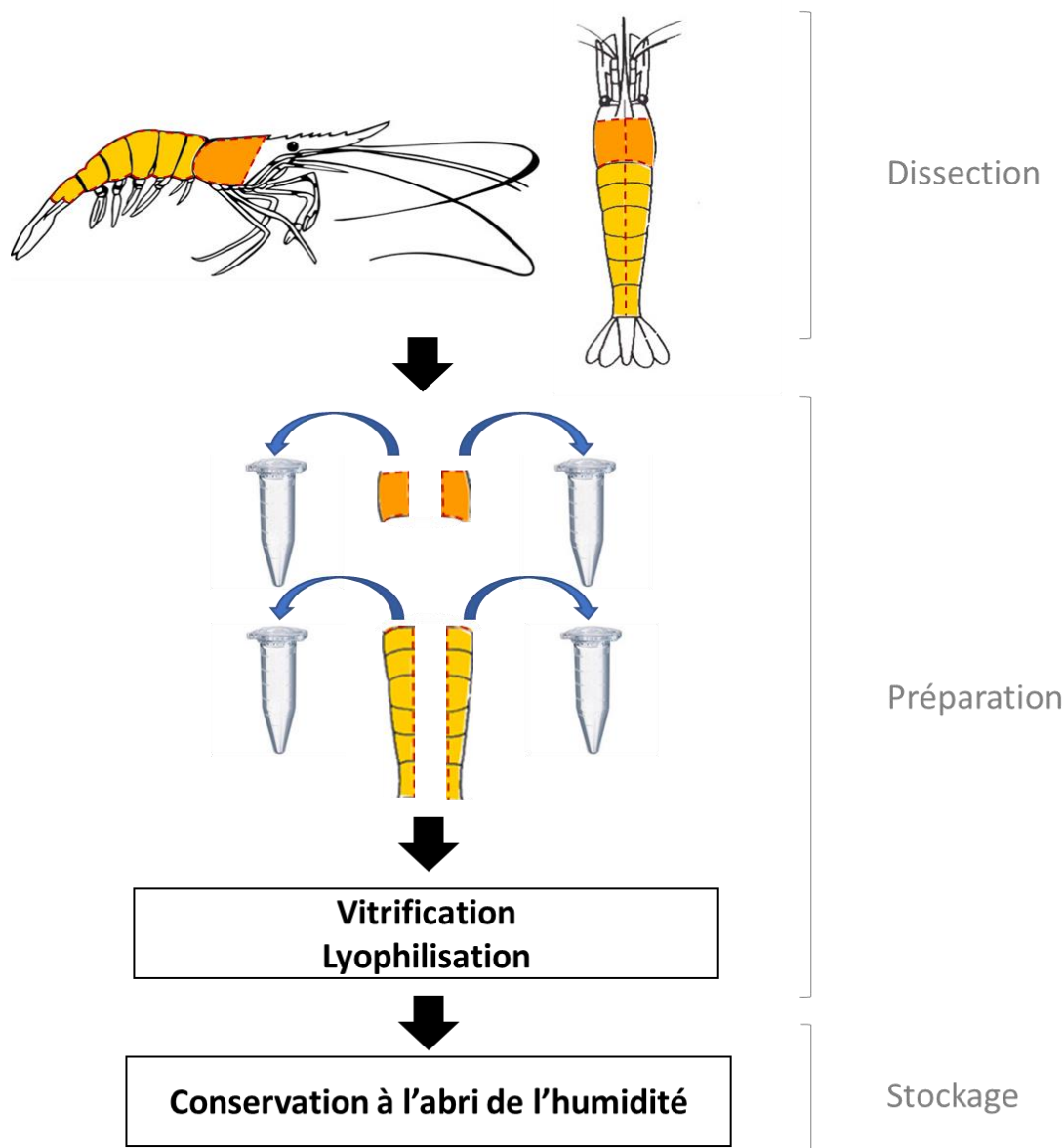


Figure III-9 Collecte, traitement et stockage des pièces cuticulaires du céphalothorax (orange) et de l'abdomen (jaune) des crevettes *Palaemon serratus*, en vue des analyses des propriétés structurales. Les pointillés rouges représentent les lignes de coupe des pièces cuticulaires (crédit : M. Rollin).

Ainsi, les échantillons de cuticules récupérés ont été lyophilisés le plus rapidement possible. Lorsque le lyophilisateur n'était pas disponible, les microtubes contenant les échantillons ont été remplis avec de l'eau de mer contrôle et placés au maximum 24 h à 4°C, minimisant ainsi le risque de dégradation structurale par action physique ou biologique (*e.g.* séchage par air ambiant, action des microorganismes). Au préalable de la lyophilisation, les microtubes ont été vidés au maximum de l'eau résiduelle, puis ont été plongés dans l'azote

liquide afin de vitrifier les échantillons, préservant au mieux leur structure. Les échantillons ont alors été lyophilisés durant 2 h, puis l'absence de glace au sein de chaque microtube a été vérifiée après le processus. Finalement, les échantillons ont été stockés à -20°C dans des sachets de conservation, réduisant le risque de ré humidification, jusqu'à leur utilisation pour analyse.

3.3.2. Mesures des propriétés thermiques de la cuticule

3.3.2.1. Analyse calorimétrique différentielle

L'analyse calorimétrique différentielle ou DSC (Differential Scanning Calorimetry) est une technique permettant de mesurer les flux d'énergie d'un échantillon soumis à un changement de température, sous atmosphère contrôlée. Ainsi, lors d'une rampe de température, la DSC permet la mesure de la quantité de chaleur reçue ou émise par un l'échantillon, et le compare simultanément à une référence. Sous la contrainte thermique, réchauffement et/ou refroidissement, il est possible d'identifier, grâce à cette technique, des phénomènes tels que la fusion, la transition vitreuse, la cristallisation, la sublimation, la décomposition ou encore la perte de volatils (Gaisford *et al.* 2019). Les variations de flux de chaleurs observées au niveau de l'échantillon sont ainsi reliées à la structuration et l'agencement du réseau de matériaux formant l'échantillon.

De manière plus concrète et simplifiée, la cuticule des crustacés peut être assimilée à un polymère semi-cristallin, c'est-à-dire composée d'une partie cristalline caractérisée par une organisation régulière et précise de ses composants, et d'une partie amorphe dont le réseau de composants n'est pas précisément arrangé. Ces deux parties ont alors des propriétés physicochimiques différentes, se traduisant ici par des comportements différents lorsque la cuticule est soumise à des contraintes de chaleur. Ainsi, lorsqu'un polymère semi-cristallin est soumis à un programme de température, plusieurs événements peuvent être identifiés, observables par DSC (**Figure III-10**), dont :

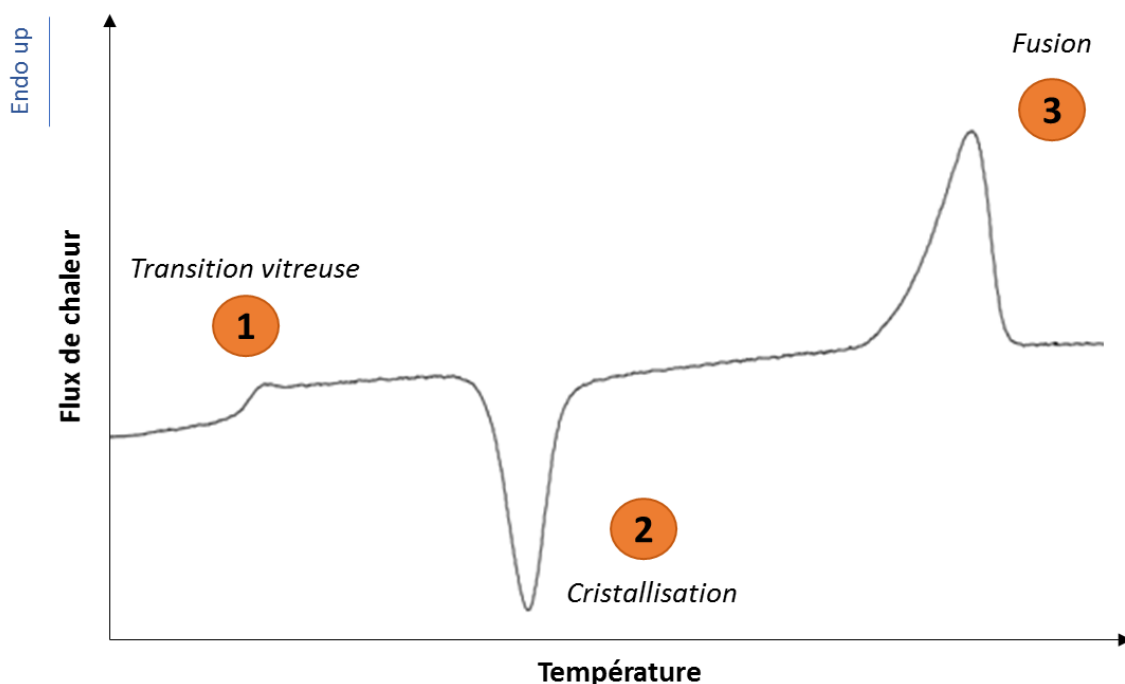


Figure III-10 Événements caractéristiques d'un matériau polymère observables par analyse de calorimétrie différentielle

(1) un phénomène de transition vitreuse. La transition vitreuse est un phénomène endothermique du second ordre (ou pseudo premier ordre) caractéristique de l'état amorphe du polymère à savoir un état sans ordre à grande distance entre une partie des chaînes macromoléculaires. Ce phénomène correspond à la variation de la capacité calorifique entre l'état vitreux du polymère (dur et cassant) et l'état caoutchoutique (mou et malléable). Cette variation de capacité calorifique se traduit par une sigmoïde sur le thermogramme. D'un point de vue structural, la température de transition vitreuse correspond à la température à laquelle des segments de chaîne macromoléculaire peuvent acquérir une certaine mobilité moléculaire. Cette mobilité permet des réarrangements des segments de chaînes se traduisant par le comportement caoutchoutique à savoir déformable du matériau.

(2) l'apparition d'un pic exothermique. Ce pic correspond à un phénomène du premier ordre et une variation d'une grandeur fondamentale de la thermodynamique à savoir l'enthalpie qui d'un point de vue physique correspond à un changement d'état au niveau de l'échantillon. Un pic exothermique est en général caractéristique d'un phénomène de cristallisation (cas de l'étude des polymères semi-cristallins) mais peut aussi être constaté dans le cas de certaines réactions chimiques ou de dégradation de l'échantillon. Dans le cas de la **Figure III-10**, il s'agit d'un phénomène de cristallisation lors de la montée en température, signifiant que le polymère semi-

cristallin, n'avait pas eu le temps de totalement cristalliser lors de l'étape précédente. Le phénomène de cristallisation peut se produire également, après la fusion de la totalité des zones cristallines, lors d'une étape de refroidissement contrôlée.

(3) l'apparition d'un pic endothermique. Comme précédemment, ce pic correspond à un phénomène du premier ordre et une variation d'une grandeur fondamentale de la thermodynamique à savoir l'enthalpie qui, d'un point de vue physique, correspond à un changement d'état au niveau de l'échantillon. Un pic endothermique est en général caractéristique d'un phénomène de fusion (cas de l'étude des polymères semi-cristallins) mais peut aussi être constaté dans le cas de certaines réactions chimiques ou de dégradation de l'échantillon. Ce pic s'observe lors de chauffage d'échantillons, lorsque la partie cristalline contenue dans le polymère atteint sa température de fusion, ou plutôt son domaine de fusion. En effet, dans le cas des polymères semi-cristallins, les cristaux sont organisés et structurés sous forme de sphérolites (arrangements polycristallins de symétrie sphérique) de différentes tailles. A partir d'une certaine température, correspondant à la fusion des plus petits sphérolites, le phénomène de fusion se poursuit, sur une gamme de température, jusqu'à la fusion des derniers plus grands cristallites. Au-delà de cette fusion et avant d'approcher la température de dégradation, le polymère est à l'état fondu. Ce changement d'état s'accompagne d'une absorption de chaleur, visible sur le thermogramme de la DSC. A noter que des pics endothermiques peuvent être originaires de la dégradation puis volatilisation de matériaux contenus dans le polymère (*e.g.* évaporation de l'eau présente dans un échantillon), nécessitant également l'absorption de chaleur pour revenir à un niveau d'énergie stable.

Lors de ces travaux de thèse, les cuticules n'ont subi qu'un seul cycle de chauffage. Cet unique cycle a été retenu après avoir remarqué l'absence d'événements caractéristiques lors de programmes de refroidissement effectués en tests exploratoires. Nous avons également décidé, sur la base des études bibliographiques, de balayer une gamme de température large pour caractériser le comportement global du matériau. En premier lieu, avant chaque utilisation de l'appareil (appareil DSC à compensation de puissance : Pyris, PerkinElmer, Waltham, Etats-Unis), deux lignes de bases ont été effectuées, avec les fours à vide, selon le programme suivant :

Ligne de base :

1. Isotherme 1 min à 4°C
2. Chauffage de 4°C à 500°C à 20°C.min⁻¹
3. Isotherme 1 min à 500°C

Ces lignes de bases permettaient de vérifier de la bonne maintenance de l'appareil, la stabilité du flux thermique, la calibration de la ligne de base, ainsi que de l'absence de contamination des fours et cheminées par d'éventuels résidus de chauffage.

Entre 5 et 10 mg d'échantillon, représentant environ ¼ d'une demi-cuticule abdominale lyophilisée, ont été pesés dans des capsules en aluminium, puis sertis hermétiquement. En parallèle, une capsule vide et sertie a été utilisée en tant que référence. Une fois placées dans le four, les capsules ont été soumises au programme de chauffage suivant :

Programme de chauffage :

1. Isotherme 1 min à 4°C
2. Chauffage de 4°C à 500°C à 10°C.min⁻¹
3. Isotherme 1 min à 500°C

Pour chaque échantillon mesuré, les paramètres suivants ont été rapportés sur les différents événements observés (**Figure III-11**)

- La température de début d'événement
- La température au pic de l'événement
- La température de fin d'événement
- L'enthalpie associée à chaque événement

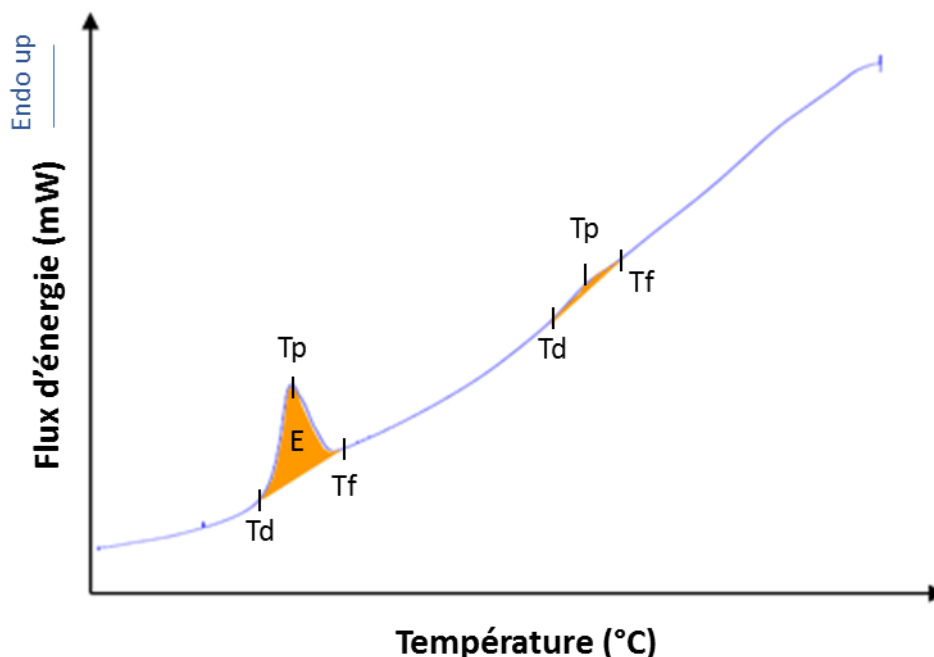


Figure III-11 Thermogramme caractéristique de la cuticule de *Palaemon serratus* analysée par calorimétrie différentielle. Pour chaque événement, les températures de début (Td), de pic (Tp) et de fin (Tf) d'événement, ainsi que l'enthalpie (E) sont rapportées puis comparées entre les individus.

3.3.2.2. Analyse Thermogravimétrique

L'ATG, ou Analyse ThermoGravimétrique, est une technique permettant de mesurer la variation de masse d'un échantillon soumis à des changements de température. La variation de masse mesurée traduit la variation de la composition de l'échantillon et la dynamique de dégradation des matériaux le constituant par rapport à l'augmentation de la contrainte thermique. Les informations alors obtenues permettent d'obtenir une caractérisation complémentaire de l'approche par DSC. Pour cela, l'échantillon est placé dans un creuset relié à une thermobalance calibrée qui mesure la masse de l'échantillon en temps réel. Lors de l'analyse, l'échantillon est positionné au sein d'un four, dont l'atmosphère et le programme de chauffage sont contrôlés. Ainsi, il est possible de suivre la dégradation d'un échantillon sous atmosphère inerte (phénomènes de thermolyse) ou sous atmosphère oxydante (phénomènes de thermo-oxydation). Sous la contrainte thermique, il est possible alors d'identifier des pertes de masse provenant majoritairement de la dégradation des matériaux, mais aussi d'éventuels gains de masse associés à la fixation de gaz par l'échantillon (Haynes *et al.* 2002). Cette technique permet ainsi d'identifier les différents constituants de l'échantillon par leur température et cinétique de dégradation.

Par ailleurs, les programmes de chauffage étaient réalisés systématiquement sous atmosphère oxygénée, permettant d'oxyder les restes cuticulaires, principalement les formes amorphes minérales, après dégradation de la matière organique. Pour chaque mesure, entre 15 et 20 mg de cuticule, représentant environ $\frac{3}{4}$ d'une demi-cuticule abdominale lyophilisée, ont été pesés puis placés dans un creuset en alumine dont la tare a été préalablement faite sur la thermobalance (appareil : Setsys : Setaram, Caluire-et-Cuire, France). Une fois fixé sur cette dernière, l'échantillon est descendu dans le four, puis soumis au programme de chauffe suivant :

Programme de chauffage :

1. Isotherme à 20°C pendant 10 min
2. Chauffage de 20°C à 900°C à 10°C.min⁻¹
3. Isotherme à 900°C pendant 10 min

Une fois le programme terminé, les cendres restantes, correspondant à la fraction minérale inerte, ont été récupérées dans des capsules de verre fermées hermétiquement afin de déterminer leur composition en éléments métalliques. Ainsi, la proportion de ces cendres en calcium, magnésium, strontium et en autres éléments mineurs (*e.g.* cuivre, fer, zinc, manganèse) a été déterminée par le laboratoire La Drôme (La Drôme Laboratoire, Valence, France) *via* des analyses par spectrométrie (*i.e.* ICP-MS et ICP-AES).

Pour chaque échantillon mesuré, un thermogramme correspondant à la perte de masse en fonction de la température a été obtenu (**Figure III-12**). Cette courbe était complétée avec le calcul de la première dérivée de la perte de masse par rapport au temps (courbe turquoise sur la **figure III-12**), permettant de délimiter les zones de températures où avaient lieu les événements de variation de masse (logiciel : Setsys Collection) et d'identifier plus précisément la valeur de température (pic sur la courbe) pour laquelle plus de 50 % de la fraction d'intérêt est dégradée. Pour chaque événement délimité, les paramètres suivants ont été rapportés :

- Le pourcentage de perte de masse
- La température où survient le maximum de perte de masse mesurée.

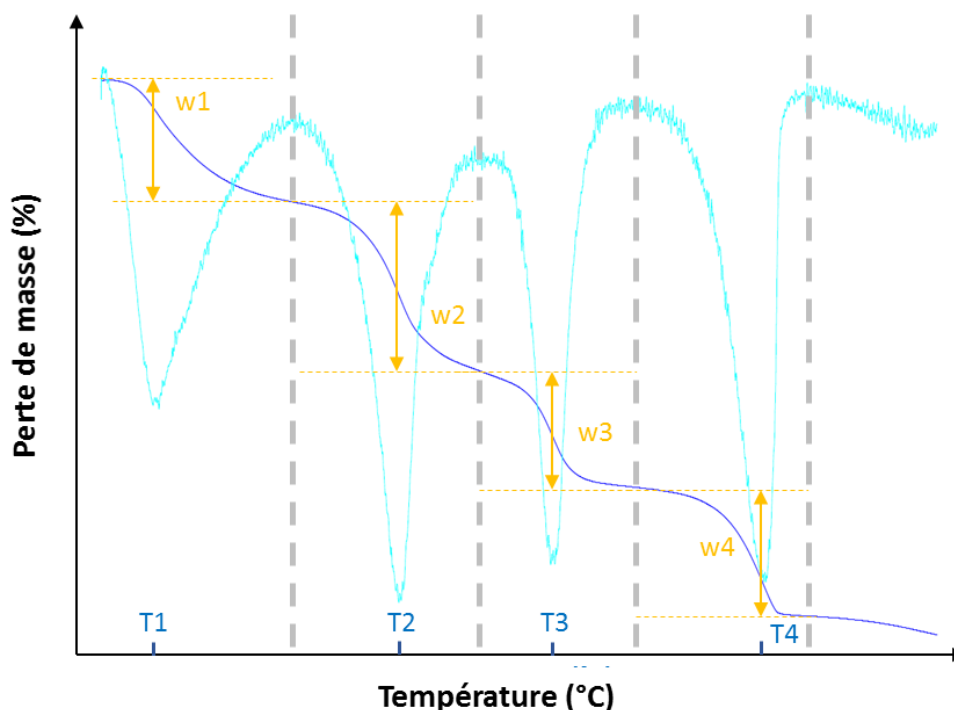


Figure III-12 Thermogramme caractéristique de la cuticule de *Palaemon serratus* obtenu par analyse thermogravimétrique. A l'issue du programme, la perte de masse (bleu) ainsi que la première dérivée de la perte de masse (bleu clair) sont analysées. Pour chaque événement, la température où survient la dégradation maximale (T), ainsi que la perte de masse associée (w) sont calculées et comparées entre les individus.

3.3.3. Mesures de la composition de surface des cuticules par IRTF

La spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (*i.e.* IRTF) est une mesure reposant sur la capacité des molécules à absorber des longueurs d'onde dans la région de l'infrarouge. Ainsi, la matière analysée interagit avec l'émission infrarouge en absorbant préférentiellement certaines longueurs d'ondes du rayonnement, produisant une vibration caractéristique selon les types de liaisons chimiques présentes (Stuart, 2004 ; Mohamed *et al.* 2017). En balayant ainsi les longueurs d'ondes du rayonnement, un spectre infrarouge de l'échantillon considéré est obtenu. Ce spectre renvoie alors à la chimie de surface (*i.e.* couches atomiques extérieures) de l'échantillon étudié.

Au cours de ces travaux de thèse, l'étude de surface des cuticules était réalisée à l'aide d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier en réflexion totale atténuée (appareil : Frontier, PerkinElmer, Waltham, Etats-Unis). La réflexion totale atténuée permet alors d'améliorer la qualité du spectre infrarouge obtenu en mesurant les changements de longueur d'onde au niveau du rayonnement reflété après contact avec l'échantillon (**Figure III-13**). Ainsi, des sous-échantillons de cuticules étaient placés directement au contact d'un cristal de sélénure de zinc ayant un fort indice de réfraction ($n = 2,43$). Afin d'assurer un bon contact entre le cristal et la surface à analyser, les échantillons de cuticule, naturellement courbés, ont été maintenus à l'aide d'un bras mécanique avec une force minimum de 120 UA. Cette force étant importante, le risque de superposition de spectres infrarouge entre deux échantillons était alors important. Afin d'éviter cela, une même cuticule était analysée *via* l'utilisation de plusieurs sous-échantillons analysés indépendamment, avec un nettoyage du bras entre chaque analyse. Ainsi, pour chaque cuticule, la même surface était analysée trois fois (*i.e.* à l'aide de trois sous-échantillons différents). De plus, en supposant leur composition surfacique différente, les deux surfaces internes et externes étaient analysées pour chaque cuticule.

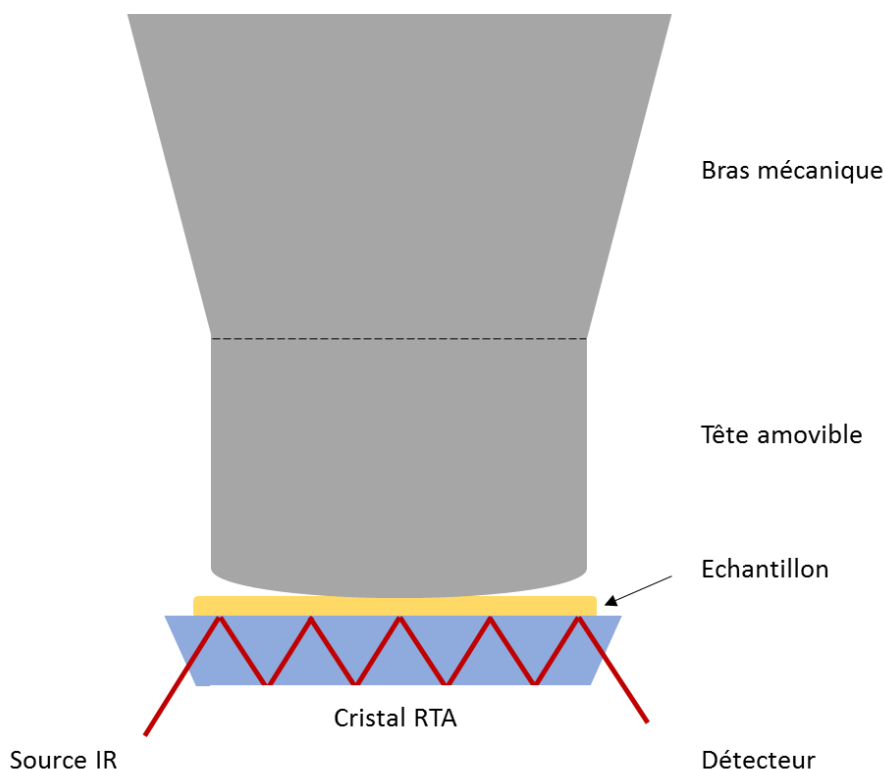


Figure III-13 Principe de mesure par spectrométrie InfraRouge à Transformée de Fourier (IRTF) avec Réflexion Totale Atténuée (RTA)

L'analyse du spectre infrarouge des sous-échantillons de cuticule a été réalisée sur la gamme de longueurs d'ondes allant de 650 cm^{-1} à 4000 cm^{-1} , avec une résolution de 4 cm^{-1} .

Lors de chaque acquisition, 16 spectres étaient produits, moyennés puis enregistrés *via* le logiciel Spectrum. L'analyse des spectres a ensuite été réalisée sur le logiciel Orange® Data mining, permettant d'annoter les spectres mais également d'effectuer des traitements de statistiques descriptives (*e.g.* ACP ; corrélation), mettant en évidence les différences inter-échantillons (**Figure III-14, voir annexe 5**)

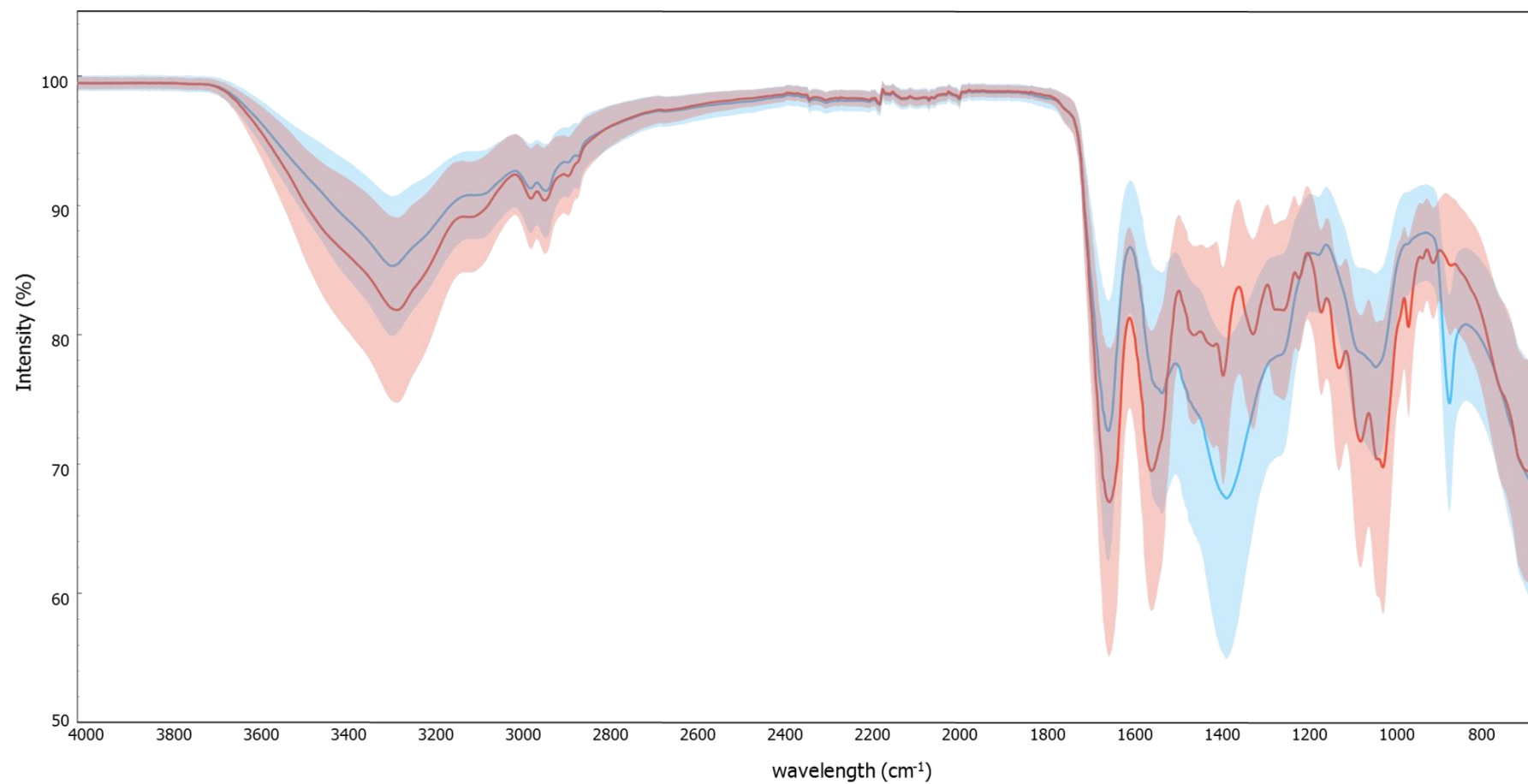


Figure III-14 Spectres IRTF caractéristiques de la face externe (courbe bleue) et de la face interne (courbe rouge) de la cuticule de *Palaemon serratus*. La courbe en gras représente la moyenne des spectres analysés tandis que le nuage coloré autour de cette courbe représente l'écart type des spectres analysés.

IV. Adaptation de la mesure de l'activité N-Acétyle-β-D-Glucosaminidase chez *Palaemon serratus* : variabilité et sensibilité de la réponse

Ce chapitre regroupe les différents travaux menés sur la mise en place de la mesure de l'activité de la NAGase chez la crevette bouquet, depuis l'optimisation méthodologique de la mesure jusqu'à la détermination du pouvoir de discrimination de l'enzyme.

La première partie détaille la phase d'optimisation du protocole de mesure, réalisée sur différents tissus jugés pertinents pour effectuer des mesures impliquant un grand nombre d'échantillons. Après optimisation, les protocoles ont servi à caractériser la variabilité intrinsèque à la physiologie des organismes. Cette partie est constituée d'une publication :

Publication n°1 : N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity in Palaemon serratus - Methodological optimisation and intrinsic variability.

La seconde partie vise à estimer le pouvoir discriminant de l'activité de la NAGase de *P. serratus* lors de l'exposition directe à une batterie de contaminants, via la réalisation d'un screening *in vitro*. Cette partie est composée d'une publication :

Publication n°2 : Screening in vitro of xenobiotics on the activity of the N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase of the marine prawn, Palaemon serratus.

4.1. Optimisation et variabilité physiologique de la mesure de l'activité N-acétyl-β-D-glucosaminidase

Publication n°1 :

N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity in *Palaemon serratus* - Methodological optimisation and intrinsic variability.

Marc Rollin, Romain Coulaud, Béatrice Rocher, Aurélie Duflot, Agnès Poret, Frank Le Foll, Benoit Xuereb.

Résumé

Les enzymes chitinolytiques, dont la N-Acétyle-β-D-Glucosaminidase (NAGase), jouent un rôle important dans le processus de mue chez les crustacés, notamment en dégradant l'endocuticule durant l'apolyse. La mesure des activités de ces enzymes est une manière intéressante de suivre le processus de mue à l'échelle sub-individuelle, en complément des observations macroscopiques classiques telles que les changements morphologiques du tégument, le succès d'exuvie ou le temps d'intermue. Les objectifs de cette étude étaient d'optimiser la méthodologie de mesure de l'activité de la NAGase pour suivre le phénomène de mue chez la crevette bouquet *Palaemon serratus*, ainsi que de comparer les niveaux d'activité de NAGase le long des différents stades de mue chez des spécimens mâles et femelles. Dans un premier temps, afin d'optimiser les protocoles de mesure sur cinq organes différents, plusieurs modifications de paramètres de réaction tels que le type de tampon, la concentration en substrat et la charge en extrait enzymatique ont été testées. En second lieu, les niveaux d'activité de la NAGase ont été évalués pour les huit stades de mue sur des spécimens mâles. Ce suivi a permis de mettre en évidence des variations d'activité de la NAGase au cours du cycle de mue, avec une augmentation d'activité en fin de prémue à un niveau d'environ 2,4 fois le niveau mesuré en intermue. Ce même profil a été observé sur les différents organes testés. Les niveaux d'activité de NAGase chez les spécimens mâles et femelles ont été comparés au niveau de trois stades de mue lors de la prémue. Les profils observés pour les deux genres ont été similaires, quel que soit l'organe testé.

Mots-clés : Crustacés, Cycle de mue, N-acétyl-β-D-Glucosaminidase, *Palaemon*.

Comparative Biochemistry and Physiology, Part A (2021), 256, 11093

N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity in *Palaemon serratus* - Methodological optimisation and intrinsic variability.

**Marc Rollin¹, Romain Coulaud¹, Béatrice Rocher¹, Aurélie Duflot¹, Agnes Poret¹, Frank
Le Foll¹, Benoit Xuereb^{1*}.**

¹Le Havre Normandie University (ULHN), FR CNRS 3730 SCALE, UMR-INERIS 02
Environmental Stresses and Biomonitoring of Aquatic Ecosystems (SEBIO), 25 rue Philippe
Le Bon - 76600 Le Havre – France.

***Corresponding authors:**

Email: benoit.xuereb@univ-lehavre.fr

Tel: +33 2 32 85 99 11; fax: +33 2 32 74 45 05

Acknowledgements

This study was supported by the Research Federation CNRS 3730 Sciences Applied to the Environment (FR SCALE), the Normandie Region and the European Maritime and Fisheries Fund (action 28 "Partnerships between scientists and fishermen"; GeDuBouq project). This study benefitted from the French GDR "Aquatic Ecotoxicology" framework which aims at fostering stimulating scientific discussions and collaborations for more integrative approaches. We would like to thank Koketso Ludwig, owner of KAYS Freelancing (www.linkedin.com/in/koketsoludwig) for English language editing.

Abstract

Chitinolytic enzymes fulfil a key role in the moulting process of crustaceans, in degrading the endocuticle during apolysis. Measuring the enzyme activity is an interesting manner to monitor the moult process at sub-individual level, complementary to the classical observation of the integument morphogenesis, ecdysis success, or moult cycle duration. The present study aimed to optimise the methodology of using N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAGase) activity to monitor moulting in the marine prawn *Palaemon serratus*, and to compare NAGase activity levels along the moult cycle of both male and female specimens. First, to optimise protocols for five different organs, different reaction medium compositions were tested, considering the type buffer, concentration of the substrate, and the load in enzymatic extract. Second, levels of NAGase activity were closely monitored during eight moulting stages in male prawns. Variations in NAGase activity were observed during the moult cycle, with an increase in activity in the late premoult phase of approximately 2.4-fold the level of the intermoult phase. This response profile was observed for each tested organ. The levels of NAGase activity of male and female specimens were compared during three stages of the premoult phase. The patterns observed for both sexes were similar for all the tested organs.

Keywords: Crustaceans; Moulting cycle; N-acetyl-β-D-glucosaminidase; *Palaemon*.

1. Introduction

Moulting in crustaceans is the physiological process that allows the periodic renewal of the rigid exoskeleton, known as the cuticle. This process is crucial for the animals to achieve metamorphosis during early stages of development and growth, and it is closely related to reproduction in mature specimens for many species (Subramoniam, 2016). The moult cycle is accomplished by a succession of periodic physiological events (Freeman & Bartell, 1975). In the post-moult period, the organisms develop a very soft and fine neo-cuticle that progressively hardens within days. This period is favourable for growth, oviposition, and mating. It is followed by the intermoult, which is a period of physiological stability. The pre-moult period started with the apolysis (detachment of the epidermis from the endocuticle by enzymatic digestion of the chitin) and is marked by both the degradation of the old cuticle, and the synthesis of a neocuticle, which progressively lead to a new ecdysis. Achieving this seemingly simple cycle requires a successful succession of events, observable at microscopic or macroscopic scales (Song et al. 2017).

Progression of the moult process in crustaceans is classically monitored through individual observations, such as the inter-ecdysis period or the ecdysis success (Richard, 1978; Chang, 1993; Song et al. 2017). Observations of the integument morphogenesis criteria provide a chronological dimension to describe the succession of the different moult stages (Drach, 1939; Drach & Tchernigovtzeff, 1967). These are integrative observations that could be complemented with monitoring of molecular targets that have specific key functions to achieve different events linked to the moult process. This combined approach could lead to a more precise description of the crustacean moult ecophysiology and provide a better understanding of the sensitivity of moulting to the anthropisation of aquatic ecosystems, including global warming, ocean acidification, and pollution). N-Acetyl-β-D-glucosaminidase (i.e. NAGase) is a key biochemical player and a promising candidate to study the moult. This enzyme is involved in the degradation of the cuticle chitin that occurs during apolysis (Jeuniaux, 1975; Gooday, 1990; Espie & Roff, 1995). NAGase activity is easily measurable using a specific substrate. Moreover, owing to its position at the end of a series of biochemical interactions that lead to the moult, NAGase activity can be easily linked to physiological events describing moult stages. Several researchers measured NAGase activity throughout the moult cycle, and they found the highest activity to be during mid-to-end premoult and the lowest activity to be during intermoult and early premoult (*Euphausia superba*: Buchholz, 1989; *Palaemon serratus*: Spindler-Barth et al. 1990; *Penaeus japonicus*: Kono et al. 1995; *Uca pugilator*: Zou & Fingerman, 1999a).

Furthermore, NAGase has also been used in studies assessing effects of pollutants on moult (Zou & Fingerman 1999b,c; Zou, 2005; Richards et al. 2008; Qi et al. 2013; Gismondi & Thomé, 2014; Husen et al. 2015; Luo et al. 2015; Lafontaine et al. 2016).

Characterisation of the enzymatic reaction and its optimum conditions should be conducted as a fundamental first step before studying the possibility to use the enzyme as a biochemical marker. Thus far, few researchers have characterised and optimised protocols for measuring NAGase activity. Temperature and pH of the reaction medium have been the most studied parameters. Their optima are as well defined as those of hexapods (*Drosophila Hydei*: Spindler, 1976; *Locusta migratoria*: Zielkowski & Spindler, 1978) and less for crustaceans (*Euphausia superba*: Spindler & Buchholz, 1988; *Meganyctiphanes norvegica*: Buchholz & Vetter, 1993; *Daphnia magna*: Espie & Roff, 1995; *Uca pugilator*: Zou & Fingerman, 1999a). Some studies also described the affinity constant of crustacean NAGase to its substrate, NAG (Spindler, 1976; Buchholz & Vetter, 1993). Information about other reaction parameters (e.g. load in enzyme extract and reaction linearity) remain scarce. It is important to test for this information, particularly the reaction linearity, to compare NAGase activity conditions for different samples and determine the best amongst them. Conversely, NAGase activity is conventionally measured on extracts of the abdominal epidermis or integument (i.e. the epidermis associated with the cuticle: Spindler, 1976; Zielkowski & Spindler, 1978; Spindler & Buchholz, 1988; Buchholz, 1989; Spindler-Barth et al. 1990; Zou & Fingerman, 1999a,b,c), or the whole organism (Buchholz & Vetter, 1993; Espie & Roff, 1995), depending on the size of the animal. Analyses of digestive NAGase are commonly conducted; however, this enzyme is not linked to the moulting process and it does not have the same properties (temperature optimum and NAG affinity: Zou & Fingerman, 1999a). NAGase studies using other crustacean tissues are rare. An example is the measurement of NAGase in uropods in the moult cycle of *Peneaus japonicus* (Kono et al., 1995). However, dissecting the abdominal epidermis requires great effort, which can limit its use in such studies. In consequence, it could be interesting to characterise NAGase activity from extracts of tissues other than abdominal epidermis.

NAGase activity, like other biomarkers, may be influenced by biological, physiological, or environmental factors, in addition to being influenced by the moult cycle. These aspects have been poorly investigated. For instance, Buchholz (1989) determined that seasonal changes had no effect on NAGase activity of *E. superba*. Intrinsic factors, such as sex, which has been demonstrated to have an influence on numerous physiological functions have not been investigated.

In consideration of the aforementioned, the aim of the present study was to optimise the measurement of NAGase activity in the *Palaemon serratus* prawn to monitor its moulting process. *P. serratus* (Pennant, 1777) is a marine species widely distributed near the European coast, spanning from the Mediterranean to the Baltic Sea (Campillo, 1975). In these ecosystems, the pink prawn is abundant and present throughout the year. It is important in trophic systems as many fishes and other crustaceans feed on it (Anderson, 1985). *P. serratus* is easy to collect and maintain under laboratory conditions or to use for in situ bioassays. Thus, it is a suitable species for use in ecotoxicological and ecological approaches (Campillo, 1975; Erraud et al. 2018a,b). However, there have been few studies on the moulting process of this species. Spindler-Barth et al. (1990) are the only researchers, to our knowledge, to have described NAGase activity, particularly focusing on the moult cycle. Nevertheless, they did not characterise the NAGase in *P. serratus*.

The study was conducted in two steps. The first step focused on the development and optimisation of a protocol, which could: (i) easily measure NAGase activity; (ii) enhance the signal emitted by absorbance of nitrophenol during the reaction; and (iii) provide repeatable and accurate measurements. For this, we optimised different key parameters of the protocol (i.e., composition and pH of the buffer, concentration of the substrate, and quantity of enzymatic extract), and we compared levels of NAGase activity between different organs (i.e. the epidermis, the last abdominal segment, telson, uropod, and periopods). The second step involved measuring NAGase activity at different moult stages on male and female specimens of *P. serratus* to characterise natural the variability of NAGase activity in relation to physiological parameters.

2. Materials and methods

2.1. Biological material

Specimens of *P. serratus* were collected between December 2018 and March 2019, by a professional fisherman of the Le Havre (DYFLO), using special traps in the 2-nautical mile zone of the Cap of La Hève (Le Havre, Normandy, France). The collected prawns were returned to the laboratory within a maximum of 1 h, using 30 L-polypropylene tanks filled with artificial sea water (ASW; salinity of 33 ‰ from dissolution of TETRA SEA® salt, which is commonly used in maintenance of marine aquarium), in oxygenated conditions. The prawns were then transferred into 80 L-aquariums that were connected to an ASW supply, and under constant aeration and filtration. The density of the prawns in the aquariums was less/equal to one prawn

per litre. The prawns were studied in less than a week at 19 ± 1 °C, with 16/8 h light/dark photoperiod, and were fed a mix of krill and mysids (Europrix®) every two days.

Total length (from the tip of the rostrum to the bottom of the tail), cephalothorax length, and total weight of each of the prawns used for the enzymatic assays were measured. Additionally, their sex and moult stages were determined based on the methods in Erraud et al. 2018a,b. Then, the prawns were dissected on ice. Single specimens of the telson, uropod, and the third and fourth pairs of the pereopods were sampled. The last abdominal segment was collected by removing the cuticle and storing the tissues remained (i.e. muscles and epidermis). Finally, the epidermis from the remain parts of abdomen was extracted by removing the muscles and cuticle, before being stored. The samples were placed in separate microtubes, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C to await NAGase activity measurements.

2.2. NAGase activity measurements

Samples were maintained at 4 °C throughout the enzyme extraction process to avoid enzyme degradation. The tissues were weighed and then crushed, at ambient temperatures, with a bead homogenizer Precellys®, using 1 mm-sized glass microbeads, in a citrate phosphate buffer at ratios (w/v) of 1:10 for the epidermis and abdominal segments, and 1:20 for the telson, uropods, and pereopods. Homogenisation for the epidermis and abdominal segment was performed in two sessions of 10 s intervals, at 6,000 xg, taking breaks of 5 s. The homogenisation procedure for the pereopods, uropods, and telsons was repeated after the samples had been retained in ice for 5 min, to crush their cuticles completely. Two and three organs of telsons and uropods, respectively, were pooled to obtain adequate tissue homogenates. The homogenates were transferred into new microtubes and centrifuged for 20 min at 10,000 xg, at 4 °C. Thereafter, clear supernatants were collected and used as enzymatic extracts.

NAGase activity was determined using a colorimetric method adapted to 96 well microplates based on the works of Spindler (1976), Buchholz (1989), and Spindler-Barth (1990). Enzymatic extract was added to a buffer (both optimised according to section 2.3) to obtain a total volume of 180 µL, which was then incubated for 2 min at 37 °C. Enzymatic activity was initiated by adding 20 µL of the chromogenic substrate, 4-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide (4-NAG; concentration optimised as per section 2.3), and pre-incubated at 37 °C. The process was terminated by adding of 20 µL of NaOH (1 mol.L⁻¹), at different times as per the range of the linear phase of the colorimetric reaction, as described in section 2.3. Measurements were performed in triplicates based on the incubation time of each sample.

Production of nitrophenol was monitored by reading its absorbance at 410 nm, using a Tecan® Infinite 2000 spectrometer. The absorbance was recorded every 30 s for 3 min (at 37 °C) to determine termination of the reaction. Finally, NAGase activity was expressed as micromoles of the nitrophenol produced per min and per litre, using the following equation:

$$\text{NAGase activity (nmol.min}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta A}{\epsilon.l} * V$$

Where $\Delta A = \frac{\text{mean absorbance at time 2} - \text{mean absorbance at time 1}}{\text{time 2} - \text{time 1 (min)}}$, ϵ is the molar extinction coefficient of nitrophenol, which is $18,300 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; l is the path length of the beam of light through the sample well, calculated as 0.486 cm for the NAGase assays, and V is the reactional volume (e.g. 220 μL per well).

Residual activity recorded after the reaction was stopped was always less than $6.60.10^{-3} \text{ nmol.min}^{-1}$. The ramp of increase of spontaneous absorbance was assessed on two blank samples: one without 4-NAG and other without enzymatic extract. These values were always less than $8.80.10^{-3} \text{ nmol.min}^{-1}$. Therefore, the quantification limit was fixed at $2.64.10^{-2} \text{ nmol.min}^{-1}$ (i.e. 3-fold the background value measured in the blanks).

2.3. Optimisation of the NAGase activity assay

Three assays were independently performed to optimise (i) the composition and pH of the buffer, (ii) the concentration of the substrate 4-NAG, and (iii) the volume of the enzymatic extract, based on the procedure in section 2.2 . A pool of the enzymatic extract composed of eight previously centrifuged supernatants was used in each test. Each experiment was performed in duplicate (i.e. using two different pools for each tested tissue).

(i) Three compositions of the buffer were tested: the TRIS buffer, phosphate buffer, and citrate phosphate buffer, at initial concentrations of 50 mmol.L^{-1} , 50 mmol.L^{-1} , and $17.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectively. For each buffer composition, a gradient of nine readings of pH (i.e. 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, and 9) was generated and adjusted by adding NaOH (1 mol.L^{-1}) or HCl (1 mol.L^{-1}) to the buffers. For this experiment, the volume of the enzymatic extract and the concentration of 4-NAG were fixed at 25 μL and $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectively. Only the extracts of the epidermis and the last abdominal segment were used for this assay because we assumed that the buffer parameters remain unchanged through the different organs. The incubation times used to calculate the delta of the absorbance at 410 nm at 37 °C, were fixed at 10 and 20 min.

(ii) A range of 12 different substrate concentrations (i.e. 0, 50, 125, 250, 375, 500, 750, 1,000, 1,500, 2,000, 2,500, and 5,000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) were tested for each tissue. For this experiment, reactions were made using citrate phosphate buffer (20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; pH 5.15) and the volume of the enzymatic extract was fixed at 20 μL . The incubation times at 37 °C were fixed at 10 and 20 min.

(iii) Four different volumes of the enzymatic extract (i.e. 20, 30, 40, and 50 μL) were tested for the epidermis and the last abdominal segment homogenates. Only two volumes (i.e. 20 and 30 μL) were tested for the uropod, telson, and periopod homogenates. For each tested volume of the extract, the kinetic of the absorbance at 410 nm increase was recorded at 12 different incubation times at 37 °C (i.e. 0, 1, 2, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, and 40 min). Here, the citrate phosphate buffer (20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; pH 5.15) was used and the concentration of 4-NAG was fixed at 750 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

2.4. Modulation of NAGase activity as function of moult stage and sex

Moult stages were determined based on microscopic observations of the uropod integument morphogenesis (magnifications x100 and x400), as described in Erraud et al. (2018a). NAGase activity was assessed on male specimens for each of the eight moult stages observed belonging to the postmoult (A and B), intermoult (C), and premoult (D0, D1', D1'', D1''', and D2). Table 1 summarises the numbers of biological replicates studied for each moult stage (i.e. homogenates prepared as per section 2.3).

Sex of the organisms was determined by the presence or absence of the *appendix masculina* in the fourth pair of periopods, as described in Erraud et al. (2018b). NAGase activity was assessed on male and female specimens at D0, D1', and D2 moult stages. Similar to Spindler-Barth et al. 1990, we assumed that the moult stages were displayed the very contrasting NAGase activity levels.

Table 1 Numbers of *P. serratus* specimens (for the epidermis, last abdominal segment, and periopods) or pools (for uropods and telson) used to determine the modulation of the NAGase activity induced by the moult cycle and sex. Three uropods and two telson specimens were pooled to produce a biological replicate

Modulation of NAGase activity during a moult cycle									Modulation of NAGase activity by sex					
									Males			Females		
Moult stages	A	B	C	D0	D1'	D1''	D1'''	D2	D0	D1'	D2	D0	D1'	D2
Last abdominal segment (individual measure)	7	5	9	9	9	9	9	9	7	9	5	10	10	5
Periopods (individual measure)	7	5	9	9	9	9	9	9	5	6	9	9	9	9
Uropods (pools of three specimens)	2	2	3	5	7	10	9	6	2	2	5	4	6	4
Telson (pools of two specimens)	3	3	5	7	9	9	9	5	3	3	7	7	8	6

The numbers of biological replicates (i.e. homogenates per tissue category produced as per measurements in section 2.2) that were used to investigate the effects of the moult cycle and sex are summarised in Table 1. Tissue homogenates of male specimens used to investigate the effect of sex were different to those used to describe the fluctuation of NAGase activity during

the moult cycle. NAGase activity was measured for each tissue based on the optimised protocol, summarised in Table 2.

2.5. Statistical analysis

Statistical procedures were implemented with R software (R Core Team, 2018). Normality and homoscedasticity were checked using the Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively, before conducting parametric analysis.

Variability of NAGase activity in males in different moulting stages was tested using the ANOVA procedure (*lm* function, classical type I decomposition) with post hoc analysis (*pairwise.t.test* with holm correction). Influence of sex on NAGase activity for three moult stages was tested using the ANOVA procedure, including the interaction term with the post hoc analysis. The influence on uropods and telson was insignificant; thus, we grouped stages A and B.

Table 2 Summary of the optimised protocols obtained on the epidermis, last abdominal segment, periopods, uropods, and telson of *P. serratus* specimens

	Epidermis	Last abdominal segment	Periopods	Uropods	Telson
Buffer type & Concentration ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Citrate phosphate buffer 17.5	Citrate phosphate buffer 17.5	Citrate phosphate buffer 17.5	Citrate phosphate buffer 17.5	Citrate phosphate buffer 17.5
4-NAG initial concentration ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	750	750	1,500	1,500	1,500
Homogenates sample volume (μL)	30 μL	30 μL	20 μL	20 μL	20 μL
Reaction time	10–20 min	10–20 min	10–20 min	10–20 min	10–20 min

3. Results

3.1. Optimisation for NAGase assay

NAGase activity was measured using three different buffers for both the epidermis and the last abdominal segment to determine the tissue in which NAGase had its best activity (Fig. 1 a,b). These three buffers showed a similar trend, and the maximum NAGase activity was reached at a pH range of 5–6. The maximum respective NAGase activities using phosphate, TRIS, and citrate phosphate buffers were 2.219 ± 0.366 , 1.361 ± 0.255 , and 2.242 ± 0.172 nmol.min⁻¹ in the epidermis; and 1.460 ± 0.309 , 0.796 ± 0.048 , and 1.308 ± 0.071 nmol.min⁻¹ in the last abdominal segment. These elevated activities decreased by increasing the pH of the reactions until the lowest level was reached at a pH range of 8–9. At this pH range, NAGase activities were then 0.886 ± 0.332 , 0.282 ± 0.082 , and 1.336 ± 0.250 nmol.min⁻¹ in the epidermis and 0.534 ± 0.040 , 0.116 ± 0.016 , and 0.752 ± 0.110 nmol.min⁻¹ in the last abdominal segment, respectively. Despite this similar trend, the TRIS buffer showed a lower activity of NAGase than the phosphate and citrate phosphate buffers. The last abdominal segment had less activity than the epidermis; however, it showed less variability. Their mean variability coefficients were 20 and 12 % for the epidermis and the last abdominal segment, respectively. The citrate phosphate buffer (pKa = pH = 5.15) was selected as the optimal buffer for measuring NAGase activity and used in the following experiment. This is because the buffer has higher activity and stability in a pH range of 5–6.

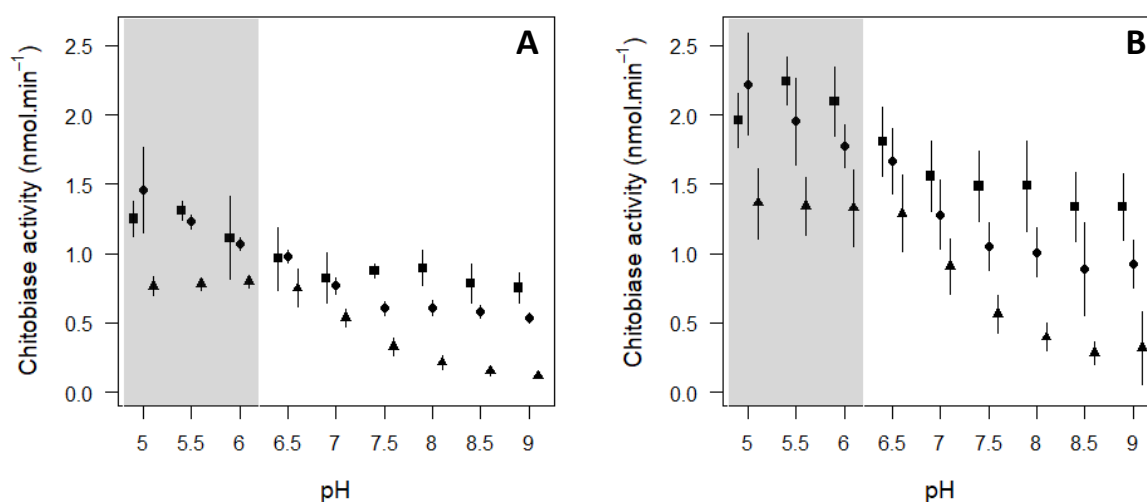


Figure 1 Modulation of NAGase activity of *P. serratus* (expressed in nmol.min⁻¹) by pH and type of buffer on the last abdominal segment (A) and epidermis (B). ■ corresponds to the mean values for the citrate phosphate buffer (17.5 μmol.L⁻¹), ● corresponds to the mean values for the phosphate buffer (50 mmol.L⁻¹), and ▲ corresponds to the mean values for the TRIS buffer (50 mmol.L⁻¹). Segments correspond to +/- standard deviations. Grey rectangles correspond to pH ranges leading to maximum of NAGase activity.

Different concentrations of 4-NAG were tested on each tissue to determine the optimal concentration to attain the highest level of NAGase activity (Fig. 2 a,b,c,d,e). Generally, each tissue showed the same pattern. NAGase activity initially displayed an apparent Michaelian kinetic until it reached maximum activity. The concentration of 4-NAG leading to the maximum NAGase activity varied based on the tissue used. That is, the maximum NAGase activity obtained for a given concentration of 4-NAG ranged between 750 and 1,000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ for the epidermis and the last abdominal segment, and was 1,500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ for periopods, uropods, and telson. Maxima of NAGase activities observed at these concentrations of 4-NAG were higher for periopods ($3.304 \pm 0.427 \text{ nmol.min}^{-1}$) and uropods ($3.069 \pm 0.306 \text{ nmol.min}^{-1}$), and lower for the last abdominal segment ($2.497 \pm 0.376 \text{ nmol.min}^{-1}$) and telson ($2.306 \pm 0.011 \text{ nmol.min}^{-1}$). NAGase activities for all organs decreased beyond these maxima. At a concentration of 4-NAG of 5,000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, the maximum NAGase activities of the epidermis, last abdominal segment, periopods, uropods, and telson were inhibited by 48.2 %, 50.2, 41.5, 32.3, and 31.9 %, respectively¹. Finally, concentrations of 4-NAG of 750 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ for the epidermis and last abdominal segment, and 1,500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ for the periopods, uropods, and telson were selected as optimal for the protocols.

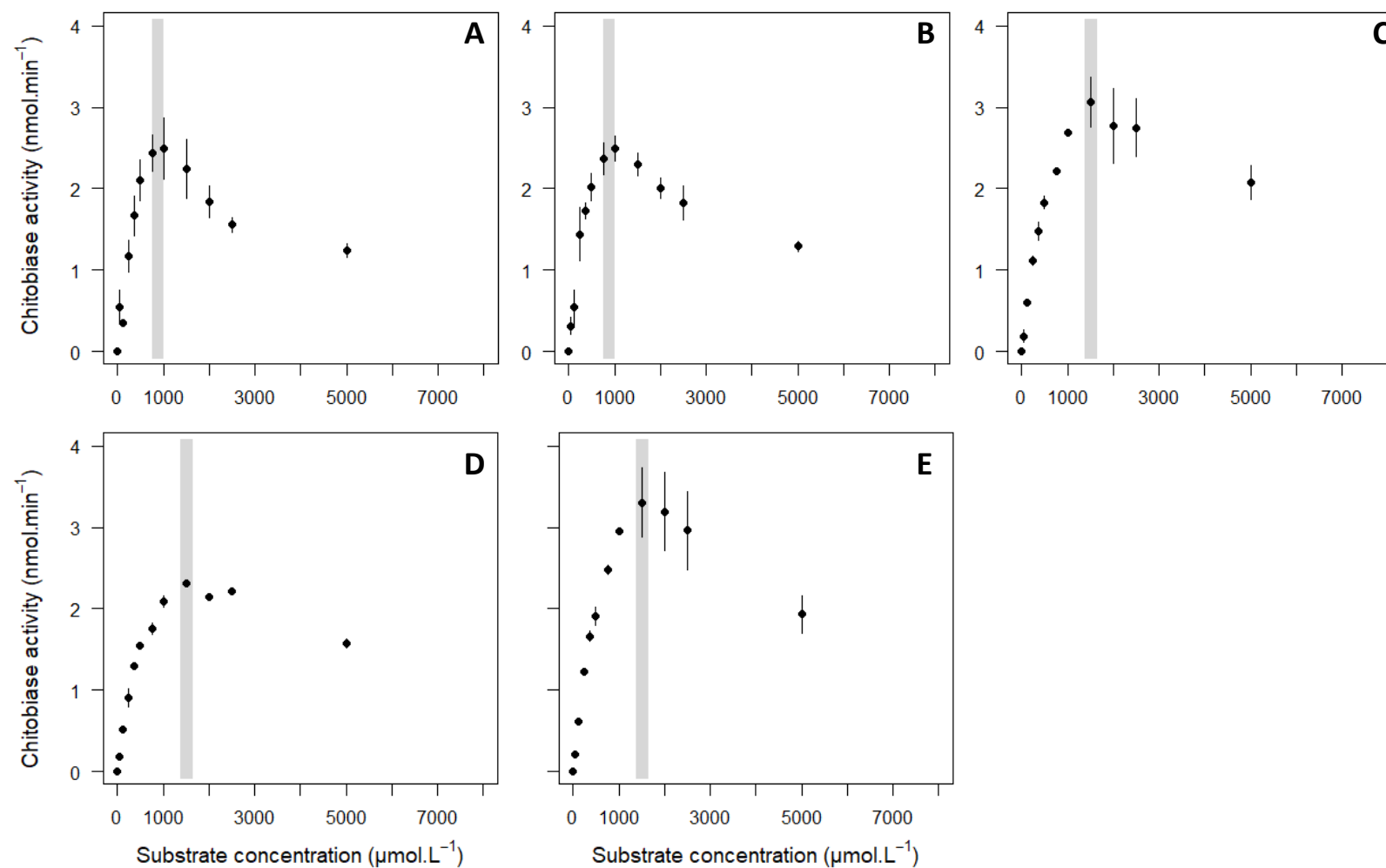


Figure 2 Modulation of NAGase activity of *P. serratus* (expressed in nmol.min⁻¹) by substrate concentration (expressed in μmol.L⁻¹) on last abdominal segment (A), epidermis (B), uropod (C), telson (D), and periopod (E). Segments correspond to +/- standard deviations. Grey rectangles correspond to the substrate concentration range leading to maximum of NAGase activity.

Kinetics of NAGase were analysed using different volumes of enzyme extract to determine the optimal volume required and the best time to analyse NAGase activity (Fig. 3 a,b,c,d,e). Volume of extract of the tissue displayed different profiles of NAGase, from which three main phases were determined. For each condition, the reaction of NAGase started with a non-linear phase, characterised by a minor acceleration of the enzymatic kinetics. A plateau known to occur during the final stages of such experiments (Spindler, 1976) appeared earlier in this experiment, at high volumes of enzyme extract for each of the tested organs. For instance, the plateau of the epidermis and the last abdominal segment started at 25 min when 40 and 50 µL of the enzyme extract was used. No saturation was found when using 20 and 30 µL of the extract. Moreover, saturation occurred faster for periopods, uropods, and telson than for the epidermis and the last abdominal segment. A third phase representing the NAGase reaction linearity occurred between the two above-mentioned events. This latter phase occurred between 10 and 20 min in all the reactions. The linearity highlighted a proportionality between NAGase activity and the quantity of enzyme added to the reaction. We observed that NAGase activity doubled when the volume of the enzyme extract was doubled, between 10 and 20 min in all the reactions. Finally, we retained 30 µL of the enzyme extract for the epidermis and the last abdominal segment and 20 µL for the periopods, uropods, and telson. These volumes represent a balance between high NAGase activity and good measurement stability (i.e. good linearity of the reaction of NAGase and the possibility of intra-individual measurements). Optimised protocols of each of the tested organ of *P. serratus* are summarised in Table 2.

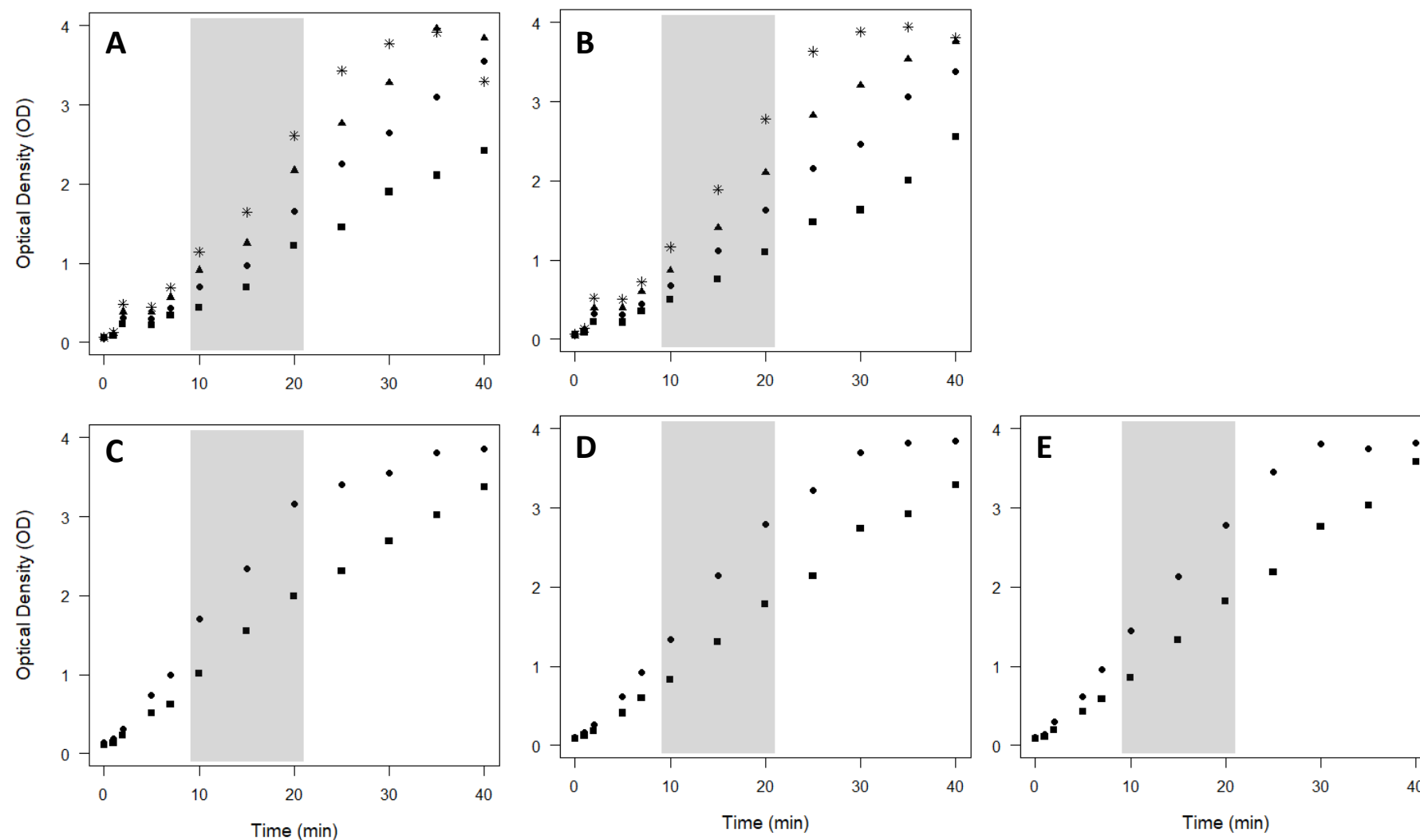


Figure 3 OD increase kinetics of *P. serratus* NAGase activity (expressed in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$) in the last abdominal segment (A), epidermis (B), uropod (C), telson (D), and periopod (E). Modulation of these kinetics was performed by adding 20 μL (■), 30 μL (●), 40 μL (▲), or 50 μL (*) of enzyme extract. Grey rectangles correspond to the time range leading to the best linearity.

3.2. Modulation of NAGase activity as function of moult stage and sex

Fig. 4 (a,b,c,d) shows the variability of NAGase activity during the moult cycle. The results show that NAGase activity varied significantly along the moult cycle (ANOVA: $p = 8.81 \times 10^{-5}$, 1.73×10^{-4} , 3.39×10^{-6} , and 3.84×10^{-5} for the last abdominal segment, periopods, uropods, and telson, respectively). Lowest levels of NAGase activity occurred between intermoult and early premoult. The lowest activity occurred at the C stage for periopods ($1.395 \text{ nmol.min}^{-1}$) and at the D0 stage for the last abdominal segment ($1.190 \text{ nmol.min}^{-1}$), uropods ($1.490 \text{ nmol.min}^{-1}$), and telson ($1.442 \text{ nmol.min}^{-1}$). NAGase activity increased in premoult, to reach its highest value in the D2 stage for all organs (with means of 2.253, 2.830, 3.541, and $3.128 \text{ nmol.min}^{-1}$ for the last abdominal segment, periopods, uropods, and telson, respectively). Stages A to D1''' in uropods and telsons present similar levels of NAGase activity (Post-hoc t tests, $p > 0.05$) and increase only occurs at the stage D2 (Post-hoc t tests, $p < 0.05$). Increase of NAGase activity in the last abdominal segment and periopods begins earlier in stage D1''' (Post-hoc t tests, $p < 0.05$).

Increase of NAGase activity in the early and late premoult varied slightly for different organs, from a ratio of 1.9 for the last abdominal segment to a ratio of 2.4 for uropods. Moreover, the last abdominal segment showed lower NAGase activities in every moult stage than other organs, which had the same range of activity (ANOVA, interaction term: $p = 0.78$; moult stage: $p < 0.05$; tissue: $p < 0.05$). Although NAGase activities displayed the same tendency, periopods showed the highest variability in each of the moult stages, with a mean of variability coefficient of 34.8 % compared to other organs (i.e. 28.9, 22.6, and 27.9 % for the last abdominal segment, uropods, and telson, respectively).

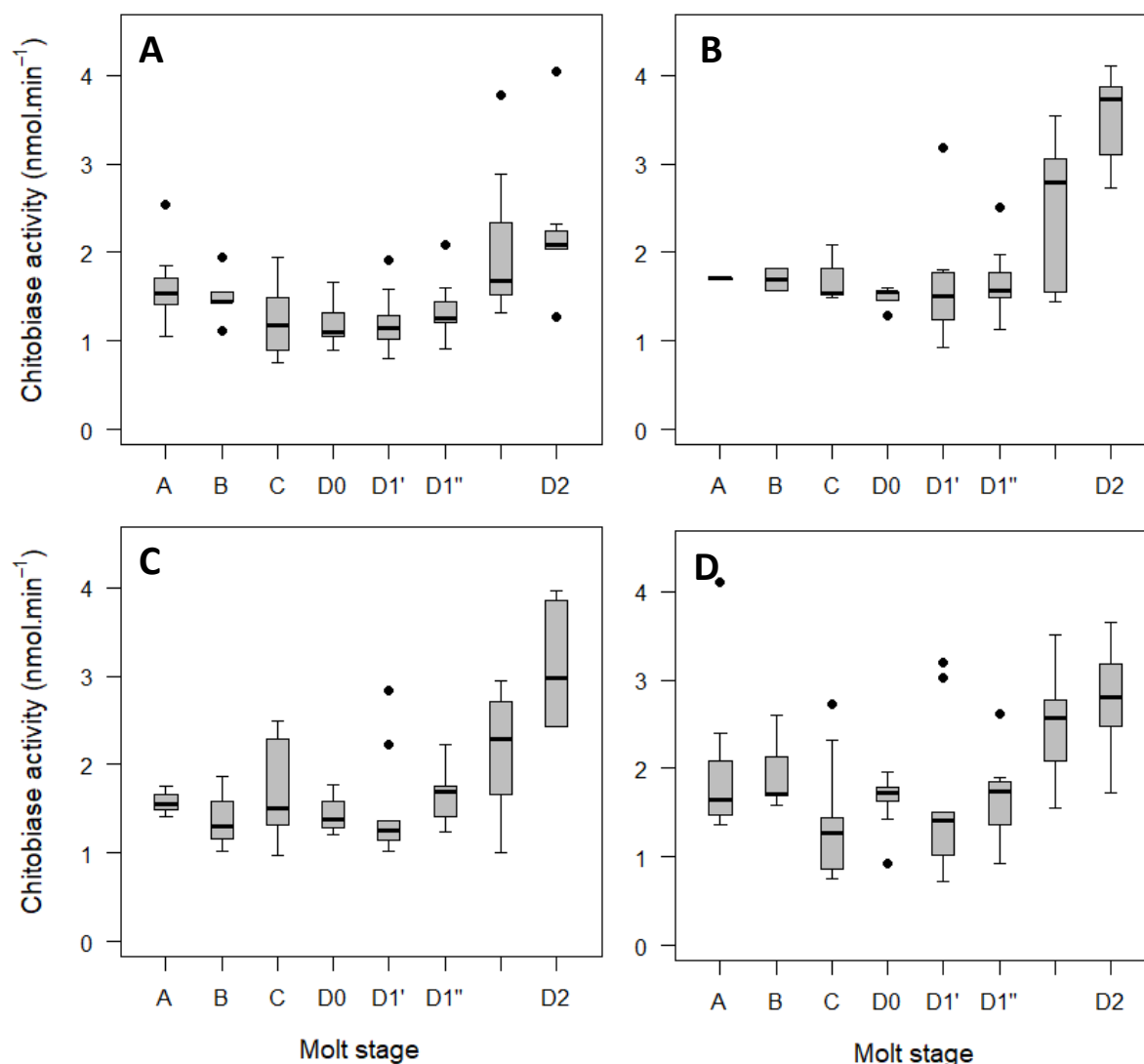


Figure 4 Molt stage effect on NAGase activity of *P. serratus* (expressed in nmol.min⁻¹) for the last abdominal segment (A), uropod (B), telson (C), and periopod (D). Boxes extend from the first to the third quartile, with a bold segment for the median value; the whiskers extend to the most extreme data points, no more than 1.5 times the interquartile range.

Fig. 5 (a,b,c,d) presents the results of the influence of sex on the level of NAGase activity. We observed a significant influence of molt stage on the level of NAGase activity for all organs, but not of sex (ANOVA, interaction term: $p > 0.05$; molt stage: $p < 0.05$; sex: $p > 0.05$). Previous researchers made similar observations (Buchholz, 1989; Spindler-Barth et al. 1990). Additionally, our results show that NAGase activity increased between early and late premoult stages, with higher activity in the D2 stage. The increase ratio was lower for the last abdominal segment and higher for uropods. Respective increases in NAGase activity for males and females were 1.5- and 2.1-fold the levels obtained at early premoult for the last abdominal segment vs 2.8-and 3.0-fold the levels obtained at early premoult for uropods. Periopods and

the last abdominal segment showed the most variability, their respective variability coefficients were 22.3 and 32.4 % for males and 24.3 and 31.9 % for females. In contrast, uropods showed less variability, with coefficients of 12.4 % for males and 19.5 % for females.

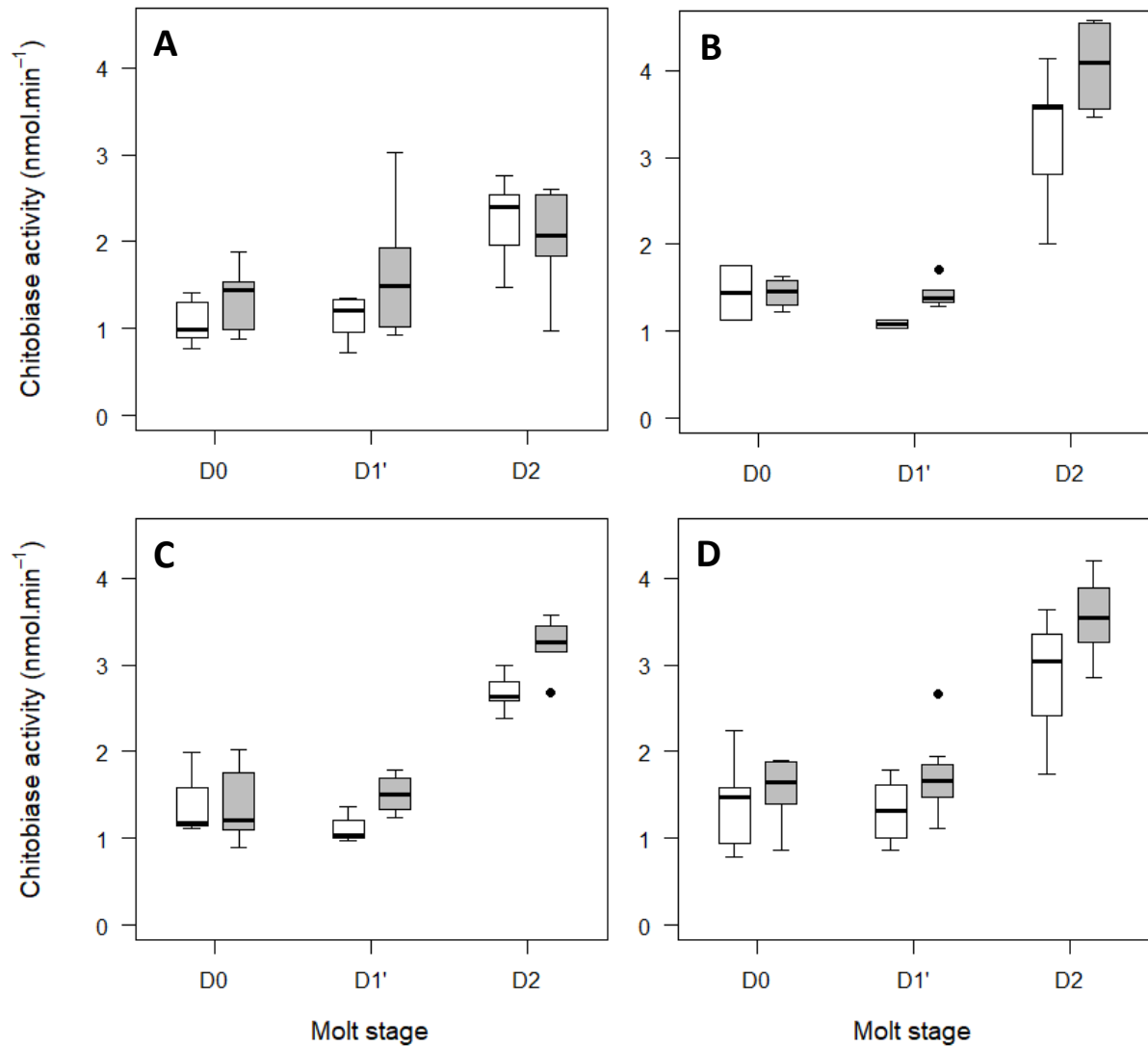


Figure 5 Effect of sex on NAGase activity of *P. serratus* (expressed in nmol.min⁻¹) for the last abdominal segment (A), uropod (B), telson (C), and periopod (D). White boxes correspond to females and grey boxes to males. Boxes extend from the first to the third quartile, with a bold segment for the median value; the whiskers extend to the most extreme data points, no more than 1.5 times the interquartile range

4. Discussion

4.1. Optimisation for NAGase assay

Optimisation of an enzyme assessment protocol for biochemical process is crucial to 1) compare results of the same sample and those obtained from different ones and 2) have a strong sensitive tool that can analyse the enzyme dynamic and its fluctuations. Optimised conditions established in this study are summarised in Table 2. The NAGase in *Palaemon serratus* in this study attained optimum pH values between 5.0 and 6.0, regardless of the buffer under consideration. Other results based on krill (*Euphausia superba* and *Meganyctiphanes norvegica*: Spindler and Buchholz, 1988; Buchholz and Vetter, 1993); drosophila (*Drosophila hydei*: Spindler, 1976); locust (*Locusta migratoria*: Zielkowski and Spindler, 1978); and crab (*Uca pugilator*: Zou and Fingerman, 1999a) commonly found optimum pH values to be between 4.0 and 6.0, with few variations depending on the species studied. These results indicate a relative constancy in pH preferendum of NAGase in arthropods.

In the present study, affinity of NAGase to the colorimetric substrate 4-NAG was assessed to determine the optimum of 4-NAG that results in the maximum NAGase activity. All organs indicated an inhibition of NAGase activity when 4-NAG was in excess. This inhibition was observed at concentrations of 4-NAG in excess of 1,000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ for the epidermis and the last abdominal segment, and above 1,500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ for periopods, uropods, and telson. This phenomenon was also observed in other arthropod species, such as *D. hydei*, *E. superba*, and *M. norvegica*, which inhibited NAGase in concentrations of NAG exceeding 1,000, 500, and 300 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectively (Spindler 1976; Spindler & Buchholz, 1988; Buchholz & Vetter, 1993). In contrast, a classic plateau was observed on other crustaceans, e.g. *D. magna* and *U. pugilator* (Espie & Roff, 1995; Zou & Fingerman, 1999a). Similarly, differences in the optimum of NAG have been reported for different arthropod species. The optimum of NAG of the epidermis of *P. serratus* in the present study is 750–1,000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, which is the same as that obtained for *U. pugilator* in previous experiments (Zou & Fingerman, 1999a). Other defined optima are: 1,000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ for *D. hydei*; approximately 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ for *D. magna*; 300–500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ for *E. superba*; 300 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ for *M. norvegica* (Spindler, 1976; Spindler & Buchholz, 1988; Buchholz & Vetter, 1993; Espie & Roff, 1995; Zou & Fingerman, 1999a). Different researchers use different substrates or NAGase assessment protocols, which complicates the comparison of values such as K_m , V_{max} , or the optimum concentration of NAG. Nevertheless, Spindler (1976) and Buchholz and Vetter (1993) used similar NAGase measurement protocols. However, they obtained two different optimum NAG substrate

concentrations for two different species: 300 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ for krill (*E. Superba*: Bucholz and Vetter, 1993), and 1,000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ for drosophila (*D. hydei*: Spindler, 1976). In the present study, the epidermis and the last abdominal segment showed optimum concentrations of NAG of 750–1,000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, whereas the optimum for uropods, periopods, and telson was 1,500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Zou and Fingerman (1999a) had similar results when they compared NAGase activity in the hepatopancreas and epidermis of *U. pugilator*, and found the optimum of NAG of 300 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ and 750–1,000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectively. The NAGase produced by these organs has various roles: hepatopancreas NAGase is involved in the digestive process, whereas epidermis NAGase plays a role in the moulting process. These different roles may require different levels of NAGase activities and properties, such as the optimum of NAG. In the present study, we assessed the optimum of NAG of different organs involved in the moulting process. Our observations reflect the importance of optimising NAGase protocols according to species and organs used.

Effects of enzyme quantity on NAGase activity and reaction linearity have rarely been described for insects and crustaceans. In the present study, observation times for the linearity phase of the sampled organs were maintained between 5 min to 30 min, regardless of the concentration of the enzyme extract at the respective optimum concentrations of NAG. Below 5 min, the reaction showed a non-linear phase, which can be avoided by improving homogenisation between an enzyme and its substrate at the beginning of the reaction. Therefore, taking a reaction time upper 25 min could give a risk to reach a plateau, particularly with organisms in premoult which have a higher NAGase activity. For these reasons, the period between 10 and 20 min was considered as the optimal duration to assess NAGase activity. This duration is consistent with those reported in the literature. For example, Espie and Roff (1995) and Spindler (1976) found that *D. magna* and *D. hydei* NAGases, with concentrations of NAG of 300 and 3,000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectively, had stable linearity phases of up to 10 min and 1 h. Variations in the duration of the linearity phases were attributed to differences in the analysing protocols, particularly the balance between the concentration of NAG and the quantity of enzyme extract added in the reaction. Spindler (1976) used a concentration of NAG 3-fold higher than in the present study, and maintained the reaction in a linear phase for 60 min. The plateau of each tissue, tested at its optimum of NAG, occurred faster when the quantity of enzyme extract was high. Our results here are comparable to those of the test conducted by Spindler (1976) on effects of the quantity of enzyme extract on NAGase activity, on two concentrations of NAG. Therefore, the reaction reached saturation when more enzyme extract containing NAGase was added. Saturation in Spindler's experiment occurred at a concentration

of enzyme of 1 mg.mL^{-1} and a concentration of NAG of $1,000 \text{ μmol.L}^{-1}$, whereas no saturation occurred when up to 3 mg.mL^{-1} of enzyme extract was added at a concentration of NAG of $3,000 \text{ μmol.L}^{-1}$. The linearity parameter is crucial for studies on enzyme characterisation and use, particularly to compare samples that provide reproducibility of a measurement protocol. However, this parameter in association with crustacean NAGase is not adequately discussed in the literature. Therefore, finding a compromise between the quantity of enzyme and NAG is important for a better assessment of NAGase activity in arthropod organisms. In this study, the quantity of enzyme extract approximately corresponds to a volume fixed at 30 μL for the epidermis and the last abdominal segment, and 20 μL for pereopods, uropods, and telsons. This is a good compromise between ensuring occurrence of a linearity reaction and increased sensibility to detect differences in NAGase activity for different organisms.

We considered the afore-mentioned parameters and defined an optimised protocol suitable for each of the tested organs. These protocols resulted in the study of the NAGase activity in *Palaemon serratus* with a good repeatability for variability coefficients below 8 %.

4.2. Modulation of NAGase activity as a function of the moult stage and sex

Tests for the influence of physiological factors on NAGase activity were based on analysing replicates from individual samples, and not from a pool of prawns, as was done in the optimisation phase. These experiments showed high variability between organisms for each tested tissue, including those sharing the same moult stage and/or sex. Variability coefficients obtained during physiological influence assays were between 22 and 35 % for the moult stage analysis and 12 and 33 % for the sex analysis. The high values of inter-individual variabilities obtained for *P. serratus* in this study were very similar to those achieved through the influence of the NAGase moult stage in *U. pugilator* (Zou & Fingerman, 1999a); *L. migratoria* (Zielkowiak & Spindler, 1978); *E. superba* (Buchholz, 1989); and *P. serratus*. However, the latter had slightly lower inter-individual variabilities than those of the present study (mean of coefficient variabilities of approximately 15 %: Spindler-Barth et al. 1990). The high inter-individual variability must be carefully accounted for when interpreting results of physiological or environmental influences on NAGase activity.

NAGase activity of *P. serratus* in the moult cycles of all tested organs occurred first as a low and stable activity phase during stages A to D1', followed by an increase in activity, reaching its highest level at the end of the premoult, in the D2 stage. This profile has been reported for crustaceans such as *E. superba* (Buchholz, 1989), *P. serratus* (Spindler-Barth et al. 1990), and *U. pugilator* (Zou and Fingerman, 1999a). The peak in NAGase activity at the end

of the premoult is linked to the apolysis process in crustaceans, wherein secretion of chitinolytic enzymes degrades the cuticle, thus allowing the organism to moult. However, a second peak, weaker than the one found at the D2 stage, was occasionally found at the D1'' stage (*P. serratus*: Spindler-Barth 1990) or immediately before ecdysis at the D3–D4 stages (*L. migratoria*: Zielkowski and Spindler, 1987; *E. superba*: Buchholz, 1989). In this study, these moult stages were considered too short to obtain adequate extractions from organisms, as the stages occur a few hours before ecdysis. Nevertheless, these stages were not observed in any of the dissections. An increase in NAGase activity observed in the D2 stage, in our experiments, led to a maximum level in activity, of approximately 1.9–2.4-fold the basal level found in the C–D0 stages. Low and high levels of NAGase activity produced the same ratio in *U. pugilator* (Zou and Fingerman, 1999a). However, Spindler-Barth (1990) and Buchholz (1989) found higher ratios of 8 and 13, respectively, for the same species. Both researchers detected very low activity at the intermoult to mid premoult stages compared to the present study, which could partly explain the high ratio values.

In contrast to the moult stage, sex did not show any effect on NAGase activity in *P. serratus*. Both males and females showed a significant increase in NAGase activity in the D2 stage; however, no other differences were observed. Occurrence of the same pattern of the effect of the moult stage on both sexes will aid in future investigations on influences of biological, physiological, or ecotoxicological factors on NAGase activity. The pattern could be considered as a reflection of the quality of moulting in crustaceans, and thus it could be used to develop NAGase activity as a biomarker. There were no possibilities to compare our results on the influence of sex on NAGase activity with those from other researchers, as they have preferentially focused on investigating the male species.

4.3. Selection of suitable organs to measure NAGase activity

The use of large quantities of organs when assessing NAGase activity in crustacean moulting analyses remains rare. Classical assessments of NAGase activity were conducted on the crustacean epidermis, where chitinolytic enzymes had secreted, or on the whole organism for very small crustaceans whose epidermis was difficult to extract. If this tissue was common in protocols of NAGase activity measurements, the epidermis is disadvantageous, particularly considering time and logistics of sample collection. Dissecting the epidermis requires high precision and it is time consuming; therefore, this tissue may not be suitable for studies involving the collection of large quantities of biological replicates and large acquisitions of data. These kinds of studies are crucial to determine a suitable alternative to the abdominal

epidermis and require knowledge of: i) the characteristics of NAGase activity for different organs; and ii) their dynamics along the moult cycle and/or other intrinsic factors. In the present study, NAGase activity of *P. serratus* from the epidermis, last abdominal segment, pereopods, uropods, and telson were assessed: first, to determine an optimised and suitable protocol of activity measurement for each tissue; and second, to determine the influence of two physiological factors: the moult cycle and sex, on NAGase activity.

Modulations between tested organs were observed in the protocol optimisation step. Hence, although the last abdominal segment showed a weaker NAGase activity than the epidermis, probably because of the presence of muscles in the first cited tissue, these organs showed similarities in NAGase characteristics, such as the optimum of NAG and reaction linearity of the added enzyme extract. Contrarily, pereopods, uropods, and telson showed differences in: i) the optimum of NAG; and ii) NAGase activity for the same quantity of enzyme extract used; and iii) reaction linearity; and reached their plateau faster. Pereopod, uropod, and telson samples had been collected with the cuticle surrounding them, which may have conserved the moulting fluid between the epidermis and cuticle, in which NAGase activity occurs. The fluid possesses a hypothetical higher pool of NAGase than the epidermis or the last abdominal segment.

Despite the above-mentioned modulations, organs showed similar patterns of NAGase activity throughout the entire moult cycle, with an increase of activity at the late premoult. This increase in activity was observed to be at the same level for both male and female specimens. However, a slight contrast was observed in the inter-individual variability of organs. Uropods and pereopods presented the lowest and highest variabilities, respectively, for both the moult stage and sex assays. The obtained variability coefficients for influences of the moult stage and sex were 22.6, 12.4, and 19.5 % for uropods and 34.8, 22.3, and 31.9 % for pereopods. These observations led to the following question: which tissue would be the best for studying and tracing NAGase activity in *Palaemon serratus*? Answering this question depends on the objectives of the study. If the study involves using a large number of organisms, as was the case in this study, the epidermis will be the first tissue to be rejected, as dissecting to collect this tissue is very demanding of time and energy. Using telson for individual observations would be disadvantageous as the animal is small, and thus it would not produce adequate quantities of NAGase to fulfil assays and it would be necessary to pool many organisms for a single experiment. Results of individual tests show that pereopods have a higher variability; consequently, they showed different responses compared to other tissues. This variability complicates the interpretation process; therefore, pereopods should be avoided in further

investigations of NAGase activity. The last abdominal segment and uropods are considered as suitable organs for studies on individual investigations using NAGase activity as a moult marker. However, we recommend using uropods for such studies as samples can be collected faster and the experiment showed the highest repeatability and reproducibility. More data are required to provide a precise answer on the comparison between these two organs. Presently, both may be used in an optimised manner to define NAGase activity as a tool to investigate physiological, biological, and ecotoxicological influences on the crustacean moult.

5. Conclusion

In this study, we formulated optimised protocols for measuring NAGase activity based on experiments on five organs from *P. serratus*. The protocols have good repeatability (variability coefficient is below 8 %) and satisfactorily detected modulations between individuals.

Basing on these protocols, we determined that NAGase activity was significantly influenced by the moult cycle, and that there is an increase of activity at late premoult, which corresponds to its role in apolysis. However, sex of the prawns did not affect NAGase activity; once confirmed this could simplify logistics in supplies for experiments that require limited numbers of organisms (e.g. biomonitoring and/or exposure). Therefore, further investigations on influence of sex on the organisms are required to confirm our findings. Our results indicate uropods and the last abdominal segment as the two organs suitable for replacing the epidermis in NAGase studies, particularly those involving a large number of specimens. Our study shows that NAGase activity is simple to measure and has high repeatability; therefore, it could be combined with classical approaches to greatly improve monitoring of the moulting process.

References

- Anderson, G.S., 1985. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Gulf of Mexico): grass shrimp. The Service.
- Buchholz, F., 1989. Moult cycle and seasonal activities of chitinolytic enzymes in the integument and digestive tract of the Antarctic krill, *Euphausia superba*. Polar Biology 9, 311–317.

- Buchholz, F., Vetter, R.A.H., 1993. Enzyme kinetics in cold water: characteristics of N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity in the Antarctic krill, *Euphausia superba*, compared with other crustacean species. *Journal of Comparative Physiology B* 163, 28–37.
- Campillo, A., 1975. Contribution a l'étude de l'élevage de la crevette rose *Palaemon serratus* (Pennant) en captivité. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 39, 381–393.
- Chang, E.S., Bruce, M.J., Tamone, S.L., 1993. Regulation of crustacean molting: a multi-hormonal system. *American Zoologist* 33, 324–329.
- Drach, P., 1939. Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes. *Ann. Inst. Oceanogr. Monaco* 19, 103–391.
- Drach, P., Tchernigovtzeff, C., 1967. Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. *Vie milieu* 18, 595–610.
- Erraud, A., Bonnard, M., Chaumot, A., Geffard, O., Duflot, A., Forget-Leray, J., Le Foll, F., Geffard, A., Xuereb, B., 2018a. Use of sperm DNA integrity as a marker for exposure to contamination in *Palaemon serratus* (Pennant 1777): Intrinsic variability, baseline level and in situ deployment. *Water research* 132, 124–134.
- Erraud, A., Bonnard, M., Duflot, A., Geffard, A., Danger, J.-M., Forget-Leray, J., Xuereb, B., 2018b. Assessment of sperm quality in palaemonid prawns using Comet assay: methodological optimization. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 11226–11237.
- Espie, P.J., Roff, J.C., 1995. Characterization of chitobiase from *Daphnia magna* and its relation to chitin flux. *Physiological zoology* 68, 727–748.
- Freeman, J.A., Bartell, C.K., 1975. Characterization of the molt cycle and its hormonal control in *Palaemonetes pugio* (Decapoda, Caridea). *General and comparative endocrinology* 25, 517–528.
- Gismondi, E., Thomé, J.-P., 2014. Effects of two PBDE congeners on the moulting enzymes of the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Environmental pollution* 191, 119–125.
- Gooday, G.W., 1990. The ecology of chitin degradation, in: *Advances in Microbial Ecology*. Springer, pp. 387–430.

- Hanson, M.L., Lagadic, L., 2005. Chitobiase activity as an indicator of aquatic ecosystem health. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 8, 441–450.
- Husen, T.J., Kamble, S.T., Stone, J.M., 2015. Effect of pentoxifylline on chitinolytic enzyme activity in the Eastern subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of entomological science* 50, 295–310.
- Jeuniaux, C., 1975. III. Chitine et complexes chitino-protéiques de la cuticule. *Traité de zoologie: Insectes: Téguments, système nerveux, organes sensoriels. Tome VIII, fascicule III* 31–44.
- Kono, M., Wilder, M.N., Matsui, T., Furukawa, K., Koga, D., Aida, K., 1995. Chitinolytic enzyme activities in the hepatopancreas, tail fan and hemolymph of kuruma prawn *Penaeus japonicus* during the molt cycle. *Fisheries science* 61, 727–728.
- Lafontaine, A., Gismondi, E., Boulangé-Lecomte, C., Geraudie, P., Dodet, N., Caupos, F., Lemoine, S., Lagadic, L., Thomé, J.-P., Forget-Leray, J., 2016. Effects of chlordecone on 20-hydroxyecdysone concentration and chitobiase activity in a decapod crustacean, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquatic toxicology* 176, 53–63.
- Luo, J., Pei, S., Jing, W., Zou, E., Wang, L., 2015. Cadmium inhibits molting of the freshwater crab *Sinopotamon henanense* by reducing the hemolymph ecdysteroid content and the activities of chitinase and N-acetyl-β-glucosaminidase in the epidermis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 169, 1–6.
- Peters, G., Saborowski, R., Buchholz, F., Mentlein, R., 1999. Two distinct forms of the chitin-degrading enzyme N-acetyl-β-d-glucosaminidase in the Antarctic krill: specialists in digestion and moult. *Marine Biology* 134, 697–703.
- Qi, S., Wang, Chen, Chen, X., Qin, Z., Li, X., Wang, Chengju, 2013. Toxicity assessments with *Daphnia magna* of Guadipyr, a new neonicotinoid insecticide and studies of its effect on acetylcholinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and chitobiase activities. *Ecotoxicology and environmental safety* 98, 339–344.
- Richard, P., 1978. Influence de la température sur la croissance et la mue de *Palaemon serratus* en fonction de leur taille. *Aquaculture* 14, 13–22.

- Richards, S.M., Kelly, S.E., Hanson, M.L., 2008. Zooplankton chitobiase activity as an endpoint of pharmaceutical effect. *Archives of environmental contamination and toxicology* 54, 637–644.
- Roberts, W.K., Selitrennikoff, C.P., 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Microbiology* 134, 169–176.
- Song, Y., Villeneuve, D.L., Toyota, K., Iguchi, T., Tollefsen, K.E., 2017. Ecdysone receptor agonism leading to lethal molting disruption in arthropods: review and adverse outcome pathway development. *Environmental science & technology* 51, 4142–4157.
- Spindler, K.-D., 1976. Initial characterization of chitinase and chitobiase from the integument of *Drosophila hydei*. *Insect Biochemistry* 6, 663–667.
- Spindler, K.-D., Buchholz, F., 1988. Partial characterization of chitin degrading enzymes from two euphausiids, *Euphausia superba* and *Meganyctiphanes norvegica*. *Polar Biology* 9, 115–122.
- Spindler-Barth, M., Van Wormhoudt, A., Spindler, K.-D., 1990. Chitinolytic enzymes in the integument and midgut-gland of the shrimp *Palaemon serratus* during the moulting cycle. *Marine Biology* 106, 49–52.
- Subramoniam, T., 2016. Sexual biology and reproduction in crustaceans. Academic Press.
- Zielkowski, R., Spindler, K.-D., 1978. Chitinase and chitobiase from the integument of *Locusta migratoria*: characterization and titer during the fifth larval instar. *Insect Biochemistry* 8, 67–71.
- Zou, E., 2005. Impacts of xenobiotics on crustacean molting: the invisible endocrine disruption. *Integrative and Comparative Biology* 45, 33–38.
- Zou, E., Fingerman, M., 1999. Chitobiase activity in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab *Uca pugilator* during the molting cycle. *Marine Biology* 133, 97–101.
- Zou, Enmin, Fingerman, M., 1999a. Effects of estrogenic agents on chitobiase activity in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Ecotoxicology and environmental safety* 42, 185–190.
- Zou, Enmin, Fingerman, M., 1999b. Effects of exposure to diethyl phthalate, 4-(tert)-octylphenol, and 2, 4, 5-trichlorobiphenyl on activity of chitobiase in the epidermis and

hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca pugilator*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology 122, 115–120.

4.2. Mesure du pouvoir discriminant de l'activité N-acétyl-β-D-glucosaminidase par expositions *in vitro*

Publication n°2 :

Screening *in vitro* of xenobiotics on the activity of the N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase of the marine prawn, *Palaemon serratus*.

Marc Rollin, Romain Coulaud, Béatrice Rocher, Elise Billoir, Olivier Geffard, Aurélie Duflot, Frank Le Foll and Benoit Xuereb.

Résumé

La N-acétyl-β-D-glucosaminidase (NAGase) est une enzyme importante pour les crustacés puisque son activité est impliquée dans le bon déroulement du processus de mue. En raison de sa position en aval des mécanismes de régulation hormonale de la mue, cette enzyme chitinolytique a été l'une des cibles moléculaires les plus utilisées pour étudier les capacités des xénobiotiques à altérer la mue. Parmi ces études, seule une infime partie s'est focalisée sur l'altération directe de la NAGase via l'application d'essais *in vitro*. L'objectif de la présente étude est de réaliser un screening *in vitro* d'un total de 19 composés et d'évaluer leur capacité à altérer l'activité de la NAGase de la crevette marine *Palaemon serratus*. Ces composés ont été sélectionnés pour leur abondance dans l'environnement, ainsi que le fait avéré pour certains à altérer la mue des crustacés.

Une première étape consistait à déterminer un solvant adéquat pour solubiliser les composés hydrophobes, sans altérer l'activité de la NAGase. Parmi les quatre solvants testés, l'éthanol a été le seul solvant à ne montrer aucun effet sur l'activité enzymatique ni sur le pool protéique contenu dans l'extrait enzymatique. Le screening des composés a mis en évidence que la majorité d'entre eux n'induisait pas d'effets sur l'activité de la NAGase, déclenchant des altérations de la mue en perturbant d'autres mécanismes impliqués dans le processus. Cependant, la pentoxifylline, le DMSO, le fénoxycarbe, le dithiocarbamate, le méthanol et le RH5849 ont montré une altération spécifique de l'activité de la NAGase, sans dégrader le pool protéique. En parallèle, le cadmium, le zinc et le glyphosate ont induit des altérations à la fois sur l'activité de la NAGase mais aussi des dégradations des protéines. Enfin, l'ibuprofène et le diclofénac ont uniquement montré une dégradation protéique.

Article en préparation pour le journal *Comparative Biochemistry & Physiology: part C*

Screening *in vitro* of xenobiotics on the activity of the N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase of the marine prawn, *Palaemon serratus*.

Marc Rollin¹, Romain Coulaud¹, Béatrice Rocher¹, Elise Billoir², Olivier Geffard³, Aurélie Duflo¹, Frank Le Foll¹ and Benoit Xuereb¹

¹Le Havre Normandie University (ULHN), FR CNRS 3730 SCALE, UMR-INERIS 02 Environmental Stresses and Biomonitoring of Aquatic Ecosystems (SEBIO), 25 rue Philippe Le Bon - 76600 Le Havre – France.

²Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), Université de Lorraine, UMR 7360, Rue C. Bernard, 57070 Metz, France

³UR MALY, INRAE, 5 rue de la Doua, F-69626 Villeurbanne, France

***Corresponding authors:**

Email: benoit.xuereb@univ-lehavre.fr

Tel: +33 2 32 85 99 11; fax: +33 2 32 74 45 05

Abstract

N-acetyl-β-D-Glucosaminidase (NAGase) is an important enzyme for crustaceans since its activity allows the well moulting process of the organism. Owing to its downstream position in the hormonal moult regulation, this chitinolytic enzyme has been one of the most used targets to detect the ability of xenobiotics to alter the moulting process. Among these uses, only a few studies focused on the direct alteration of NAGase activity thanks to *in vitro* assays. The present study aimed to screen *in vitro* a total of 19 compounds of different molecule families on the NAGase activity, extracted without being purified, of the marine prawn *Palaemon serratus*. The compounds were selected for their abundance and concern in the environment or their link in crustacean moult alterations. A first step consisted of determining a suitable solvent (i.e. with no impacts on NAGase activity essentially) permitting to dissolve hydrophobic compounds. Among the four solvents tested, ethanol was the only one which had no effect on enzyme activity nor on proteins present in the enzyme extract. The screening of compounds determined that most of these molecules had no effect on NAGase activity, triggering moult alterations by disturbing other mechanisms involved in moulting process. However, pentoxifylline, DMSO, fenoxycarb, dithiocarbamate, methanol and RH5849 showed a specific alteration on the activity of NAGase, without degrading the protein contents. In parallel, cadmium, zinc and glyphosate showed a nonspecific alteration, degrading both the enzyme activity and the proteins. Finally, ibuprofen and diclofenac displayed only an alteration of protein contents, which led to the conclusion that the normalisation of NAGase activity, especially when analysing this activity on non-purified enzyme extract, will result in a loss of information about the mode of action of xenobiotics on the moult alteration.

1. Introduction

Moult is a key process in crustacean physiology allowing the periodic renewing of their rigid exoskeleton, the cuticle. By temporarily releasing the organism from its cuticle, moulting process is also crucial for the achievement of the metamorphosis of larvae stages, as well as for ensuring growth and reproduction of adult specimens (Subramoniam, 2016). The phenomenon of moult is ensured by the realisation of the moult cycle which is marked by the succession of physiological events (Drach, 1939; Freeman & Bartell, 1975). Classically, the moult cycle is subdivided into three main steps with *i*) the postmoult starting just after the ecdysis, consisting of the cuticle rigidification and mineralisation, *ii*) the intermoult, period in which the cuticle is in a steady state, and *iii*) the premoult which is triggered by the apolysis (i.e. detachment of the epidermis from the cuticle by moulting fluid action) and marked by the degradation and synthesis of the old and new cuticles, respectively. These major cuticle changes involved in the well moult cycle realisation are made possible thanks to a complex machinery of regulation requiring the action of a many molecular targets to be correctly achieved (Song et al. 2017). Today, it is well known that these molecular targets may be sensitive to several factors including the action of xenobiotics (Zou, 2005; 2020), which can lead to altered moulting or organism death.

Among molecular targets involved in the moulting process of crustaceans, N-acetyl-β-D-Glucosaminidase (NAGase) appears to be a good candidate to study the moult quality. This enzyme, combined to chitinase, ensures the degradation of the cuticle chitin during the premoult phase (Jeuniaux, 1975; Gooday, 1990). Associated with the moulting process, action of NAGase occurs downstream to the moult hormonal regulation system, linking this molecular regulation to physiological events occurring on the cuticle. Furthermore, its activity is easy to investigate using a specific substrate. During the past decades, NAGase characterisation has been made on several arthropods including hexapods (*Drosophila hydei*: Spindler, 1976; *Locusta migratoria*: Zielkowski & Spindler, 1978; *Manduca sexta*: Koga et al. 1982), as well as Brachyuras (*Uca pugilator*: Zou & Fingerman, 1999; *Scylla serrata*: Zhang et al. 2006), Daphniidae (*Daphnia magna*: Espie & Roff, 1995); Euphausiidae (*Euphausia superba* & *Meganyctiphanes norvegica*: Spindler & Buchholz, 1988; Buchholz & Vetter, 1993) and Penaeidae (*Litopenaeus vannamei*: Xie et al. 2004), improving the methodologies for measuring this enzyme. The aforementioned reasons have made the NAGase activity a marker of interest among the most used ones to monitor the moult alteration by xenobiotic.

In this way, NAGase activity has been widely used in ecotoxicological approaches, particularly in controlled conditions through *in vivo* bioassays. Such bioassays reported sensitivities of crustacean NAGase activities to heavy metals (cadmium: Luo et al. 2015; Mesquita et al. 2015), organic solvents (4-octylphenol: Zou & Fingerman, 1999b), PBDE and PCBs (Zou & Fingerman, 1999b,c; Gismondi & Thomé, 2014), pesticides (Zou & Fingerman, 1999b; Williams, 2012; Lafontaine et al. 2016; Qi et al. 2018; De Melo et al. 2020), plasticisers (Zou & Fingerman, 1999c), PAHs (Zou, 2009) and pharmaceuticals (oestrogen compounds: Zou & Fingerman, 1999b; antidepressants: Richards et al. 2008; Mesquita et al. 2011; anticonvulsant: Chen et al. 2019). These observations reinforce the interest of NAGase as a marker of moult alteration. However, since NAGase depends on the good realisation of moult molecular regulation occurring upstream, these bioassays do not answer the following question: does the pollutant directly alter NAGase and its activity or does it disrupt this enzyme indirectly by altering its regulation? Thus, to have a better knowledge of how the pollutant may alter NAGase activity, complementary assays have to be achieved.

To answer the question of how the pollutant affects NAGase activity, one possibility is to extract the enzyme from the organism and expose it by *in vitro* assays. Thus, by excluding the molecular moult regulation, this approach allows the discrimination of specific alteration of NAGase activity by xenobiotics from indirect disturbance of this enzyme (e.g. ecdysteroid synthesis and activity disturbances, ecdysone receptor disfunction). Contrary to *in vivo* assays, the *in vitro* approach of NAGase alteration has been poorly investigated, using a weak crustacean diversity (i.e. NAGase extracted from the Brachyura *Scylla serrata* or the Penaeidae *Litopenaeus vannamei*). However, this approach reveals a direct NAGase alteration by heavy metals (Lin et al. 2005; Yang et al. 2006; Zhang et al. 2010), antibiotics (Yan et al. 2007; Du et al. 2008), organic disinfectant agents (Xie et al. 2009) and amino acids (Xie et al. 2006). Interestingly, many xenobiotics such as pesticides, which altered NAGase activity during *in vivo* assays, have for the most not been investigated with *in vitro* approaches.

In this context, the main objective of the present study was to assess the possibility of a set of selected pollutants to directly alter the NAGase activity of *Palaemon serratus*. *P. serratus* (Pennant, 1777) is a marine prawn species widely distributed in Europe, from Mediterranean to Baltic sea (Campillo, 1975). In these ecosystems, this prawn is abundant and plays a key role in trophic systems, being a prey of interest for many fishes and other crustaceans (Anderson, 1985). Furthermore, *P. serratus* is easy to collect and to maintain under either laboratory or *in situ* conditions. These characteristics made *P. serratus* a suitable species to be used in

ecotoxicological and ecological approaches (Erraud et al. 2018,2019). The moult cycle of *P. serratus* has been described in the literature (Drach, 1939; Drach & Tchernigovtzeff, 1967; Erraud et al. 2018). Furthermore, an optimised methodology allowing the NAGase activity assessment has been made on this species (Rollin et al. 2021). By assessing the marker variability, it appeared that *P. serratus* NAGase activity was influenced by the moult cycle, but not by the specimen gender (Spindler-Barth et al. 1990; Rollin et al. 2021).

For this purpose, the study was conducted in two steps. The first step focused on the seek of a solvent being able to dissolve organic compounds that had a weak water solubility, as well as not to impact on *P. serratus* NAGase activity nor integrity. For this, four organic solvents basically used to dissolve organic compounds, were assessed on their ability to alter three parameters observed along *in vitro* exposures: raw NAGase activity, normalised NAGase activity, and protein contents in enzyme extract. Based on results obtained during this first step, 19 compounds, known to be abundant in aquatic systems and/or to have an impact on moulting process were selected to expose *in vitro* the *P. serratus* NAGase to a wide range of concentrations. Effects of these compounds were observed by measuring both the NAGase activity and the protein present in the enzyme extract.

2. Material and methods

2.1. Biological material

During the winter period between November 2018 and March 2019, male specimens of *Palaemon serratus* were bought to a professional fisherman of Le Havre (DYFLO) who used specific traps deployed in the 2 nautical miles zone of the Cap of La Hève (Le Havre, Normandy, France) to capture them. Once bought, prawns were brought to the laboratory within one hour, using 30-L propylene tanks filled with Seawater (SW, 30 ‰; 19 ± 1 °C) coming from thalassotherapy Centre of Deauville (Normandy, France). In addition to its classic use in human health, chemical measuring performed by an independent laboratory (La Drome Laboratoire, Valence, France) revealed the good quality of this seawater. Then prawns were transferred into 80 L aquariums supplied with SW which was constantly filtrated and oxygenated. Temperature was fixed at 19 ± 1 °C, while a photoperiod of 16/8 light/dark was made. Inside aquariums, a maximum density of one prawn per litre was respected. The prawns were fed daily with shrimp pellets (Vanna starter, Le Gouessant®) until being used for analyses, which occurred a week after their laboratory acclimation at maximum.

Regularly, the moult stage was checked on the prawns, using the determination method displayed by Erraud et al. 2018. Only specimens being in late premoult -at the end of moult cycle: D1'''-D2 stages- were selected for enzymatic assays. These moult stages have been retained owing to the high values of NAGase activity expressed in this period (Rollin et al. 2021). Once selected, each prawn was sized (i.e. rostrum length measured from the tip of rostrum to the eye base; cephalothorax length measured from the eye base to the junction between cephalothorax and abdomen, abdomen length measured from the junction between cephalothorax and abdomen to the bottom of the tail), and weighted before being placed on ice for dissection. Briefly, last abdominal segment was extracted by cutting it away from the abdomen, then moving the surrounding cuticle with fine scissors. Last abdominal segment was weighted, then placed into microtubes, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until being used to produce enzymatic extracts needed to perform NAGase activity assays.

One week prior to assays, enzymatic extract aliquots were made with 8-10 last abdominal segment samples, using the method described by Rollin et al. (2021). Briefly, tissues were transferred into citrate phosphate buffer (pH 5.15, 17,5 mmol.L⁻¹) at a ratio (w/v) of 1:8 and crushed at ambient temperature with a bead homogenizer Precellys®, using 1mm glass microbeads. Homogenisation was achieved with 2 cycles of 10 seconds at 6 000 xg, with a 5 second break in between. The mix was then centrifuged during 20 min at 10 000 xg, at 4°C. Supernatants were collected, homogenised, and stored in 2 mL microtubes at -20°C until NAGase activity assays.

2.2. Compound selection

The 19 compounds examined for their ability to directly alter NAGase activity are listed in Table 1. These compounds were selected according to three main criteria: i) their ability to interfere with NAGase has already been proved in the literature (e.g. pentoxifylline, endosulfan), ii) they can alter moulting process or degrade associated structure such as epidermis (e.g. cadmium, potassium dichromate), or iii) they were model pollutant, at concentrations of concern in aquatic systems (e.g. fipronil, glyphosate). Selected compounds were purchased from Merck/ Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) with the highest purity grade commercially available.

2.3. NAGase activity assays

Exposure setup. For each compound tested, a stock solution has been prepared and used to produce 10 working solutions, using the following dilution cascade: 1:1; 1:2; 1:5; 1:10; 1:20; 1:50; 1:100; 1:500; 1:1 000; 1:10 000. Dilutions were performed using different solvents depending on the compound solubility. Exposure has been realised, by adding 150 µL of enzymatic extract to 50 µL of working solution. The mix was kept at ambient temperature during 1 h with homogenisation made every 15 min to improve the contact between compound tested and enzyme. The exposure period of 1 h has been chosen regarding previous experiments which showed the stability of *P. serratus* NAGase during 2 h at ambient temperature (unpublished data). In parallel to this exposure, blanks without enzymatic extract were prepared, consisting of 50 µL of each working solution and 150 µL of citrate phosphate buffer. These blanks were useful to prevent measurement artifacts linked to the tested compounds. After the exposure period, NAGase activity was determined using the method described by Rollin et al. (2021). Briefly, for each concentration, 40 µL of exposure mix, as well as corresponding blank mix, were put in a well of 96-well microplate. Each exposure and blank was analysed in duplicate and an additional control consisting of a compound-free mixture was also run in duplicate. A mix of 160 µL of specific NAGase substrate, 4-nitrophenyl-N-Acétyle-β-D-Glucosaminide (NAG: final concentration of 500 µmol.L⁻¹) and citrate phosphate buffer, pre-incubated at 37 °C, was added in each well. Then microplates were incubated at 37°C. The reaction was stopped by adding 20 µL of NaOH 1 mol.L⁻¹ at 5 min and 15 min respectively, corresponding to the linear phase of the colorimetric reaction. NAGase activity was quantified by the liberation of nitrophenol, producing a well colouration measurable by absorbance at 410 nm, using a spectrometer TECAN® Infinite 2000. Finally, NAGase activity was calculated according to the following equation:

$$\text{NAGase activity } (\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}) = \frac{\Delta A}{\epsilon.l} * V$$

where $\Delta A = \frac{\text{mean absorbance at time 2} - \text{mean absorbance at time 1}}{\text{time 2} - \text{time 1 (min)}}$, ϵ is the molar extinction coefficient of nitrophenol (18 300 mol.L⁻¹.cm⁻¹), l represents the path length of the light beam through the sample well (0.486 cm) and V is the reactional volume (220 µL per well). Finally, NAGase activities were expressed by their activity percentage compared to controls. In parallel, exposure mix was used to measure the protein content using the Bradford method (Bradford, 1976).

Experiment 1: Solvent exposure. Owing to their weak solubility in water, some compounds needed to be solubilised in organic solvents. Then, the question of alteration of NAGase activity by the possible solvents used has been asked. To make sure that solvents did not interfere in the reaction, the disturbance ability of four solvents (i.e. Dimethylsulfoxide: DMSO, acetone, ethanol and methanol) has been assessed on NAGase activity. To do that, stock solution of each solvent, with an initial concentration of was prepared. This initial concentration has been used to expose NAGase activity at final concentrations ranging from 0.025 to 250 mmol.L⁻¹. Working solutions of organic solvents have been made directly on citrate phosphate buffer. NAGase exposure and measurement were performed using the method described in “exposure setup” section.

Experiment 2: Compound screening. Stock solutions of selected compounds with high water solubility (see Table 1) were prepared in citrate phosphate buffer. Then, working solutions of desired concentrations, as well as NAGase exposure and NAGase activity measurements, were made according to the method described in “exposure step” section. For compounds having a weak water solubility, stock solutions were prepared by dissolving compound in pure ethanol, then diluting the mix by half with citrate phosphate buffer. Working solutions at the desired concentrations, NAGase exposure and NAGase activity measurements were performed as described in the “exposure step” section.

Table 3 List of the 19 compounds selected, their properties and the range of concentrations used during the *in vitro* assay

Molecules	Solubility in water	Range of final concentrations tested	Stock solution	Molecule type	Moult effect	Reference
Cadmium chloride	high	[0,025-250]	1000 mM	Heavy metal	Moult delays inhibition of NAGase activity	Weis, 1967 Moreno et al. 2003 Mesquita et al. 2015
Chlortoluron	weak	[0,000625-6,25]	50 mM	Herbicide	N.D.	N.D.
Diclofenac	high	[0,00125-12,5]	100 mM	NAID	N.D.	N.D.
Dithiocarbamate	high	[0,0125-125]	1000 mM	Herbicide, pesticide	Epidermis alterations	Rao & Doughtie, 1984
Fenoxycarb	weak	[0,000125-1,25]	10 mM	Juvenoid hormone agonist	Ecdysteroid disturbance moult delays	Dorn et al. 1981 Tuberty & McKenney, 2005
Glyphosate	high	[0,00125-12,5]	50 mM	Herbicide	N.D.	N.D.
Ibuprofen	weak	[0,000625-6,25]	50 mM	NAID	N.D.	N.D.
Pentoxifylline	high	[0,0025-25]	100 mM	Medicine	Inhibition of NAGase activity	Rao, 2005 Husen et al. 2015
RH5849	weak	[0,0005-5]	20 mM	Pesticide, EcR agonist	Moult delays	Nagakawa, 2005 Reynolds et al. 2009 Sumyia et al. 2014
Zinc chloride	high	[0,0125-125]	500 mM	Heavy metal	Moult delays, inhibition of NAGase activity	Weis, 1980; Xie et al. 2009
Bisphenol A	high	[0,0125-125]	500 mM	Flame retardant	Moult delays	Lemos et al. 2009
Irgarol	weak	[0,001-10]	40 mM	Antifouling, biocide	EcR disturbance	Park et al. 2016
Terbutryn	weak	[0,00125-12,5]	50 mM	Pesticide	N.D.	N.D.
Imidacloprid	weak	[0,000125-1,25]	10 mM	Neonictinoid insecticide	N.D.	N.D.
Fipronil	weak	[0,0003125-3,125]	25 mM	GABA insecticide	N.D.	N.D.
Tributyltin	weak	[0,00025-2,5]	10 mM	Antifouling	Moult delays	Weis, 1992
Pyriproxyfen	weak	[0,00025-2,5]	10 mM	Pesticide, juvenoid hormone agonist	Ecdysteroid disturbance moult delays	Kawada, 1989 Tuberty & McKenney, 2005
Pyrene	weak	[0,000125-1,25]	10 mM	HAP	Moult number	Oberdörster et al. 2000
Carbamazepine	weak	[0,000625-6,25]	50 mM	Medicine	N.D.	N.D.

2.4. Statistical analysis

For each of the four tested solvents (Experiment 1) and the 19 tested compounds (Experiment 2), we considered three endpoints: raw NAGase activity, normalised NGA activity and protein content. In a first step, we assessed whether the endpoints were significantly responsive to the solvent/compound concentration, by using quadratic trend tests. Tukey et al. (1985) proposed a trend test to detect monotonic trends by testing the significance of a regression line linking the response to the concentration in rank-scale. To also allow the detection of biphasic trends (U- or bell-shaped), we tested the global significance of a first order polynomial curve (regression line) and of a second order polynomial curve (quadratic curve) (Larras et al. 2018). A Benjamini-Hochberg correction on the p-values was applied in order to control the false discovery rate (fixed at 0.05). When a significant trend was highlighted, a concentration-response curves was built using the DRomics tool (Larras et al. 2018), and more specifically the workflow dedicated to apical endpoints. This second step identified, among a set of monotonic and biphasic models, the best concentration-response model (and its parameter values) to fit the observed data. Last, the third step consisted of deriving, from the fitted concentration-response curve, the concentration that corresponds to an inhibition (or an enhancement) of 10% compared to the response in the control. Also confidence intervals were calculated around the 10% Inhibition Concentration (IC 10%), or 10% Enhancement Concentration (EnC10%) following the bootstrap procedure implemented in DRomics (Larras et al. 2018, Larras et al. 2020).

3. Results

3.1. Effects of organic solvents on NAGase activity

Effects of organic solvents on raw and normalised NAGase activities, as well as on protein contents, are displayed in Table 2 and Figure 1. Among organic solvent used here, ethanol is the only one which displayed no trends to have any effects on NAGase activities (i.e. both raw and normalised) nor on protein contents (trend test: *adjust.p-value* > 0.05). Conversely, acetone inhibited raw NAGase activity and decreased protein contents (trend tests: *adjust.p-values* = 3.00×10^{-4} and 1.60×10^{-3} respectively). The respective IC 10% calculated were reached at 8.34 mmol.L^{-1} for raw NAGase activity and 9.28 mmol.L^{-1} for protein contents respectively. DMSO looked like having a specific inhibition on enzyme activity measured, decreasing significantly both raw and normalised NAGase activities (raw NAGase activity: trend test: *adjust.p-value* = 2.00×10^{-4} ; IC 10%: 4.42 mmol.L^{-1} ; normalised NAGase activity: trend test:

adjust.p-value = 7.70×10^{-3} ; IC 10%: 4.92 mmol.L⁻¹). Finally, methanol stimulated raw NAGase activity at high concentrations (trend test: *p.adjust-value* = 3.51×10^{-5}) with a EnC 10% obtained at 13.15 mmol.L⁻¹. Since protein contents were not affected by methanol exposure, normalised NAGase activity followed the same pattern as the raw activity ones (trend test: *adjust.p-value* = 9.38×10^{-3}) with a EnC 10% reached at 5.11 mmol.L⁻¹. In absence of effect on both NAGase activity and protein contents, ethanol has been kept as suitable solvent to dilute organic compounds which have a weak water solubility.

Table 4 Summary of the solvent effects on NAGase activity of *Palaemon serratus* exposed *in vitro*. For each parameter, the *p*-value of the trend test attributed to the fitted model is reported, as well as the calculated 10%, 20% and 50% Inhibition Concentration (or ENhancement Concentration when number are coloured in red).

Solvent	Parameter	Trend test adjpvalue	model	BMD 10%	BMD 20%	BMD 50%
Acetone	Raw NAGase activity	0,0003	linear	7,79 < 8,34 < 9,22	15,48 < 16,68 < 18,62	NA
	Protein contents	0,0016	linear	6,85 < 9,28 < 12,64	13,7 < 18,55 < Inf	NA
	Normalised NAGase activity	NS	NA	NA	NA	NA
DMSO	Raw NAGase activity	0,0002	linear	4,24 < 4,42 < 4,6	8,48 < 8,84 < 9,17	21,17 < 22,1 < 22,91
	Protein contents	NS	NA	NA	NA	NA
	Normalised NAGase activity	0,0077	linear	4,2 < 4,92 < 6,16	8,41 < 9,83 < 12,55	20,89 < 24,58 < Inf
Ethanol	Raw NAGase activity	NS	NA	NA	NA	NA
	Protein contents	NS	NA	NA	NA	NA
	Normalised NAGase activity	NS	NA	NA	NA	NA
Methanol	Raw NAGase activity	0,0000	linear	11,18 < 13,15 < 15,49	NA	NA
	Protein contents	NS	NA	NA	NA	NA
	Normalised NAGase activity	0,0094	linear	4,12 < 5,11 < 6,83	8,15 < 10,23 < 13,72	NA

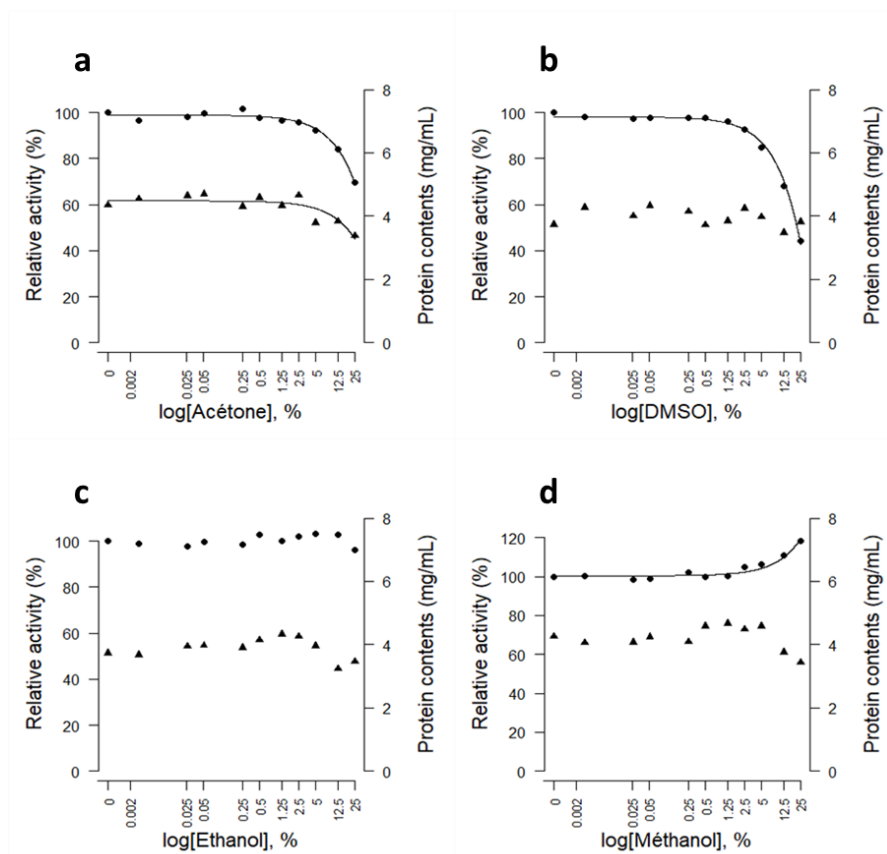


Figure 1 Effects of four organic solvents, acetone (a), DMSO (b), ethanol (c) and methanol on NAGase activity of *Palaemon serratus* exposed *in vitro*. For each solvent, results on raw NAGase activity (filled circles) and protein contents of enzyme extract (filled triangles) were displayed along a wide range of solvent concentration. Fitted curve on a distribution represents a significative response to the quadratic trend tests.

3.2. *In vitro* effects of selected compounds on NAGase activity

Results and models showing compound effects on NAGase activity are displayed in Table 3. Based on trend tests, 10 out of the 19 compounds tested showed no impacts on NAGase activity nor on protein contents: bisphenol A, carbamazepine, chlortoluron, fipronil, imidacloprid, irgarol, pyriproxyfen, pyrene, terbutryn and tributyltin (trend test: *adjust.p-value* > 0.05).

Adaptation de la mesure de l'activité N-Acétyle-β-D-Glucosaminidase chez Palaemon serratus : variabilité et sensibilité de la réponse

Table 5 Summary of the compound effects on the NAGase activity of *Palaemon serratus* exposed *in vitro*. For each parameter, the *p-value* of the trend test attributed to the fitted model is reported, as well as the calculated 10%, 20% and 50% Inhibition Concentration (or Enhancement Concentration when number are coloured in red).

Compound	Parameter	Trend test adjpvalue	model	IC 10%	IC 20%	IC 50%
Cadmium	Raw NAGase activity	0,0000	linear	27,21 < 30,26 < 34,88	54,15 < 60,53 < 70,12	135,87 < 151,32 < 174,70
	Protein contents	0,0001	linear	48,07 < 59,52 < 78,71	96,97 < 119,04 < 157,07	NA
	Normalised NAGase activity	0,0001	linear	34,43 < 39,94 < 49,24	68,56 < 79,88 < 100,38	172,35 < 199,71 < Inf
Diclofenac	Raw NAGase activity	NS	NA	NA	NA	NA
	Protein contents	0,0405	linear	1,97 < 2,74 < 4,19	3,98 < 5,49 < 8,43	NA
	Normalised NAGase activity	0,0466	linear	2,41 < 3,08 < 4,67	4,83 < 6,15 < 9,56	NA
Dichromate	Raw NAGase activity	0,0001	Gauss-probit	4,04 < 4,30 < 5,00	5,85 < 6,17 < 6,67	10,24 < 10,72 < 11,26
	Protein contents	NS	NA	NA	NA	NA
	Normalised NAGase activity	0,0001	Gauss-probit	1,52 < 7,04 < 7,91	7,27 < 8,36 < 9,45	10,77 < 11,93 < 13,68
Dithiocarbamate	Raw NAGase activity	0,0011	Gauss-probit	4,57 < 5,14 < 6,70	9,91 < 11,31 < 13,71	NA
	Protein contents	NS	NA	NA	NA	NA
	Normalised NAGase activity	NS	NA	NA	NA	NA
Fenoxycarb	Raw NAGase activity	0,0080	linear	NA	NA	NA
	Protein contents	NS	NA	NA	NA	NA
	Normalised NAGase activity	NS	NA	NA	NA	NA
Glyphosate	Raw NAGase activity	0,0004	linear	2,40 < 2,65 < 2,97	4,79 < 5,30 < 5,92	NA
	Protein contents	0,0006	linear	2,02 < 2,36 < 3,24	4,05 < 4,72 < 6,48	10,15 < 11,81 < Inf
	Normalised NAGase activity	NS	NA	NA	NA	NA
Ibuprofen	Raw NAGase activity	NS	NA	NA	NA	NA
	Protein contents	0,0124	linear	1,13 < 1,32 < 1,83	2,25 < 2,63 < 3,64	NA
	Normalised NAGase activity	0,0082	linear	0,58 < 0,66 < 0,80	1,14 < 1,32 < 1,60	2,83 < 3,30 < 3,99
Pentoxifylline	Raw NAGase activity	0,0000	Gauss-probit	0 < 0,69 < 1,01	0 < 1,44 < 1,85	3,72 < 4,44 < 5,19
	Protein contents	NS	NA	NA	NA	NA
	Normalised NAGase activity	0,0000	Hill	0,45 < 0,61 < Inf	1,05 < 1,25 < Inf	6,12 < 4,82 < Inf
RH5849	Raw NAGase activity	0,0258	linear	NA	NA	NA
	Protein contents	NS	NA	NA	NA	NA
	Normalised NAGase activity	NS	NA	NA	NA	NA
Zinc	Raw NAGase activity	0,0002	Hill	10,88	17,78	NA
	Protein contents	0,0010	linear	27,69 < 40,03 < 60,39	55,75 < 80,07 < 123,79	NA
	Normalised NAGase activity	NS	NA	NA	NA	NA

Two of the tested compounds showed a specific action on the enzyme activity, without altering the protein contents (Figure 2 a,b). Of these two compounds, fenoxycarb had a significant effect on raw NAGase activity, decreasing it at high concentrations (trendtest: $adjust.p\text{-value}= 8.03 \times 10^{-3}$). However, observed effect was too weak to calculate any IC 10%. Conversely, pentoxifylline displayed a great inhibition on raw NAGase activity (trend test: $adjust.p\text{-value}= 3.44 \times 10^{-8}$), being able to inhibit 10% of NAGase activity at only 0.69 mmol.L⁻¹ of pentoxifylline. As the proteins were not degraded, pentoxifylline altered normalised activity too (trend test: $adjust.p\text{-value}= 6.84 \times 10^{-7}$).

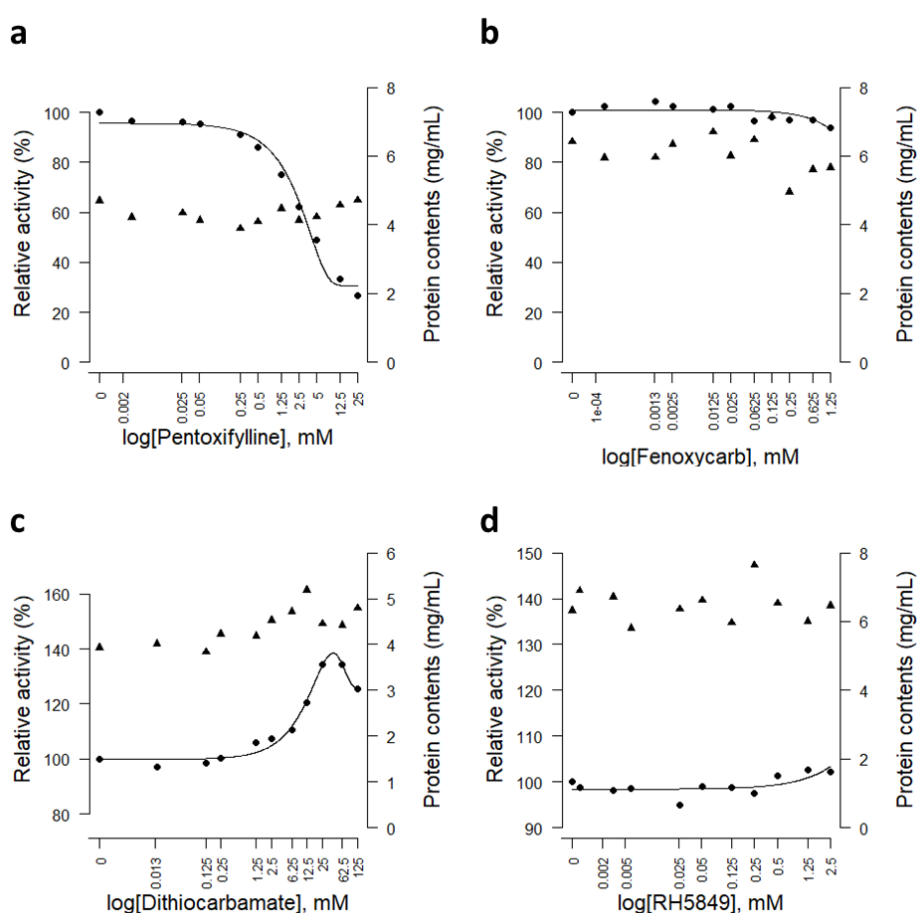


Figure 2 Specific effects of four compounds, pentoxifylline (a), fenoxycarb (b), dithiocarbamate (c) and RH5849 (d) on NAGase activity of *Palaemon serratus* exposed *in vitro*. As they displayed a specific effect, compounds showed a significative trend test on raw NAGase activity (filled circles), symbolised with a fitted curve, while no effect was observed on protein contents (filled triangles).

In contrast to specific inhibition of enzyme activity, two compounds specifically stimulated the activity of NAGase, without degrading the protein contents (Figure 2 c,d). Hence, RH5849 significantly increased raw NAGase activity at high concentrations (trend test: $adjust.p\text{-value}= 2.58 \times 10^{-2}$). However, this stimulation was weak since EnC 10% cannot be

calculated. Conversely, dithiocarbamate stimulated raw NAGase activity (trend test: *adjust.p-value*: 1.12×10^{-3}) with a calculated EnC 10% of 5.14 mmol.L^{-1} . However, at high concentrations, dithiocarbamate effects (i.e. $> 25 \text{ mmol.L}^{-1}$) appeared to be stabilised. No effect was observed on protein contents nor on normalised NAGase activity (trend test: *adjust.p-value* > 0.05).

Contrary to compounds which had specific action on enzyme activity, three compounds showed non-specific actions, altering both NAGase activity and protein contents (Figure 3). Here was found the two heavy metals tested in this experiment, with zinc inhibiting raw NAGase activity (trend test: *adjust.p-value* = 1.98×10^{-4}) as well as decreasing protein contents (trend test: *adjust.p-value* = 1.01×10^{-3}). The respective IC 10% were calculated at $10.88 \text{ mmol.L}^{-1}$ and $40.03 \text{ mmol.L}^{-1}$ for NAGase activity and protein content inhibitions, respectively, showing that alteration of enzyme activity occurred first. However, at high concentrations (i.e. $> 62.5 \text{ mmol.L}^{-1}$), effects observed on NAGase activity stopped to increase as observed at lower concentrations. Cadmium displayed an inhibition of raw NAGase activity, normalised activity one and a degradation of protein contents (trend tests: *adjust.p-values* = 7.15×10^{-6} ; 6.57×10^{-5} and 6.57×10^{-5} respectively). The calculated IC 10% for raw NAGase activity, normalised one and protein contents were 30.26; 39.94 and $59.52 \text{ mmol.L}^{-1}$ respectively. Finally, glyphosate caused an inhibition of NAGase activity and a degradation of protein contents (trend tests: *adjust.p-values*: 3.54×10^{-4} and 5.51×10^{-4} respectively), while no effect was observed on normalised NAGase activity. The calculated IC 10% for raw NAGase activity and protein contents were 2.65 and 2.36 mmol.L^{-1} respectively.

The two last compounds have interesting since they preferentially altered the protein contents while raw NAGase activity remained unchanged, leading to a modification of normalised NAGase activity (Figure 4). Hence, ibuprofene decreased significantly the protein contents (trend test: *adjust.p-value* = 1.24×10^{-2}), leading to an increase in normalised NAGase activity (trend test: *adjust.p-value* = 8.23×10^{-3}). The calculated IC 10% for protein contents and EnC 10% for normalised NAGase activity were found at 1.32 and 0.66 mmol.L^{-1} respectively, supporting the hypothesis of a relationship between these two observations. On the opposite, diclofenac surprisingly increased the protein contents (trend test: *adjust.p-value* = 4.05×10^{-2}), leading to an increase of normalised NAGase activity (trend test: *adjust.p-value* = 4.66×10^{-2}). The calculated EnC 10% for protein contents and IC 10% for normalised NAGase activity were

found at 2.74 and 3.08 mmol.L⁻¹ respectively, supporting, as with ibuprofene, a potential link between these two observations.

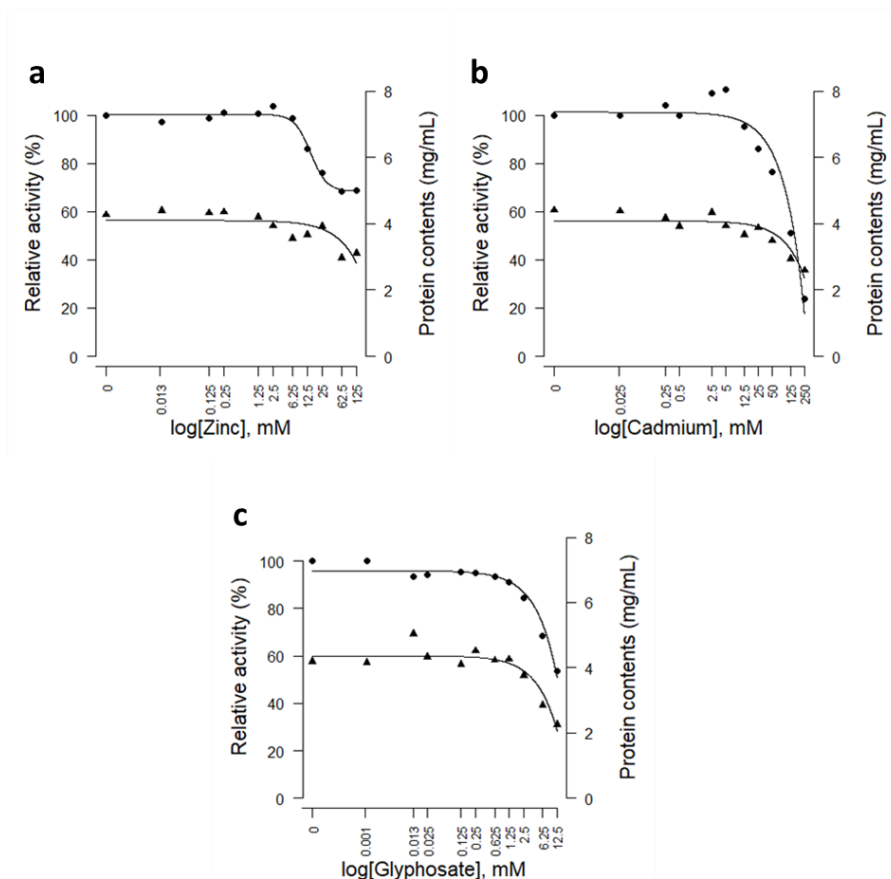


Figure 3 Non-specific effects of three compounds, zinc (a), cadmium (b) and glyphosate(c) on NAGase activity of *Palaemon serratus* exposed *in vitro*. As they displayed a non-specific effect, the three compounds showed both a significant trend tests on raw NAGase activity (filled circles) and on protein contents (filled triangles). The significance of the trend tests is symbolised for each parameter by a curve fitting to the data distribution (trend test: p-adjust value < 0.05).

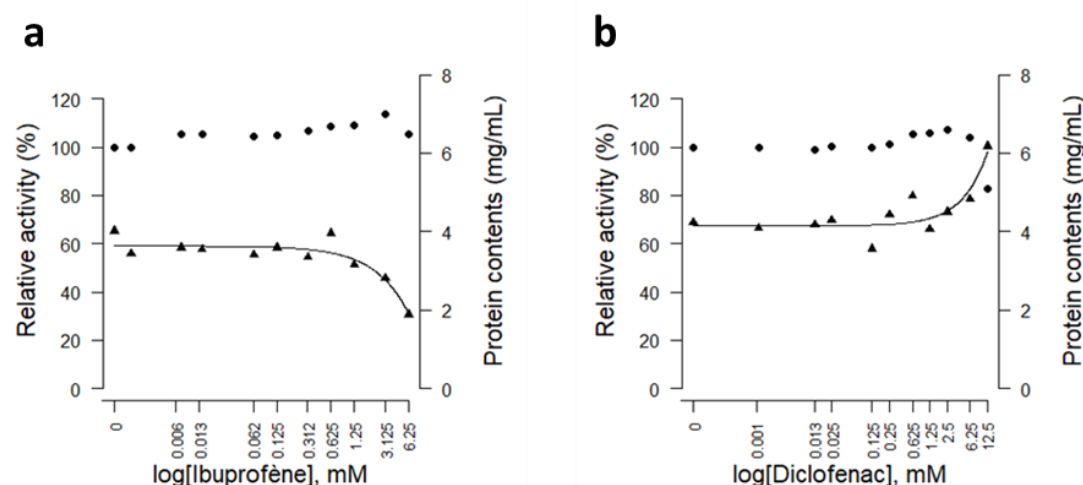


Figure 4 Atypical effects of two compounds, ibuprofene (a) and diclofenac (b) on NAGase activity of *Palaemon serratus* exposed *in vitro*. These two compounds displaying no effect on raw NAGase activity (filled circles), while significantly altering the protein contents in enzymatic extract (filled triangles). Significance of this latter is represented by a fitted curve on the data distribution (trend test: p-adjust value < 0.05).

4. Discussion

In the list of selected compounds used for the present study, 13 out of 19 compounds presented a weak solubility in water. The first objective here was to find a suitable organic solvent which was able to dissolve the desired organic compounds, as well as not interfering on NAGase activity. For this purpose, the ability of altering NAGase activity and protein contents extracted from *Palaemon serratus* was assessed on four classic organic solvents. Owing to its chemical properties, DMSO is one of the most used solvent to solubilise organic compounds. In the literature, DMSO has been proved to inhibit *in vitro* the NAGase activity of the mealworm *Tenebrio molitor*, with a calculated IC 50% of 5.0 % DMSO (i.e. 0.70 mmol.L⁻¹: Pan et al. 2006). In the present study, DMSO had a specific effect of enzyme activity, with IC 50% obtained at 22.1 % DMSO, which is much higher than for *Tenebrio molitor*, probably since unlike the present study, the authors purified the NAGase before using it. Contrary to DMSO, methanol, acetone and ethanol are known to be less efficiency to dissolve all organic compounds. Methanol here induced a significant increase in both raw and normalised NAGase activities of *P. serratus*, with a calculated EnC 10% of 13.1 % methanol. This observation was corroborated by Pan et al. (2006) who observed an increase of 23.0 % of NAGase activity of *Tenebrio molitor* at 5.0 % of methanol. This increase was followed by a great inhibition from 5 to 40 % of methanol, which was not observed in the present study, where the maximum dose tested was 25.0 %. Acetone was for the first time assessed in an *in vitro* NAGase activity exposure. This solvent led to significant decreases of NAGase activity and protein contents when concentrations were higher than 8 %. Contrary to acetone, ethanol did not have any effect on NAGase activity nor on protein contents in the present study. However, *in vitro* inhibition of NAGase activity has been observed on *Tenebrio molitor*, with an IC 50% calculated at 25 % of ethanol, defined as the highest concentration tested in the present study. Finally, to ensure the absence of effect on NAGase activity and/or protein contents, the use of ethanol at 12,5 % was retained for organic compounds with a weak water solubility.

Using a NAGase activity protocol which offered the possibility to test compounds having either a high or weak water solubility, 19 compounds known to alter moulting process or to be abundant in aquatic systems were assessed for their ability to directly alter the NAGase activity of *P. serratus*. Among these, only 9 showed an effect on raw NAGase activity or protein contents. The 10 others comprised different molecules including tributyltin, a well-known antifouling that caused moult delays on *Uca pugilator* when being exposed at 1.71x10⁻⁶ mmol.L⁻¹ (Weis et al. 1992) or pyriproxyfen, which is known to be an agonist of juvenoid

hormone, that can disrupt moult when deregulated (Kawada, 1989; Tuberty & McKenney, 2005). This lack of alterations of NAGase activity suggests that these compounds disturb preferentially other mechanisms involved in the moulting process, as the hormonal regulation of moult, or even by drifting the energetic balance of the exposed organism, which may result in moult delays.

Among the nine compounds showing effects in the present study, four of them displayed a specific effect on enzyme activity. The most well-known of these four compounds is pentoxifylline. This methylxanthine based drug is well-documented to be an inhibitor of 18 families of fungal chitinases, being in specific interaction with the active site of the enzyme (Rao et al. 2005). Notwithstanding this, NAGase activity does not appear to be altered by *in vitro* exposure to 1 mol.L⁻¹ on an enzyme extract *Reticulitermes flavipes* (Husen et al. 2015). Although the procedure of collecting enzyme extract seems to be similar, an exposure at 4.44 mmol.L⁻¹ caused a 50% inhibition of NAGase activity in the present study while this activity remained intact on beetles. Comparative study of NAGase of several arthropods, including ones inhabiting in different ecosystems could help to understand this difference of sensibility. As with pentoxifylline, fenoxycarb *in vitro* exposure led to a decrease in NAGase activity, with less intensity. This compound is known to be, as pyriproxyfen, a juvenoid hormone agonist which disturbs the ecdysteroid levels measured on the larval shrimp *Palaemonetes pugio* (Tuberty & McKenney, 2005). However, based on our knowledge, this is the first time that this compound was found to have a direct NAGase activity inhibition. Contrary to fenoxycarb, RH5849 stimulated the raw NAGase activity of *P. serratus*. This result seems logical since this compound is an ecdysone receptor agonist, well-known to produce many effects as stimulating some enzymes (i.e. 20-hydroxylase, acetylcholine esterase: Rao et al. 2005), as well as stimulating the N-acetylglucosamine uptake and moulting hormone activities of larvae of the isoptera *Plodia interpunctella* (Silhaceck et al. 1990). Dithiocarbamate, which has been known to cause epidermal lesions on *Palaemonetes pugio* (Rao & Doughtie, 1984), also appears for the first time to produce a specific stimulation of the raw NAGase activity of *P. serratus*.

The two heavy metals tested both showed a nonspecific alteration, degrading NAGase activity as well as protein contents. In the present study, cadmium inhibit the three parameters observed, with a IC 50% calculated on raw NAGase activity at 151.32 mmol.L⁻¹. Same inhibitions on NAGase activity by cadmium were observed on *Tenebrio molitor* (Pan et al. 2007), *Litopenaeus vannamei* (Xie et al. 2004) *Scylla serrata* (Yang et al. 2006), with an

inhibition of 40 % at 20; 10 and 10 mmol.L⁻¹ respectively. These authors used purified NAGase, which may explain the difference. Zinc inhibited raw NAGase activity with a maximal BMD, calculated as a BMD 20%, reached at 17.78 mmol.L⁻¹. The same inhibitions on NAGase activity by zinc were observed on *Tenebrio molitor* (IC 20%= 10 mmol.L⁻¹: Pan et al. 2007) and on *Litopenaeus vannamei* (inhibition of 38% at 10 mmol.L⁻¹: Xie et al. 2004). Both heavy metals significantly degraded protein contents, but with a much higher metal concentration than that inducing the alteration of NAGase activity. Thus, these metals may alter specifically enzyme activity, independently to protein degradation. This hypothesis was supported for cadmium by Pan et al (2007) and for zinc by Zhang et al (2010), who observed specific inhibition of the enzyme-substrate complex and irreversible inhibition of NAGase activity, respectively. These observations must be confirmed on *P. serratus* by analysing the kinetics of NAGase activity exposed to these metals. As zinc, glyphosate inhibited raw NAGase activity and protein contents. However, these alterations occurred with the same intensity at the same concentration. This observation led to the hypothesis that NAGase and protein alterations could be concomitant, as if NAGase was degraded by this compound.

Unlike the other compounds tested, ibuprofen and diclofenac only altered the protein contents without disturbing the raw NAGase activity. Even if this observation was sufficient to declare that NAGase was not impacted by such molecules, it raised the question of the normalisation of NAGase activity by the proteins. Indeed, models fitted for both compounds revealed a significant alteration at the level of normalised activity, indicating an apparent effect. This result cannot be concluded here since we used an enzyme extract which was not purified. In other terms, ibuprofen and diclofenac may alter enzymes other than NAGase, thus producing a confounding factor when analysing the normalised NAGase activity. To confirm this theory, same exposures involving a purified NAGase extract has to be proceeded. If *in vitro* experiments on arthropod NAGase activity often used purified enzyme extract, permitting to define if the tested compound may degrade the chitinolytic enzyme, this is less the case on *in vivo* exposures. Paradoxically, authors who have studied *in vivo* NAGase activity have often normalised it, losing the information of whether the compound altered preferentially the NAGase activity and/or the proteins. For *in vitro* methodology, if purified extract appeared to be the best way to observe NAGase activity alterations, the use of enzyme extract collected from the organism allows to screen quickly and efficiently a wide range of target compounds. Furthermore, this methodology is informative, allowing in the present study the detection of specific NAGase activity alteration by at least 4 compounds, as well as non-specific alterations

by at least 3 other compounds. The absence of effects by the majority of tested compounds, even those with a recognized effect on moult when tested *in vivo*, permit to conclude that xenobiotics rather alter other targets involved in the moulting regulation than directly NAGase activity, whose *in vivo* alteration appears to be the integration of the disturbance of upstream molecular mechanism.

5. Conclusion

A methodology of assessing *in vitro* NAGase alterations by 19 different compounds has been deployed, using enzyme extract of the prawn *Palaemon serratus*. The test of organic solvent to solubilise hydrophobic compounds defined ethanol as the most suitable one, displaying no effect on NAGase activity nor on protein contents.

With this methodology, specific inhibitions of NAGase activity were induced by pentoxifylline, DMSO and fenoxycarb, while specific stimulations were triggered by dithiocarbamate, methanol and RH5849. Otherwise, cadmium, zinc and glyphosate appeared to make a non-specific alteration, degrading both NAGase activity and protein contents. Despite of their absence of effects on NAGase activity, ibuprofen and diclofenac preferentially altered the protein contents, questioning about the fact of normalising the NAGase activity by the amount proteins present in the tested extract. Observation of these effects makes promising the methodology used in the present study, being suitable to assess the ability of many other compounds to directly alter NAGase activity. During this experiment, a majority of tested compounds did not show any effects on NAGase activity, while most of them being selected for displaying moult disturbances in previous studies. This fact reinforces the need to compare the NAGase activity *in vivo* and *in vitro* exposures to better understand the mode of action of xenobiotics on this chitinolytic enzyme and globally on the moulting process.

References

- Anderson, G.S., 1985. Species profiles: Life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Gulf of Mexico): Grass shrimp. The Service.
- Buchholz, F., Vetter, R.A.H., 1993. Enzyme kinetics in cold water: characteristics of N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity in the Antarctic krill, *Euphausia superba*, compared with other crustacean species. Journal of Comparative Physiology B 163, 28–37.

- Campillo, A., 1975. Contribution à l'étude de l'élevage de la crevette rose *Palaemon serratus* (Pennant) en captivité. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes 39, 381–393.
- Chen, H., Gu, X., Zeng, Q., Mao, Z., Liang, X., Martyniuk, C.J., 2019. Carbamazepine disrupts molting hormone signaling and inhibits molting and growth of *Eriocheir sinensis* at environmentally relevant concentrations. Aquatic Toxicology 208, 138–145.
- de Melo, M.S., Nazari, E.M., Müller, Y.M.R., Gismondi, E., 2020. Roundup® disrupts chitinolytic enzyme activity and ecdysteroid concentration in *Macrobrachium potiana*. Environmental Science and Pollution Research 27, 43396–43402.
- Drach, P., 1939. Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes. Ann. Inst. Oceanogr. Monaco 19, 103–391.
- Drach, P., Tchernigovtzeff, C., 1967. Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. Vie et milieu 595–610.
- Erraud, A., Bonnard, M., Chaumot, A., Geffard, O., Duflot, A., Forget-Leray, J., Le Foll, F., Geffard, A., Xuereb, B., 2018. Use of sperm DNA integrity as a marker for exposure to contamination in *Palaemon serratus* (Pennant 1777): Intrinsic variability, baseline level and in situ deployment. Water research 132, 124–134.
- Erraud, A., Bonnard, M., Geffard, O., Coulaud, R., Poret, A., Duflot, A., Forget-Leray, J., Geffard, A., Xuereb, B., 2019. Signification of DNA integrity in sperm of *Palaemon serratus* (Pennant 1777): Kinetic responses and reproduction impairment. Marine environmental research 144, 130–140.
- Espie, P.J., Roff, J.C., 1995. Characterization of chitobiase from *Daphnia magna* and its relation to chitin flux. Physiological Zoology 68, 727–748.
- Freeman, J.A., Bartell, C.K., 1975. Characterization of the molt cycle and its hormonal control in *Palaemonetes pugio* (Decapoda, Caridea). General and comparative endocrinology 25, 517–528.
- Gismondi, E., Thomé, J.-P., 2014. Effects of two PBDE congeners on the moulting enzymes of the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. Environmental pollution 191, 119–125.
- Gooday, G.W., 1990. The ecology of chitin degradation. Advances in microbial ecology 387–430.

- Husen, T.J., Kamble, S.T., Stone, J.M., 2015. Effect of pentoxifylline on chitinolytic enzyme activity in the Eastern subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Entomological Science* 50, 295–310.
- Jeuniaux, C., 1975. III. Chitine et complexes chitino-protéiques de la cuticule. *Traité de zoologie: Insectes: Téguments, système nerveux, organes sensoriels. Tome VIII, fascicule III* 31–44.
- Kawada, H., Kojima, I., Shinjo, G., 1989. Laboratory evaluation of a new insect growth regulator pyriproxyfen, as a cockroach control agent. *Medical Entomology and Zoology* 40, 195–201.
- Koga, D., Mai, M.S., Dziadik-Turner, C., Kramer, K.J., 1982. Kinetics and mechanism of exochitinase and β-N-acetylhexosaminidase from the tobacco hornworm, *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae). *Insect Biochemistry* 12, 493–499.
- Lafontaine, A., Gismondi, E., Boulangé-Lecomte, C., Geraudie, P., Dodet, N., Caupos, F., Lemoine, S., Lagadic, L., Thomé, J.-P., Forget-Leray, J., 2016. Effects of chlordecone on 20-hydroxyecdysone concentration and chitinase activity in a decapod crustacean, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquatic toxicology* 176, 53–63.
- Larras, F., Billoir, E., Baillard, V., Siberchicot, A., Scholz, S., Wubet, T., Tarkka, M., Schmitt-Jansen, M., Delignette-Muller, M.-L., 2018. DRomics: a Turnkey Tool to support the use of the dose–response framework for omics data in ecological risk assessment. *Environmental science & technology* 52, 14461–14468.
- Larras, F., Billoir, E., Scholz, S., Tarkka, M., Wubet, T., Delignette-Muller, M.-L., Schmitt-Jansen, M., 2020. A multi-omics concentration-response framework uncovers novel understanding of triclosan effects in the chlorophyte *Scenedesmus vacuolatus*. *Journal of hazardous materials* 397, 122727.
- Luo, J., Pei, S., Jing, W., Zou, E., Wang, L., 2015. Cadmium inhibits molting of the freshwater crab *Sinopotamon henanense* by reducing the hemolymph ecdysteroid content and the activities of chitinase and N-acetyl-β-glucosaminidase in the epidermis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 169, 1–6.
- Mesquita, S.R., Guilhermino, L., Guimarães, L., 2011. Biochemical and locomotor responses of *Carcinus maenas* exposed to the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. *Chemosphere* 85, 967–976.

- Mesquita, S.R., Ergen, Ş.F., Rodrigues, A.P., Oliva-Teles, M.T., Delerue-Matos, C., Guimarães, L., 2015. N-acetyl-β-d-glucosaminidase activity in feral *Carcinus maenas* exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology* 159, 225–232.
- Qi, S., Wang, Chen, Chen, X., Qin, Z., Li, X., Wang, Chengju, 2013. Toxicity assessments with *Daphnia magna* of Guadipyr, a new neonicotinoid insecticide and studies of its effect on acetylcholinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and chitobiase activities. *Ecotoxicology and environmental safety* 98, 339–344.
- Rao, K.R., Doughtie, D.G., 1984. Histopathological changes in grass shrimp exposed to chromium, pentachlorophenol and dithiocarbamates. *Marine environmental research* 14, 371–395.
- Rao, F.V., Andersen, O.A., Vora, K.A., DeMartino, J.A., Van Aalten, D.M., 2005. Methylxanthine drugs are chitinase inhibitors: investigation of inhibition and binding modes. *Chemistry & biology* 12, 973–980.
- Richards, S.M., Kelly, S.E., Hanson, M.L., 2008. Zooplankton chitobiase activity as an endpoint of pharmaceutical effect. *Archives of environmental contamination and toxicology* 54, 637–644.
- Rollin, M., Coulaud, R., Rocher, B., Duflot, A., Poret, A., Le Foll, F., Xuereb, B., 2021. N-acetyl-β-d-glucosaminidase activity in *Palaemon serratus*-Methodological optimisation and intrinsic variability. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 256, 110932.
- Silhacek, D.L., Oberlander, H., Porcheron, P., 1990. Action of RH 5849, a non-steroidal ecdysteroid mimic, on *Plodia interpunctella* (Hübner) *in vivo* and *in vitro*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 15, 201–212.
- Song, Y., Villeneuve, D.L., Toyota, K., Iguchi, T., Tollefsen, K.E., 2017. Ecdysone receptor agonism leading to lethal molting disruption in arthropods: review and adverse outcome pathway development. *Environmental science & technology* 51, 4142–4157.
- Spindler, K.-D., 1976. Initial characterization of chitinase and chitobiase from the integument of *Drosophila hydei*. *Insect Biochemistry* 6, 663–667.

- Spindler, K.-D., Buchholz, F., 1988. Partial characterization of chitin degrading enzymes from two euphausiids, *Euphausia superba* and *Meganyctiphanes norvegica*. Polar Biology 9, 115–122.
- Spindler-Barth, M., Van Wormhoudt, A., Spindler, K.-D., 1990. Chitinolytic enzymes in the integument and midgut-gland of the shrimp *Palaemon serratus* during the moulting cycle. Marine Biology 106, 49–52.
- Subramoniam, T., 2016. Sexual biology and reproduction in crustaceans. Academic Press.
- Tuberty, S.R., McKenney Jr, C.L., 2005. Ecdysteroid responses of estuarine crustaceans exposed through complete larval development to juvenile hormone agonist insecticides. Integrative and comparative biology 45, 106–117.
- Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F., 1985. Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. Biometrics 295–301.
- Weis, J.S., Cristini, A., Ranga Rao, K., 1992. Effects of pollutants on molting and regeneration in Crustacea. American Zoologist 32, 495–500.
- Williams, L., 2012. The effects of river sediment, endosulfan, and moderate hypoxia on blue crabs (*Callinectes sapidus*) from the tidal, freshwater James River.
- Xie, X.-L., Chen, Q.-X., Lin, J.-C., Wang, Y., 2004. Purification and some properties of β-N-acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*). Marine Biology 146, 143–148.
- Zhang, J.-P., Chen, Q.-X., Wang, Q., Xie, J.-J., 2006. Purification and some properties of β-N-Acetyl-D-glucosaminidase from viscera of green crab (*Scylla serrata*). Biochemistry (Moscow) 71, S55–S59.
- Zhang, J.-P., Hu, Y.-H., Wang, Q., Wang, W., Wang, Y., Yan, J.-H., Chen, Q.-X., 2010. Inhibitory kinetics of β-N-acetyl-D-glucosaminidase from green crab (*Scylla serrata*) by zinc ion. Journal of agricultural and food chemistry 58, 8763–8767.
- Zielkowski, R., Spindler, K.-D., 1978. Chitinase and chitobiase from the integument of *Locusta migratoria*: characterization and titer during the fifth larval instar. Insect Biochemistry 8, 67–71.

- Zou, E., Fingerman, M., 1999a. Chitobiase activity in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab *Uca pugilator* during the molting cycle. *Marine Biology* 133, 97–101.
- Zou, E., Fingerman, M., 1999b. Effects of exposure to diethyl phthalate, 4-(tert)-octylphenol, and 2, 4, 5-trichlorobiphenyl on activity of chitobiase in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 122, 115–120.
- Zou, E., Fingerman, M., 1999c. Effects of exposure to diethyl phthalate, 4-(tert)-octylphenol, and 2, 4, 5-trichlorobiphenyl on activity of chitobiase in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 122, 115–120.
- Zou, E., 2005. Impacts of xenobiotics on crustacean molting: the invisible endocrine disruption. *Integrative and Comparative Biology* 45, 33–38.
- Zou, E., 2009. Effects of Hypoxia and Sedimentary Naphthalene on the Activity of N-acetyl-β-Glucosaminidase in the Epidermis of the Brown Shrimp, *Penaeus aztecus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 82, 579–582.
- Zou, E., 2020. Invisible endocrine disruption and its mechanisms: A current review. *General and comparative endocrinology* 293, 113470.
- 杜娟, 安刚, 谢晓兰, 黄乾生, 王烨, 陈清西, 2008. 养殖常用抗菌药物对凡纳滨对虾外壳膜 N 乙酰 D 氨基葡萄糖苷酶活力的影响. *厦门大学学报: 自然科学版* 47, 883–886.
- 杨学敏, 谢进金, 张继平, 林建成, 陈清西, 2006. 金属离子对锯缘青蟹 NAGase 活力的影响. *台湾海峡* 25, 343–347.
- 林建城, 王悦, 谢晓兰, 龚敏, 陈清西, 2005. 金属离子对凡纳对虾 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响. *台湾海峡* 24, 78–82.
- 潘小芳, 汪荣峰, 黄金敏, 2007. 金属离子对黄粉虫 NAGase 活力的影响. *泉州师范学院学报* 25, 113–117.

- 潘小芳, 谢晓兰, 徐海金, 赖志青, 2006. 有机溶剂对黄粉虫 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响. 宁德师专学报: 自然科学版 18, 352–356.
- 谢晓兰, 王悦, 陈清西, 2006. 氨基酸对凡纳滨对虾 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响.
- 谢晓兰, 黄乾生, 魏晓倩, 杜娟, 王烨, 柯才焕, 陈清西, 2009. 养殖常用消毒药物对凡纳滨对虾 NAGase 活力的影响. 水生态学杂志 2, 108–111.
- 颜雅雯, 张继平, 王勤, 谢进金, 陈清西, 2007. 抗菌类药物对锯缘青蟹 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响. 台湾海峡 26, 231–235.

V. Caractérisation de la cuticule par analyse des propriétés physicochimiques et suivi dans un contexte dynamique

Ce chapitre illustre l'ensemble des travaux visant à mesurer les propriétés thermiques et chimiques relatifs à la structure de la cuticule, chez la crevette *Palaemon serratus*. La mesure de telles propriétés a pour but *i)* de caractériser la structure cuticulaire de la crevette bouquet, sa composition et l'organisation des matériaux le composant, et *ii)* d'apprécier les changements structuraux de la cuticule dans un contexte dynamique, tels qu'induits au cours du cycle de mue ou lors d'une dégradation par l'action d'acide. Cette partie est composée d'une publication :

Publication n°3 : Characterisation of the Palaemon serratus cuticle and its structure changes by physicochemical properties.

5.1. Mesure des propriétés physicochimiques de la cuticule

Publication n°3 :

Characterisation of the *Palaemon serratus* cuticle and its structure changes by physicochemical properties

Marc Rollin, Benoit Xuereb, Romain Coulaud, Vincent Loisel, Agnès Poret, Aurélie Duflot, Frank Le Foll, Céline Picard, Nicolas Hucher.

Résumé

La cuticule des crustacés est un matériau composite jouant le rôle de carapace pour les organismes, mais aussi associée à des fonctions physiologiques telles que la respiration, la locomotion ou la reproduction. Si l'organisation et la composition de la cuticule ont été quelques fois caractérisées chez les crustacés, très peu d'études ont étudié ce matériau dans un contexte dynamique, impliquant des changements structuraux. Dans ce contexte, les objectifs de la présente étude étaient d'utiliser les propriétés physicochimiques de la cuticule de la crevette *Palaemon serratus* afin de caractériser les changements structuraux de ce matériau, induits par i) le cycle de mue et ii) un traitement à l'acide formique. Au préalable, la cuticule de *P. serratus* a été caractérisée pour la première fois dans la littérature à l'aide des techniques d'analyses thermiques (i.e. DSC, ATG) mais aussi chimiques (i.e. IRTF, ICP). En utilisant ces techniques, la cuticule de crevette a été montrée comme étant composée principalement d'eau, de protéines, de chitine et d'éléments inorganiques. L'évaluation de l'influence du cycle de mue a révélé que les propriétés physicochimiques étaient principalement modulées durant la postmue, soulignant la présence de grands changements structuraux cuticulaires se déroulant à cette période. Au cours d'une troisième étape, la réalisation d'un traitement à l'acide formique a conduit à l'apparition d'altérations de la cuticule, se traduisant par des dégradations du réseaux protéine-chitine et par des diminutions de la teneur minérale, observables par l'analyse des propriétés physicochimiques. L'intérêt de ces dernières à être déployées dans un tel contexte a été discuté au regard de leur robustesse, leur pouvoir discriminant ainsi que leur sensibilité.

Mots-clés : dégradation à l'acide, crustacés, cycle de mue, *Palaemon*, propriétés physicochimiques

Article en préparation pour Acta Biomaterialia

Characterisation of the *Palaemon serratus* cuticle and its structure changes by physicochemical properties.

Marc Rollin¹, Benoit Xuereb^{1*}, Romain Coulaud¹, Vincent Loisel², Agnès Poret¹, Aurélie Duflot¹, Frank Le Foll¹, Céline Picard² and Nicolas Hucher^{2*}

¹Le Havre Normandie University (ULHN), FR CNRS 3730 SCALE, UMR-INERIS 02 Environmental Stresses and Biomonitoring of Aquatic Ecosystems (SEBIO), 25 rue Philippe Le Bon - 76600 Le Havre – France.

²UNIHAVRE, FR 3038 CNRS, URCOM, Normandie Univ., Le Havre 76600, France

***Corresponding authors:**

Emails:

benoit.xuereb@univ-lehavre.fr

nicolas.hucher@univ-lehavre.fr

Abstract

The crustacean cuticle is a composite material acting as a shell for the organism, but also linked with other physiological functions as respiration, locomotion, or reproduction. If organisation and composition of this structure have been investigated on several crustacean species, only a few of these has been made in a dynamical context involving structure changes. In this context, the present study aimed to apply physicochemical properties on the marine prawn *Palaemon serratus* to characterise the structure changes of the cuticle induced by *i*) the moult cycle and *ii*) formic acid treatment. Prior to this, the *Palaemon serratus* cuticle has been characterised for the first time with DSC and TGA techniques as well as FTIR and ICP methods assessing cuticle thermal and chemical properties, respectively. With these parameters measured, the prawn cuticle was found to be mainly composed of water, proteins, chitin and inorganic elements. The moult cycle influence assessment revealed that the physicochemical properties were mainly modulated during postmoult, highlighting the great changes of the cuticle structure occurring at this period. In a third step, formic acid treatment led to cuticle alterations, by degrading the chitin-protein networks and decreasing the amount of mineral fraction, which were detected by the measured parameters. These latter appeared to be promising markers to assess cuticle changes in a dynamical context. Interest of such property use has been discussed by analysing their robustness, sensibility and discrimination power.

Keywords: Acid degradation; crustaceans; cuticle; moult cycle; *Palaemon*; physicochemical properties.

1. Introduction

For all crustaceans, the cuticle is a specific material assembly acting as an exoskeleton which confine the organism body, protecting it from external pressures. This shell is also involved in other important functions as mechanical loads, desiccation protection, respiration, protection of eggs and brood chamber, feeding and locomotion behaviour as walking, swimming, and sand burrowing patterns [1]. Furthermore, moult, involving the cuticle, is implied in crustacean life traits as growth, adult reproduction, and metamorphosis of young life stages [2]. To ensure these traits, most of the crustaceans must regularly shed their cuticle before creating a new fitted one, performing regularly moult cycles along their life. Thus, the achievement of such a diversity of functions, as the dynamic through moult cycle, requires a particular cuticle composition that may be modified in organism and time.

In recent decades, composition and structure of crustacean cuticle have been well documented and characterised, from molecular to tissue characterisations [3], [4], [5], [6], [7], [8]. This knowledge was permitted by the study and definition of physical and chemical cuticle properties. In fact, most of the cuticle characterisation studies are based on cuticle thermal (Thermogravimetric analysis: TGA, Differential Scanning Calorimetry: DSC), chemical (mineral quantification, Fourier Transform InfraRed spectroscopy: FTIR), mechanical (nanoindentation tensile tests) approaches helping to define cuticle composition and organisation. Hence, thanks to these approaches, we know that at molecular level, cuticle is a composite assemblage mainly made of polysaccharides, proteins, and inorganic salts. Polysaccharides form long chains of chitin arranged in antiparallel sheets forming α -chitin [9], [10]. Then, chitin chains are wrapped by a protein matrix, forming nanofibrils [3]. Nanofibrils cluster in chitin-protein fibres, which are packed in parallel, forming a horizontal plane parallel to the epidermal cells below. Within each plane, fibres form a woven network in which spaces appear as honeycomb like structures, where pore canals lie [11], [7]. Finally, chitin-protein planes are stacked in vertical axis, rotating of a regular small angle from the previous plane below. This final molecular structure is well documented as Bouligand structure, or twisted plywood [12]. At the tissular level, the Bouligand structure corresponds to the basic composition unit of crustacean cuticle. In fact, this composite assemblage is classically made of four different layers: *i*) epicuticle, a thin waxy layer acting as barrier against water, *ii*) exocuticle, a large calcified layer comprising compacted Bouligand structures, permitting to support mechanical loads, *iii*) endocuticle, the largest layer comprising Bouligand structure

with a loose organisation, permitting to resist from breaks, and iv) a membranous layer, non-calcified part made of chitin-protein planes [13], [14], [15], [16].

If this cuticle structure is commonly found among crustaceans, variations in material composition or in layer number and organisation may appear between organisms [14], [17]. For instance, by comparing cuticle thermal properties with TGA, Neues et al. [6] observed differences of chitin and protein contents between four species of marine isopods. This observation leads to the importance of defining each species cuticle structure properties, which may greatly differ among crustaceans. Characterisation of cuticular properties has been made on some crustaceans comprising brachyuras (*Scylla serrata*: [18], [19]; *Callinectes sapidus*: [20]; [21]; *Cancer pagurus*: [16]), Penaeidae (*Penaeus monodon*: [22], [23] ; *Pandalus borealis*: [24], [25]), Astacidae (*Homarus americanus*: [3], [4], [7]; *Astacus astacus*: [26], [27]), Euphausiidae (*Euphausia superba*: [28], [29]), and peracaridas (*Gammarus lacustris*: [26]; woodlouses: [30], [6]; *Procellidium* spp.: [31]). In contrast, the *Palaemonidae* family, consisting of a high specific richness crustacean group, has only been poorly used in such cuticle studies. In fact, the only study dealing with cuticle characterisation was made by Park [32] who described the layer organisation of the cuticle of *Palaemon serrifer* by microscopical observations (TEM). Conversely, techniques used to describe the cuticle composition and organisation such as thermal, chemical, or mechanical properties have never been studied on *Palaemonidae* cuticle. This underlies the lack of knowledge of *Palaemonidae* cuticle and methodology used to analyse this structure.

Added to this observation, these properties have often been characterised by providing an overview of the cuticle, giving the impression that this structure is generally fixed and conserved, without variations in it. In fact, studies dealing with the dynamic of cuticle and its properties, influenced by intrinsic physiological factors (e.g. sex, age and moult cycle) or environmental factors (e.g. anoxia, temperature extremum, food quality and availability, as well as physicochemical stress and pollutions), remain scarce. Among physiological influence on crustacean cuticle, moult cycle could modify its organisation and composition. Indeed, some studies revealed changes in inorganic cuticle composition during the moult cycle [19], [33], [34], [23], [35]. Furthermore, owe to physiological events occurring along the moult cycle (i.e. degradation of the old cuticle during premoult, synthesis of the new one during premoult and postmoult), such changes could be observed in the analysis of cuticle structure. In the same manner, chemical exposure is also a factor susceptible to alter cuticle structure. This latter has been rather observed on chitin than on whole cuticle (i.e. studies dealing with artificially-made

chitosan, a deacetylated form of chitin). Nevertheless, cuticle structural changes have been described after an exposure of the cuticle at acid treatment [36]; alkaline treatment [7], [37]; EDTA exposure [7]; protease exposure [38].

In this context, the aim of this study was to apply different approaches, classically used to characterise cuticle structure and its changes, using the prawn *Palaemon serratus* as model. This *Palaemonidae* is an emblematic marine species, particularly in coastal systems of Western Europe where it can be found at a high density [39]. Furthermore, in these waters, this prawn plays an important role in trophic systems, being consumed by many fishes and other crustacean species, as well as in detritus breakdown process [40]. *P. serratus* is also important as fishery product, sustaining local economy [41]. This prawn is also quite easy to maintain at laboratory. For these reasons, *Palaemon* sp started to be more and more considered as a sentinel species used to study effects of chemical stress (e.g. [42], [43], [44]). In parallel, knowledge about *P. serratus* life traits have been improved. Hence, moult cycle has been studied on this species, from the definition of moult stages [45], [46], [42] to molecular observations [47], [48], [49] but no on cuticle characterisation.

In the present study, The *P. serratus* cuticle was firstly characterised by using thermal (i.e. TGA and DSC) and chemical approaches (i.e. FTIR and metallic element quantification of cuticle mineral fraction). With these tools, cuticle physicochemical properties were defined through several parameters linked with cuticle structural organisation and composition. These parameters and their variation highlighted remarkable events that help to better understand *P. serratus* cuticle composition and organisation. Then, these parameters were, for the first time, used along each stage of moult cycle, to detect the influence of this physiological factor. The *Palaemon serratus* moult cycle is composed of 8 moult stages, with i) A and B stages composing the postmoult, moment when the cuticle hardens and become progressively mineralised, ii) C stage representing the intermoult, period of cuticle steady state and iii) five stages representing the premoult with D0 representing the moment when the apolysis starts, and D1', D1'', D1''', D2 corresponding to the degradation of the old cuticle as well as the synthesis of the new one. In parallel, the same parameters were used to discriminate variations of structure between intact cuticles and induce-degraded ones with acid. Finally, the relevance of parameters was discussed in view of i) their intrinsic variability and ii) their ability to detect structure changes in a dynamical context.

2. Materials and methods

2.1. Biological material

Male specimens of *Palaemon serratus* were caught with specific traps in the 2-nautical miles' zone of the Cap of La Hève (Le Havre, Normandy, France) by a professional fisherman of Le Havre (DYFLO), during winter 2018. Prawns were transferred into 30 L-propylene tanks filled with oxygenated artificial seawater (*i.e.* ASW with a salinity of 33 psu reached by dissolving TETRA SEA® salt in water, which is commonly used in marine aquaculture) and were brought back to the laboratory within 1 h. Then, prawns were put in 80 L-aquariums to be under a density of 1 prawn per liter and were acclimated to laboratory conditions: ASW was under constant aeration and filtration at 19 ± 1 °C, aquariums were in 16/8 light/dark photoperiod, with a food supply consisting in a mix of krill and mysids (Europrix®) given each 2 days. Organisms were dissected for analyses within less than 1 week after being introduced in aquariums.

The studied specimens were anesthetised on ice. The total body length (*i.e.* from the tip of rostrum to the bottom of the tail), the cephalothorax length and the total body mass were systematically recorded. The moult stage was also determined on the basis of observations of the uropod setogenesis progress, in optical microscopy [42]. The cuticle of abdominal segments was cut longitudinally to obtain two distinct halves, measuring approximately 2 x 0.75 cm. Each respective 'half cuticle' was isolated by carefully moving away muscle tissue and epidermis with tweezers and individually stored in 1.5 mL of ASW at 4°C for a maximum of 24 h. Then, cuticles were wiped off to remove ASW, snap-frozen using liquid nitrogen and desiccated in a freeze dryer during 2 h. After lyophilisation, cuticle samples were stored at -20 °C until physicochemical analyses.

The figure 1 presents the experimental strategy. Briefly, prepared cuticles of male specimens of *P. serratus* were analysed by parameters used in DSC and FTIR for one half, and in TGA and ICP-AES on mineral fraction for the other half (see section 2.2). These parameters analyses resulted in the description of *P. serratus* cuticle composition and organisation (1). In a second part, the same parameters were assessed along the *P. serratus* moult cycle, to detect changes in the physicochemical parameters of the cuticle during this physiological event (2: see section 2.3). Finally, a cuticle degradation was induced by acid exposure, before being characterised by the thermal and chemical approaches used before. This induced degradation was realised to test the robustness of our method and the potential of parameters to detect such alteration on cuticle properties (3: see section 2.4).

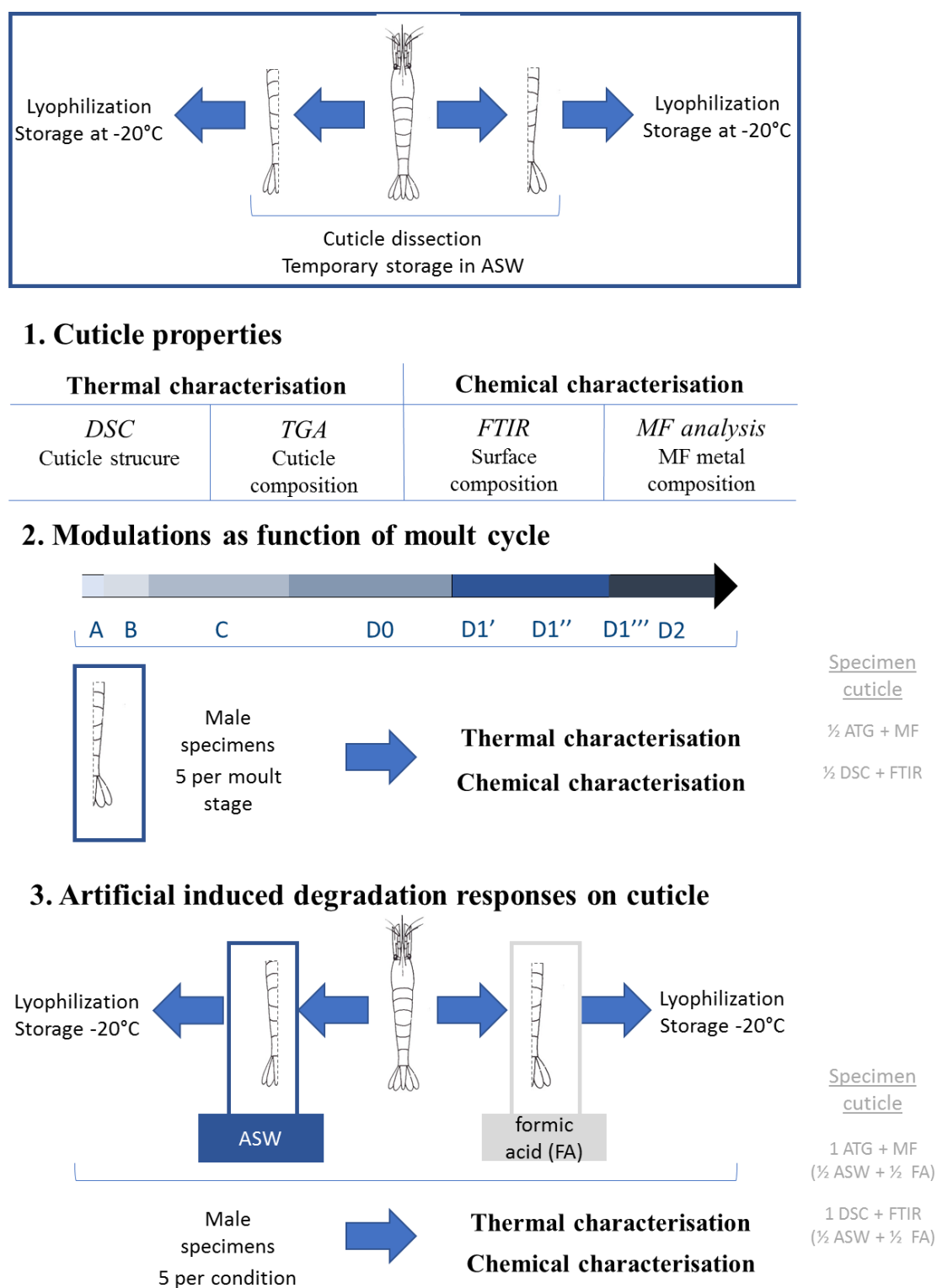


Figure 1 Experimental design, which was based on three main steps: (1) the characterisation of the physicochemical properties of the *Palaemon serratus* cuticle, (2) the description of the physicochemical property modulations along the moult cycle, and (3) the characterisation of the degradation of cuticle structure by formic acid.

2.2. Analytical methods of the cuticle structural properties

Thermal analyses. Differential scanning calorimetry (DSC) was performed using PerkinElmer® Pyris 1 DSC analyser. This technique allowed the study of the cuticle organisation, particularly the network formed by materials composing the cuticle. To do that, a small amount of sample (i.e. between 5 and 10 mg of lyophilized cuticle, representing a mean of ¼ of the half cuticle) was placed in an aluminium pan and sealed hermetically. In parallel, an empty aluminium pan was used as a reference. The heating program was defined as the following procedure: samples were maintained for 1 min at a temperature of 4 °C before being heated at a constant rate of 10 °C.min⁻¹. When samples reached 500 °C, they were maintained at an isothermal stage for 1 min. For each observed event, onset, peak and end temperatures were collected, as well as enthalpy values (expressed with J.g⁻¹). In parallel, thermogravimetric analysis (TGA) was performed using a Setsys device (Setaram, Caluire-et-Cuire, France) with the Setsoft software. This technique was used to study the cuticle composition through progressive degradation of its structure by heating process. To do that, an amount of 15-20 mg of sample (representing almost the entire half cuticle) was weighted and placed in an open alumina crucible, which was fixed to the thermobalance, before being placed in an oven with air atmosphere. The heating program was defined as the following procedure: samples were maintained for 10 min at 20 °C before being heated at a constant rate of 10 °C.min⁻¹. When samples reached 900 °C, they were maintained at an isothermal stage for 10 min. Each event observed was more precisely determined using the first derivative of TGA. For each event detected, peak temperature event (i.e. defined as the temperature at which the first derivative of TGA was at its maximum) and the sample weight loss (i.e. % of mass loss / total mass) were collected. After practicing each TGA run, the residual ashes (i.e. the mineral fraction) were collected and stored in hermetic capsules to avoid oxidation or degradation, to perform a chemical analysis of these residues (*cf.* below).

Analyses of residual mineral fraction. After collecting mineral fractions from TGA experiments, ashes were pooled for each condition (i.e. same moult stage for cuticles used in section 2.3; same chemical treatment for cuticles used in section 2.4). Then, ashes were dispatched to La Drôme Laboratoire (Valence, France). Briefly, pools were mineralized with nitric acid in micro-waves following the NF EN 13805 procedure. Quantitative Aluminium (Al) analysis was achieved thanks to ICP-MS Nexion 300 apparatus from Perkin Elmer. Quantitative Calcium (Ca) and Magnesium (Mg) analyses were achieved using a ICP-AES IRIS Intrepid II apparatus from Thermo-Scientific. Metal determination followed the NF EN 17294-2 standard.

For total metal content, limit of quantification in mg(metal) per kg of dried sample (DS) are 2 mg.kg⁻¹; 10 mg.kg⁻¹ and 10 mg.kg⁻¹ for Al, Ca, and Mg, respectively.

Analyses of surface composition. Fourier Transform InfraRed spectroscopy (FTIR) measurements were performed directly on pieces of lyophilized cuticles with a ZnSe/diamond attenuated total reflectance (ATR) accessory on a Perkin Elmer Frontier spectrometer. The data was averaged over 16 runs with a resolution of 4 cm⁻¹ in a wavelength range between 650 and 4 000 cm⁻¹. For each specimen, external and internal sides were analysed three times per side. Since ATR technique involves a high pressure on the material of interest to be analysed, each observation was performed using an intact piece of cuticle.

2.3. Experiment 1: cuticle structural properties during moult cycle

The aim of this experiment was to study the modulations of physicochemical parameters along the moult cycle, an intrinsic factor known to modify the cuticle structure. Thus, analyses of the cuticle structural properties (see section 2.2) were performed on the *Palaemon serratus* moult cycle, described with eight moult stages by Erraud et al. [42], adapted from Drach [45]. Cuticle of 4-6 specimens was analysed for each moult stage excepted for the C-stage (i.e. $n = 2$ for TGA and 4 for DSC and FTIR), which was very infrequent within the prawn samples during the collect period. As explained in section 2.2, the analyse of residual mineral fraction was performed from a single pool of post-TGA heating ashes, for each moult stage.

2.4. Experiment 2: in vitro acid treatment of cuticle

The aim of this experiment was to test the robustness of parameters used to characterise *P. serratus* cuticle, particularly in a context of cuticle induced degradation, assessing at the same time the ability to parameters to detect cuticle structure changes. To do that, the analyses of the structural properties (see section 2.2) were performed on cuticles submitted to different acid treatments (i.e. 10 or 100 % formic acid solutions) in comparison to a control condition (i.e. cuticles keep in ASW). Briefly, cuticles were sampled (see section 2.1) in specimens of the same moult period (i.e. D0-D1'). For each specimen, the halves of abdominal cuticle were incubated in ASW or in one of formic acid solutions, during 24 h. After incubation, samples were snap frozen, lyophilized, and stored at -20 °C until analyses. Thermogravimetric and mineral fraction analyses on one side, and DSC and FTIR analyses on another, were performed

on different sets of treated cuticles, in each case $n = 10$, 5 and 5 cuticles for the ASW-control, 10 % formic acid and 100 % formic acid groups, respectively.

2.5. Statistical analysis

Statistical procedures were implemented with R software (R Core Team, 2018 [50]). Normality and homoscedasticity were checked using the Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively, before conducting parametric analysis.

For each experiment, variability on the structural organisation of materials composing the cuticle, assessed by DSC, was tested using the ANOVA procedure (*lm* function, classical type I decomposition) with post hoc analysis (*pairwise.t.test* with holm correction). In parallel, variability of cuticle composition, assessed by TGA, was determined with Kruskal-Wallis tests. FTIR spectra were analysed with Orange data mining software. PCA were realised to determine differences between the different tested conditions. No statistical analyses were used with mineral fraction analyses, as they were mainly used to complete the description cuticle properties.

3. Results and Discussion

3.1. Characterisation of the properties of *Palaemon serratus* cuticle

If cuticle layers have been once investigated in *Palaemonidae* prawns with microscopical observations (*Palaemon serrifer*: Park, 1999), the present study characterised for the first time in the literature a *Palaemonidae* cuticle composition and organisation, determined by physicochemical property analyses.

Thermal analyses. Before characterising *P. serratus* cuticle with its thermal properties, heating programs were performed on different samples coming from a same cuticle, to assess the repeatability of thermal properties along the entire abdominal cuticle. This check was not performed on TGA technique, owe to the too high sample weight needed for practicing a run, the minimum weight of 15 mg representing around 60-75 % of the lyophilised half cuticle. Considering DSC technique, at least three different samples per cuticle ($n = 5$) were analysed, collected along the anterior-posterior axis. At the end of the comparison, no difference owed to the sample localisation was observed (Kruskal-Wallis; $p\text{-value} > 0.05$), simplifying the way of collecting cuticle samples before analysing them.

DSC curve of the *P. serratus* cuticle is shown in Fig 2a. By analysing this curve, a first endothermic peak was observed between 110 and 160 °C, with an onset temperature, peak temperature, end temperature and enthalpy value of 114.78 °C; 128.90 °C; 158.57 °C and 229.79 J.g⁻¹, respectively. A second endothermic peak was observed with DSC technique, whose characteristics were an onset temperature, peak temperature, end temperature and enthalpy value of 320.84 °C; 340.19 °C; 363.24 °C and 42.77 J.g⁻¹, respectively. In the literature, this event was found at similar temperatures in studies analysing the cuticle as a whole biocomposite material, as for instance on the Astracidae *Procambarus clarkii* and the Brachyura *Eriocheir Sinensis* cuticles [51] as well as on another arthropod cuticle (*Limulus polyphemus* [52]). The two degradation events found by DSC technique were linked to the water evaporation (i.e. in our case, bound water evaporation since cuticles were lyophilised) and the degradation of low molecular weight macromolecules respectively, both present in the material network of the cuticle. This link was confirmed by studies dealing with chitin material extracted from crustacean cuticles, where the two degradation events were also observed [28, 53].

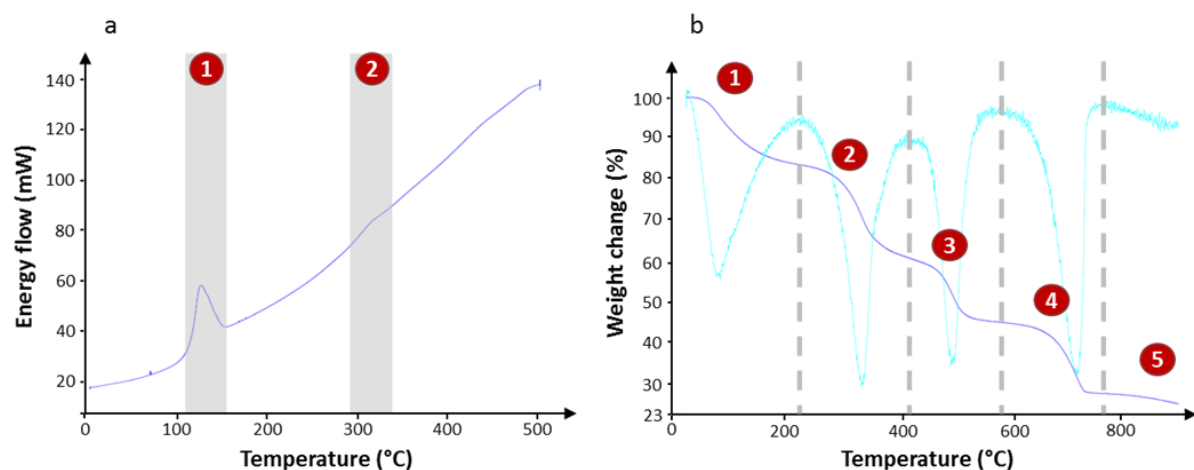


Figure 2 Typical curves of DSC (a) and TGA (b) analyses on the physicochemical properties of the *Palaemon serratus* cuticle. Analysis of the DSC curve allows the definition of two main events related to the cuticle organisation (grey areas), while the study of TGA results (blue curve) and the first derivative of the sample weight loss (light-blue curve) permits to define five events attributed to cuticle composition. Both techniques detect events linked with bound water evaporation (1) and protein degradation (2), while only TGA results detect chitin degradation (3) and inorganic phase oxidation (4) events. At the end of TGA heating process, *P. serratus* cuticle is represented by a resting mineral fraction (5).

TGA curve of the *P. serratus* cuticle is shown in Fig 2b. The first event appeared in TGA curve between 20 and 200 °C, with a peak of maximum degradation at 70-110 °C. This degradation represented a cuticle weight loss of 14 %. As for DSC, this first event was also

attributed to bound water evaporation. A second event appeared in TGA curve between 200 and 450 °C, with a peak of maximum degradation at 305-310 °C. This degradation represented a cuticle weight loss of 27 %. As for DSC, the second event was also attributed to the degradation of low molecular weight macromolecules present in the cuticle. A third degradation event appeared between 450 and 600 °C, with a degradation maximum occurring at 490-550 °C. This event degraded a cuticle mass of 17 % and was attributed to the degradation of chitin and the rest of macromolecules remaining. Furthermore, a fourth event appeared between 600 and 800 °C, with a degradation maximum occurring at 640-720 °C. The weight loss associated to this event was around 12 %, representing the oxidation of cuticle inorganic phase, such as calcite or magnesite, which were liberated to volatile oxides owing to the oxygenated atmosphere present in the oven. At the end of the TGA heating process, only the stable mineral fraction remained, representing 30 % of the initial weight sample. Events observed by TGA technique were observed at similar temperature range on other crustaceans as Brachyuras (*Cancer pagurus* [5]; *Eriocheir sinensis* [51]), Astacidae (*Homarus americanus* [5], [7]; *Procambarus clarkii* [51]; *Astacus astacus* [26]), Euphausiidae (*Euphausia superba* [31]) and Peracaridae (*Gammarus lacustris* [26]; woodlouses [30], [6]).

In the present study, after lyophilising it, the *P. serratus* cuticle appeared to be composed of 14 % of bound water, 27 % of low molecular weight macromolecules, 17 % of chitin, 12 % of volatile inorganic elements and 30 % of other inorganic elements. Table 1 highlighted the comparison of the cuticle composition between different crustacean groups. Even if slight differences existed, partially owing to the different methodology of obtaining cuticles, a preliminary comparison could lead to the hypothesis that the composition of the prawn cuticle would be closed to the one of shrimps, lobsters, and crayfishes [26], [5], [7], [54], [55]. Such similarities are consistent with the argument of Neues et al. [6] who declared that a correlation exists between the cuticle composition and the ‘ecological strategies and behavioural patterns’ of a species. Here, Astacidae, and mostly shrimps, *Palaemonidae* and *Penaeidae* developed escape and feeding behaviours mainly based on swimming strategies. This strategy involves that the abdominal cuticle has to resist to mechanical deformations induced by the swimming behaviour, being thus richer in organic matrix and amorphous salts (i.e. volatile inorganic phase) than in crystalline minerals, which are susceptible to crack. Conversely, other decapods as Brachyura have locomotion and feeding strategies based on walking behaviours. Such behaviours imply for the organism to be at the water bottom, and for its cuticle to be as tough as possible to resist to shocks and mechanical loads. These

characteristics are found in their cuticle composition, being richer in crystalline minerals, which are dense and shock resistant elements, than in organic matrix. By extension with other crustacean groups and ecosystems, freshwater amphipods, which shows similarities in behaviour with *Palaemonidae*, would display closed cuticle composition. Data obtained by Hilton et al. [26] displayed yet cuticles richer in inorganic phase, and poorer in organic matrices, which may be explained by the fact that exuviae (i.e. resting materials after cuticle resorption occurring in late moult cycle) has been analysed. Isopod showed a cuticle richer in inorganic elements and poorer in organic matrix than *Palaemonidae*. However, a high variability may be observed in cuticle compositions between isopod species. This variability was explained by Neues et al. [6] who distinguished roller, runner, and clinger isopods, displaying differences in organic matrix and inorganic element proportions between these patterns. Moreover, same disparities were observed within marine isopods, which was explained by the diversity of habitats encountered by the different species. Such variations of cuticle composition between organisms living in different habitats can be also detected with the whole cuticle structure, particularly on cuticle layer organisation [56]. These observations rise the interest to investigate the structure cuticle of crustaceans and their interspecific variabilities, with if possible homogenous methodologies, to better understand the adaptation of crustaceans to their ecological habitats and ways of life.

				Water content	Organic matrix		Inorganic phase		Authors
					Protein content	Chitin content	Oxides produces	Mineral fraction	
	Species	Ecosystem	Cuticle extraction	0-200°C	200-400°C	450-600°C	600-800°C	>900°C	
Palaemonidae	<i>P. serratus</i>	Marine	Abdominal shell (lyophilised)	13.7	27.0	16.9	12.0	30.0	Present study
Penaeide	<i>P. semisulcatus</i>	Marine	Shells dried (powder)	NA	37.6	16.7	45.6		Al Sagheer et al. (2009)
	<i>M. affinis</i>	Marine	Shells dried (powder)	NA	28.8	19.1	52.0		Al Sagheer et al. (2009)
Other shrimps	Shrimp (<i>sp. unknown</i>)	N.D.	Shells dried (powder)	4.0	50.0		12.0	30.0	Huang et al. (2018)
	Shrimp (<i>sp. unknown</i>)	N.D.	Cephalothorax (powder)	8.8	33.7		18.8	38.8	Gbenebor et al. (2016)
	Shrimp (<i>sp. unknown</i>)	N.D.	Shells dried (powder)	5.0	53.0		10.0	27.0	Zhao et al. (2019)
Astacidea	<i>H. americanus</i>	Marine	Chelipeds	13.0	22.0	10.0	15.0	40.0	Romano et al. (2007)
	<i>H. americanus</i>	Marine	Cephalothorax	11.8	38.2		16.1	32.3	Bosselmann et al. (2007)
	<i>T. orientalis</i>	Marine	Shells dried (powder)	NA	16.9	21.3	61.8		Al Sagheer et al. (2009)
	<i>P. argus</i>	Marine	Shells dried (powder)	7.7	17.3		33.0	42.0	Ramirez et al. (2017)
Other crayfishes	Crayfish (<i>sp. unknown</i>)	N.D.	Exuviae	12.0	37.0		21.0	28.5	Hilton et al. (1984)
	Crayfish (<i>sp. unknown</i>)	N.D.	Whole body	11	57.0		18.0	12.0	Hilton et al. (1984)
Brachyuras	<i>C. pagurus</i>	Marine	Cephalothorax	11.8	16.6		27.3	43.6	Bosselmann et al. (2007)
	<i>P. algeriense</i>	Freshwater	Shells dried (powder)	5.0	15.3	22.9	24.9	31.9	Fadlaoui et al. (2019)
	<i>P. pelagicus</i>	Estuary	Commercial shells dried (powder)	NA	10.3	20.8	68.9		Al Sagheer et al. 2009)
Other crabs	Crab (<i>sp. Unknown</i>)	N.D.	Cephalothorax (powder)	3.9	10.4		30.93	54.8	Gbenebor et al. (2016)

Table 1 Comparison of cuticle composition between different crustacean species.

Table 1 suite

				Water content	Protein content	Chitin content	Oxides produces	Mineral fraction	Authors
	Species	Ecosystem	Cuticle extraction	0-200°C	200-400°C	450-600°C	600-800°C	>900°C	
Amphipoda	<i>G. pulex</i>	Freshwater	Exuviae	9.0	25.0		27.0	37.0	Hilton et al. 1984
	<i>G. pulex</i>	Freshwater	Whole body	6.5	71.5		7.0	14.0	Hilton et al. 1984
	<i>G. lacustris</i>	Freshwater	Exuviae	6.5	31.5		24.0	37.0	Hilton et al. 1984
	<i>G. lacustris</i>	Freshwater	Whole body	8.5	70.0		7.0	14.0	Hilton et al. 1984
Isopoda	<i>Asellus sp.</i>	Freshwater	Exuviae	10.5	24.5		25.5	3.9	Hilton et al. 1984
	<i>Asellus sp.</i>	Freshwater	Whole body	8.0	64.5		9.5	17.5	Hilton et al. 1984
	<i>I. baltica</i>	Marine	Dorsal segments	11.6	32.6		50.7	5.1	Neues et al. 2007
	<i>P. wasnesenkii</i>	Marine	Dorsal segments	13.8	31.8		45.4	8.9	Neues et al. 2007
	<i>S. serratum</i>	Marine	Dorsal segments	12.9	10.5		64.1	12.5	Neues et al. 2007
	<i>G. oregonensis</i>	Marine	Dorsal segments	7.8	15.0		68.3	8.9	Neues et al. 2007
	<i>O. asellus</i>	Terrestrial	Dorsal segments	6	20.3		55.0	18.7	Neues et al. 2007
	<i>P. muscorum</i>	Terrestrial	Dorsal segments	10.5	21.2		56.0	12.3	Neues et al. 2007
	<i>P. spinicornis</i>	Terrestrial	Dorsal segments	8.0	22.5		55.4	14.1	Neues et al. 2007
	<i>A. officinalis</i>	Terrestrial	Dorsal segments	11.6	13.8		63.6	11.0	Neues et al. 2007
	<i>P. scaber</i>	Terrestrial	Dorsal segments	8.0	24.8		49.6	17.6	Becker et al. 2005
	<i>A. vulgare</i>	Terrestrial	Dorsal segments	9.7	11.7		64.8	13.8	Becker et al. 2005

Analyses of residual mineral composition. To allow the comparison with other crustaceans, this part will focus on the mineral fraction proportion on intermoult specimens of *P. serratus* (Table 1). Metals present in the cuticle mineral part of *P. serratus* was mainly composed of calcium (Ca), magnesium (Mg), and strontium (Sr), with 382 000; 23 200 and 6 700 mg.kg⁻¹ respectively. These elements are known to be abundant in invertebrate skeletons including crustacean cuticles, with an element ratio depending on the environment where organisms live, particularly for Sr [57]. Other micro elements were present in *P. serratus* cuticle at different concentrations, as zinc (Zn: 81.0 mg.kg⁻¹); iron (Fe: 76.0 mg.kg⁻¹); copper (Cu: 25.3 mg.kg⁻¹); chromium (Cr: 14.9 mg.kg⁻¹); manganese (Mn: 5.5 mg.kg⁻¹); nickel (Ni: 4.4 mg.kg⁻¹) for instance. The presence of these metals was also found in cuticles of Pandalidae (*Pandalus borealis* [25]); Peneidae (*Penaeus notabilis* [58]); undetermined species shrimp [59] and Palaemonidae [60]. Conversely, if the composition of *P. serratus* cuticle was similar to those found in the literature, the metal contents may differ between organisms. The present study focused mainly on the metal proportion of the cuticle rather than the pure quantification, assessing elements after thermal degradation which had liberated volatile elements (e.g. calcite, magnesite). Thus, such methodology made difficult the comparison of metal contents with other crustacean cuticles.

Analyses of surface composition. As the external and internal faces of the cuticle may experience different compositions, we decided to characterize both surfaces. Before analysing them, a normalisation of the spectra has been made on the 2 850-3 000 cm⁻¹ area, based on the hypothesis that organic carbon, constituting almost all the cuticle materials, shouldn't be modulated between specimens nor side surfaces. Typical spectrum describing composition of both external and internal faces of *P. serratus* cuticle were shown in Fig 3. Main FTIR bands of the external face were found at 857 cm⁻¹, 1 025 cm⁻¹, 1 072 cm⁻¹, 1 155 cm⁻¹, 1 243 cm⁻¹, 1 367 cm⁻¹, 1 529 cm⁻¹, 1 637 cm⁻¹, 2 163 cm⁻¹, 2 853 cm⁻¹, 2 926 cm⁻¹, 2 966 cm⁻¹ and 3278 cm⁻¹. This profile was similar in band localisations with other crustaceans such as Gonodactylidae (*Neogonodactylus oerstedii* [61]), as well as for undetermined species of crabs and shrimps [36], but not in intensities, since the present study characterised the cuticle as a raw and complex material, while other authors focused mainly on purified cuticle (i.e. cuticle crushed into powder or simply extracted chitin). The internal face displayed main bands at 683.1 cm⁻¹, 894.6 cm⁻¹, 919.4 cm⁻¹, 952.3 cm⁻¹, 1 010 cm⁻¹, 1 058 cm⁻¹, 1 100 cm⁻¹, 1 202 cm⁻¹, 1 258 cm⁻¹, 1 307 cm⁻¹, 1 377 cm⁻¹, 1 414 cm⁻¹, 1 543 cm⁻¹, 1 639 cm⁻¹, 1 733 cm⁻¹, 2 655 cm⁻¹, 2 855 cm⁻¹, 2 874 cm⁻¹, 2 927 cm⁻¹

$2\,960\text{ cm}^{-1}$ and $3\,268\text{ cm}^{-1}$. To our knowledge, this is the first time that the internal face of crustacean cuticle has been characterised. In fact, contrary to the present experiments, other studies focused on the commercial interest of crustacean cuticle. For this purpose, cuticle was rather crushed into powder, improving the cuticle conservation and the IR resolution. By comparing the FTIR spectra of cuticle external and internal faces, two different band areas were evidenced: the first area was located between 820 and 898 cm^{-1} , with a higher intensity observed on external face, having a main band at 857 cm^{-1} . The second area was located between $1\,179$ and $1\,487\text{ cm}^{-1}$, where external face displayed a higher intensity, with a maximum intensity localised at $1\,367\text{ cm}^{-1}$. The first band mentioned has already been observed on *Pericaridae* dorsal segments [30], as well as in *Astacidae* gastroliths (*Cherax quadricarinatus* [62]) and in *Pericaridae* caeca (*Orchestia cavimana* [63]) and may be attributed to the calcium salts incorporated in cuticle. Furthermore, the wavelength and intensity of this band permitted to define it as the ν_2 out-of-plane bending of the carbonate group of Amorphous Calcium Carbonate (ACC), rather than calcite or other calcium mineralisation forms [30], [64], [36]. The second band has been more documented than the first one, both in crustacean cuticle and chitin preparations [65], [28], [66], [67], [36], [68] and could be attributed to the C-H stretching vibration of amide II of chitin. Hence, the external face of *P. serratus* seemed to be richer in chitin and calcium salts, particularly ACC, than internal face. These results were consistent with the analyses of materials constituting cuticle layers, particularly the contrast existing between the outer and the inner parts. By taking the hypothesis that *P. serratus* cuticle was made with four layers, as *P. serrifer* [32], the external face of the cuticle is represented by the epicuticle, which was found to be rich in calcium salts as well as in carbohydrates (e.g. chitin) and proteins [23]. Conversely, the cuticle inner layer, represented by the membranous layer, is known to be one of the extended or more relaxed cuticle layer, which means a chitin-protein structure less compacted, as well as being less mineralised than other layers [13], [16]. Such organisation could explain the differences observed between the two cuticle sides, but this has to be confirmed with further investigations dealing with histological analyses and/or and microscopical observation of *P. serratus* cuticle.

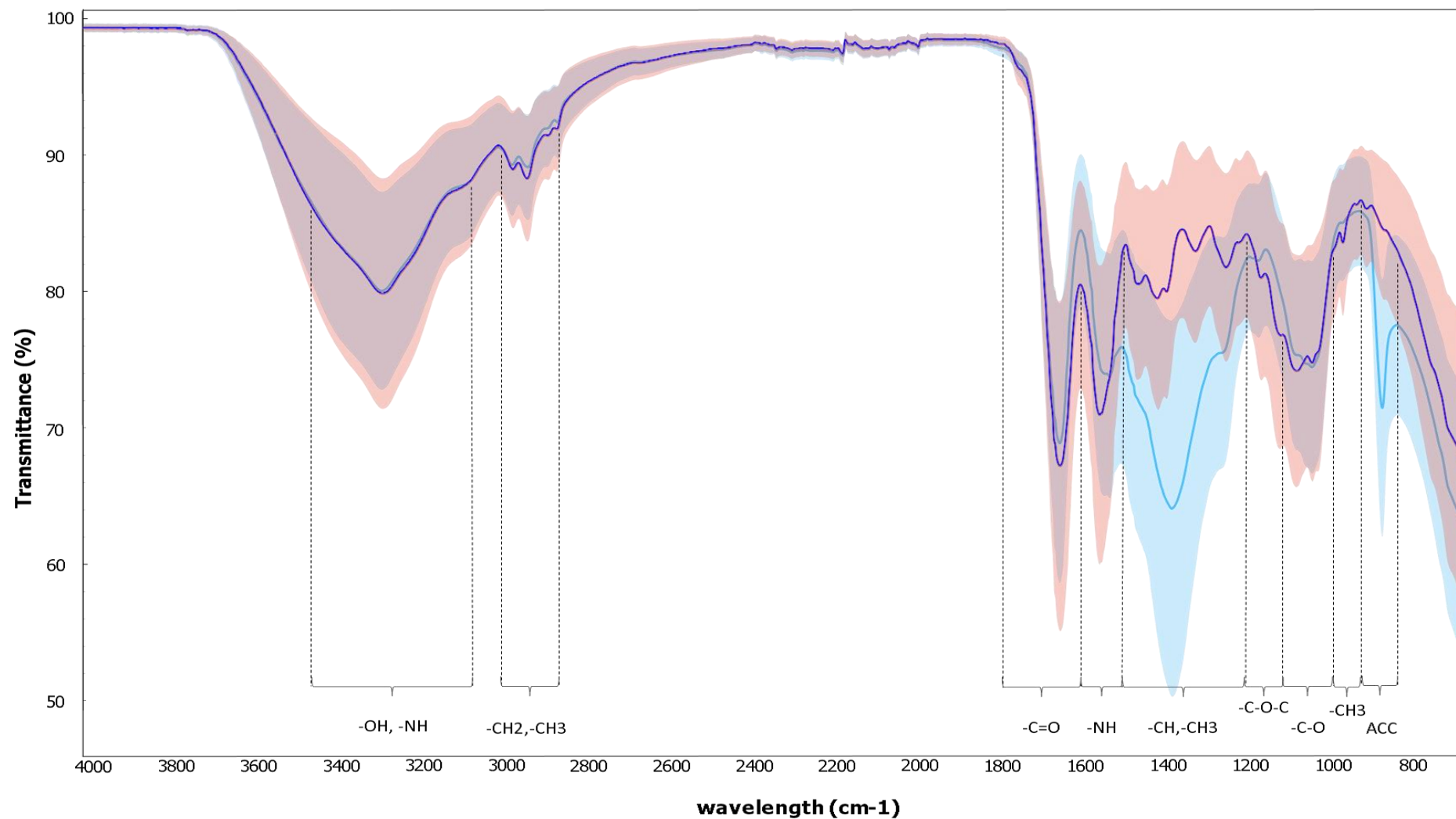


Figure 3 FTIR spectra of the external (blue) and internal (red) faces of the cuticle of the prawn *Palaemon serratus*. Bold blue and red curves correspond to the mean of spectrum values of external and internal cuticle faces respectively ($n = 5$ for each face). Blue and red clouds correspond to the standard deviation of the spectrum values of each corresponding cuticle face. Spectrum normalisation has been made on the $2\,850\text{--}3\,000\text{ cm}^{-1}$ area.

3.2. Modulations of the cuticle properties as function of the moult cycle

Contrary to classic cuticle characterisation, assessment of cuticle properties along the moult cycle of Palaemonidae species, has not been done yet. Thus, the present study characterised for the first time the modulations of Palaemonid cuticle physicochemical properties along the moult cycle using *P. serratus* cuticle as model.

Modulations of Thermal properties. Modulations of measured parameters analysed by DSC technique are displayed in Fig 4. As for the cuticle characterisation, temperatures at the onset, the peak and the end of each event, as well as event enthalpy values will help us to understand the modulations of the cuticle along the moult cycle. Considering the bound water evaporation event, no one of the four measured parameters was modified during the moult cycle (ANOVA; $p\text{-value} > 0.05$). Conversely, temperature recorded at the peak of the low molecular weight macromolecule event displayed significant difference between the A and B postmoult stages, which had the lowest temperature values compared to the other stages of the moult cycle (ANOVA: $p\text{-value} = 3.28 \times 10^{-2}$). Temperatures recorded at the onset and the end of this event displayed the same tendency, but not significantly (ANOVA: $p\text{-value} > 0.05$). Finally, no difference was displayed by the enthalpy value of this event (ANOVA: $p\text{-value} > 0.05$). With an overview of the DSC results, it appeared that all measured parameters showed values with high variability. This variability comes from the fact of analysing only degradation events with DSC. Here, degradation led to a massive pressure increase inside the sealed aluminium pan (owe to both water evaporation and release of volatile carbonated compounds), which will parasite the signal obtained. The signal artifacts may be even worst since the material analysed is a natural biocomposite material which was not purified, involving a higher and not controlled pressure inside pans. Classically, DSC technique is used to study the structure and organisation of the network formed by materials included in a matrix such as in composite structures. This context involves the energy acquisition/release of the structure which often leads to modify the network between materials without causing a high pressure. In this context, DSC technique appeared to be not the appropriate technique to measure the cuticle structure dynamic. However, this technique has potential since even in a not appropriate use, difference in chitin degradation has been observed. Further investigations with other programs and pressure adapted pans would permit to assess the evolution of *P. serratus* cuticle along the moult cycle with DSC technique. In parallel, complementary studies involving purified materials of the *P. serratus* cuticle would help to understand the fate of the cuticle material organisation under dynamic conditions.

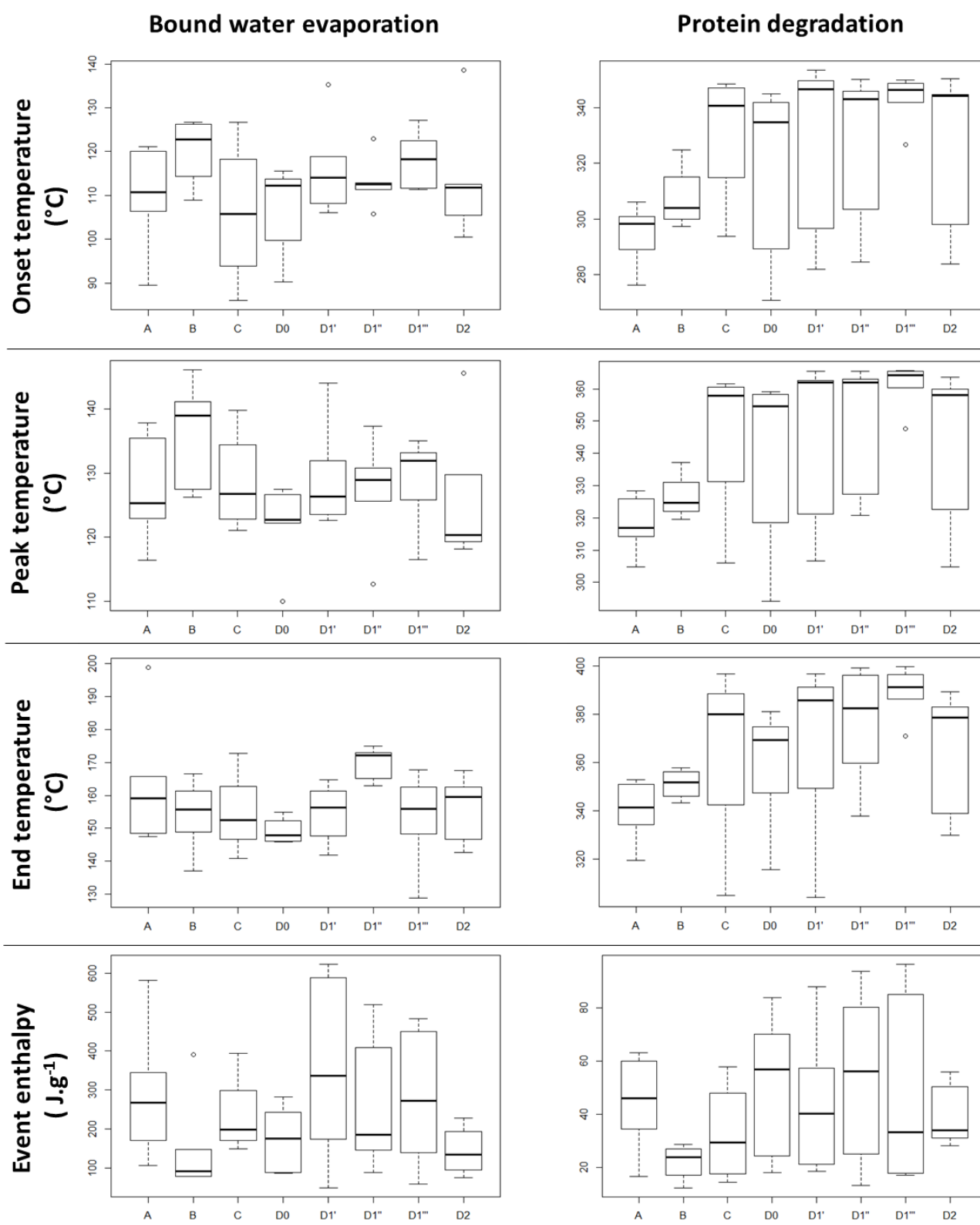


Figure 4 Dynamic of the *Palaemon serratus* cuticle organisation, analysed by DSC technique, along the moult cycle. DSC metrics displayed are onset, peak, end temperatures and enthalpy values of the bound water evaporation (left boxes) and the protein degradation (right boxes). Each box is the result of 4-6 cuticle specimens, except for C stage. These boxes show the data median with the lower and upper box limits symbolizing respectively the first and third quartile distribution.

Modulations of measured parameters analysed by TGA technique are displayed in Fig 5. Here, event temperature and sample weight loss were the selected parameters which help us to assess the cuticle modulations along the moult cycle. According to the bound water event, as for DSC, no significant modifications induced by the moult cycle were detected for event temperature nor for sample weight loss (Kruskal-Wallis: $p\text{-values} > 0.05$). Considering the low molecular weight degradation event, TGA analyses displayed a lower event temperature occurring at postmoult (A and B stages with a mean event temperature of 313.89 and 311.69°C, respectively, which were different from D2 stage, displaying the maximum mean event temperature of 329.68°C: Kruskal-Wallis, $p\text{-value} = 5.95 \times 10^{-4}$). Associated sample weight loss was the highest at A stage, before decreasing to reach an intermediate value in intermoult (35.6 vs 26.9 %; Kruskal-Wallis, $p\text{-value} = 1.02 \times 10^{-3}$). Then, the weight loss decreased again, but not significantly, at the end of the premoult. Considering chitin degradation, this event has been modulated along the moult cycle, with A and D2 stages as respectively the highest and lowest event temperatures recorded by TGA (525.33 vs 497.39°C, Kruskal-Wallis: $p\text{-value} = 4.96 \times 10^{-2}$). However, this difference was not observed for associated sample weight loss (Kruskal-Wallis: $p\text{-value} > 0.05$). Observations of protein and chitin event modulations along the moult cycle were consistent with the tanning of the cuticle and hardening the chitin-protein networks, both occurring during postmoult. Thus, after realising intermoult, the physicochemical properties of *P. serratus* cuticle seem to be steadier since the cuticle has already completed its hardening, having an organisation more complex than at the beginning of the moult cycle. However, the pattern of sample weight loss attributed to chitin degradation remains difficult to explain and deserves further investigations to be fully understood. Considering the fourth event observed with TGA, event temperature was lower in A and B stages than the intermoult and premoult stages (Kruskal-Wallis: $p\text{-value} = 1.49 \times 10^{-2}$). Associated sample weight loss showed a similar pattern, being lower at A and B stages (Kruskal-Wallis: $p\text{-value} = 8.93 \times 10^{-3}$). Modulations observed at the fourth event are consistent with metal uptake occurring at postmoult, allowing the cuticle mineralisation during these stages, and thus, the increased amount of calcite and magnesite. At the end, cuticle mineral fraction remaining in the crucible varied significantly along the moult cycle (Kruskal-Wallis: $p\text{-value} = 2.59 \times 10^{-2}$), according three different phases : i) a significant increase between early postmoult until intermoult stage (i.e. maximum occurring at B stage with a mineral fraction representing 30.1 % of the cuticle), which is consistent with cuticle mineralisation, ii) a significant decrease from intermoult to late premoult (i.e. D1''' stage, with a mineral fraction representing 20.5 % of the cuticle), which may be in adequation with the temporary metal storages following the

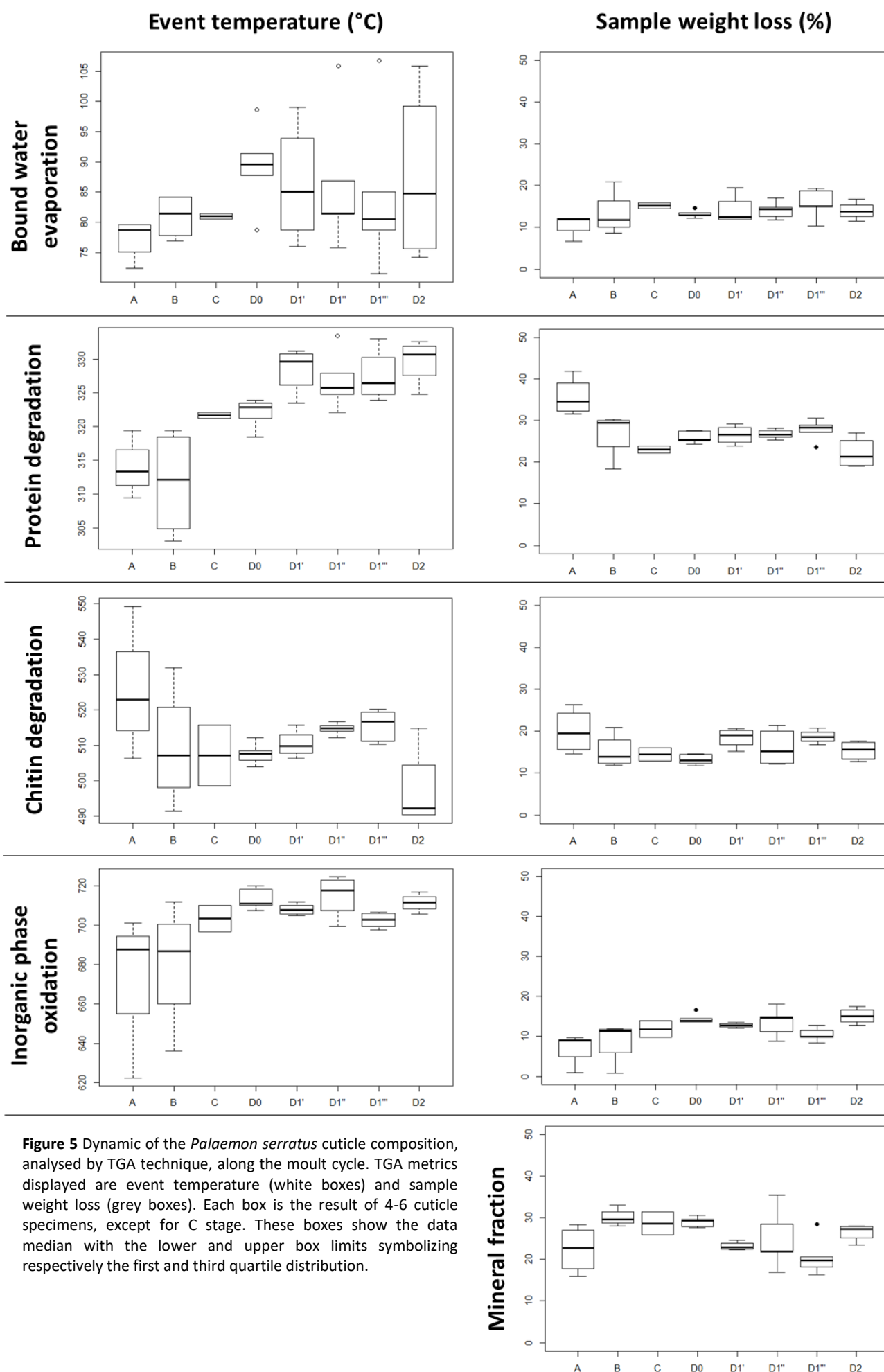
start of apolysis, and thus the dissolution of mineral part of the old cuticle, and *iii*) an increase at late premoult, which is still unclear and deserves more investigations to be fully understood.

Mineral fraction changes. Complementary analyses of metal proportion composing the resting mineral fraction after TGA program were shown in Table 2. Proportion analyses were made on pools of mineral fractions for every moult stage, giving supplementary information about inorganic phase composition. Among major elements, calcium and strontium proportions displayed the same pattern with the lowest value at A stage (233 200 and 4 400 mg.kg⁻¹ for calcium and strontium, respectively), then metal amounts increased in proportion during the end of postmoult until reaching intermoult where metal amounts were stabilised for the end of the moult cycle. Conversely, magnesium had its highest amount at A stage, with 42 800 mg.kg⁻¹, before decreasing until early premoult (D1' stage) where magnesium amount reached a steady level for the end of the moult cycle. The same pattern as magnesium was displayed by both chromium and zinc. Other minor elements had also a highest value at the beginning of the moult cycle (iron: 272 mg.kg⁻¹; nickel: 18.6 mg.kg⁻¹) but having an important decrease of amount directly at the end of postmoult, followed by a constant decrease until the end of the moult cycle, except at D1''' stage where the metal amounts increased. Copper and manganese showed intermediate patterns: copper presented decreasing amounts from postmoult to early premoult (D0 stage) but showed a high increasing two times at D1' stage, where the highest copper amount was seen (76 mg.kg⁻¹), and at D1''' stage (61 mg.kg⁻¹), before decreasing at the end of the moult. Finally, manganese displayed a decrease of amounts during postmoult and intermoult, before reaching higher values during premoult, with a maximum of 18 mg.kg⁻¹ at D1'' stage. Hence, for many metals analysed, A stage and by extension postmoult stages always displayed a different pattern than the other moult stages, showing a different metal proportion present in *P. serratus* cuticle. This postmoult change was corroborated by the modulation of mineral fraction content occurring at postmoult, measured by TGA. Such modulations of metal proportion and content were in adequation with the high metal uptake occurring at postmoult, which was allowed by the cuticle release and the massive water absorption by the organism. Metal uptake at early postmoult is a well-known in crustacean physiology, particularly for calcium [69], [70], [33], [34], [35], [71]. When entering in the organism, these metals will play a role in the cuticle mineralisation and hardening [72], [6], [73], [74]. Thus, by uptaking metals rapidly at A stage, this phenomenon may be assumed to change the proportion of inorganic elements present in the cuticle. Furthermore, by advancing in postmoult, cuticle will be more and more mineralised until reaching a steady state

during intermoult, when this structure is fully mineralised. Such pattern could corroborate our results about metal proportion. This pattern was confirmed by the TGA result concerning mineral fraction, with a content increase from A stage to C stage. Nevertheless, a real confirmation would come from the assessment of the mineral fraction content on cuticle samples being not heat treated. In parallel, since mineralisation of the cuticle is correlated with its mechanical properties [16], [17], [75], [76], the assessment of such properties along the moult cycle would result in modulation responses, with a possibly higher elasticity and viscosity in postmoult than in intermoult, giving complementary information about *P. serratus* cuticle structure.

Table 2 Dynamic of the major element proportion measured on a pool of resting mineral fractions of the cuticles of *Palaemon serratus* specimens of each moult stage (8 moult stages, 1 pool per moult stage, 5 specimens per pool).

Element proportion (mg.kg ⁻¹)	Moult stage							
	Postmoult		Intermoult	Premoult				
	A	B	C	D0	D1'	D1''	D1'''	D2
Calcium	233 200	361 700	382 000	365 800	394 700	385 000	385 300	425 500
Magnesium	42 800	39 100	23 200	28 500	11 400	15 000	15 700	16 600
Strontium	4 400	5 900	6 700	7 400	7 600	7 100	7 400	8 000
Copper	53.4	24.4	25.3	17.2	76.0	41.0	61.0	37.0
Iron	272.0	97.0	76.0	51.0	47.0	36.0	65.0	30.0
Manganese	10.0	8.2	5.5	15.1	16.3	18.2	15.9	13.6
Zinc	223.0	148.0	81.0	116.0	70.0	102.0	76.0	64.0
Chromium	29.3	19.3	14.9	20.0	10.3	8.9	16.0	18.7
Nickel	18.6	5.7	4.4	3.3	1.8	1.1	3.6	1.8



Modulations of surface composition. Considering both external and internal cuticle sides of *P. serratus* cuticle, changes appeared in FTIR band intensities (e.g. external face: 1 637 cm^{-1} ; 1 365 cm^{-1} ; 1 030 cm^{-1} and 860 cm^{-1} ; internal face: 1 640 cm^{-1} ; 1 544 cm^{-1} ; 1 378 cm^{-1} and 1 074 cm^{-1}). However, these changes were not significant owing to the variability of organisms sharing the same moult stage (PCA test). These observations contrasted with major changes occurring in cuticle structure along the moult cycle of crustaceans, including layer degradations and syntheses, happening particularly during premoult and postmoult [77], [14], [78], [33], [23]. These changes should be observed on FTIR spectra, particularly on cuticle internal face, being influenced by the moulting fluid, contrary to the external one which is always represented by the same layer, epicuticle, during the entire moult cycle. Further investigations of moult cycle influences on cuticle surface composition would allow to have a better understanding about the obtained results.

Cuticle properties modulated during *P. serratus* postmoult. Assessment of the modulations induced by moult cycle on crustacean cuticle structure has been poorly investigated, preferentially with studies focused on mineral contents of cuticle along the moult cycle [69], [70], [33], [34], [35], [71]. The present study included both thermal and chemical approaches to bring complementary information about these modulations. Hence, based on thermal and chemical property modulations, a general pattern was found on *P. serratus* cuticle along its moult cycle. Indeed, for most of parameters observed including protein degradation, chitin degradation, inorganic phase oxidation, as well as mineral fraction content and composition, postmoult, mainly A stage, always differed comparing to other moult stages. Then, after the postmoult realisation, cuticle properties reached a steady state which often persisted, except for mineral fraction content and event temperature of chitin degradation, to the end of *P. serratus* moult cycle. Furthermore, these results were corroborated by Pratoomchat et al [33] who measured chitin, protein, and some inorganic element levels in the cuticle, over the moult cycle, of the Brachyuran *Scylla serrata* specimen, founding the same patterns. These observations were also in adequation with the dynamic of cuticle structure, particularly the major changes occurring at postmoult and associated with metal uptakes, as well as cuticle synthesis, hardening and mineralisation. Such events being completed at intermoult, this may also explain the reach of cuticle property steady state at this moult stage. Thermal properties, which have never been used in context dealing with cuticle changes by moult cycle, were suitable techniques allowing the assessment of cuticle structure changes as chemical properties. However, the heating program used in this context, particularly on samples of raw cuticles led

to degradation events which are not appropriate for the use of the DSC technique. Preliminary results on DSC including cooling process after the same heating program did not bring supplementary information. However, the changes of heating conditions or/and heating program could permit to obtain a better signal, which would be suitable to seek some information as the glass transition and modifications of the network materials. For now, considering the need to check the ability of measured parameters to distinguish cuticle degradation, we decided to focus the rest of the study on TGA analyses, which allowed *i*) the definition of cuticle composition, *ii*) the possibility to collect the resting mineral fraction, which was chemically analysed, and *iii*) the detection of modulations induced by the moult cycle.

3.3. Alteration of cuticle properties by acid treatment

At this step, owing to important variability between species (intra and inter-moult stage), the robustness of our method needed to be tested: is the selection of such physico-chemical analyses combined with specific measurements protocols adapted to identify evolutions during moult? To check this, we used acid treatment on the *P. serratus* cuticle. The use of acid treatment on crustacean cuticle is classically used for demineralising cuticle and separating chitin from other cuticle materials [36], [55]. Thus, such actions should be detected by studying the cuticle physicochemical properties, permitting to define the discriminative power of selected parameters in a cuticle alteration context.

Alteration of thermal properties. TGA curves representing the degradation of thermal properties by formic acid was displayed by the Fig 6. Considering the parameters observed, untreated cuticles showed four distinct events as cuticles analysed previously, displaying a similar pattern in both event temperatures and sample weight losses. Whatever the concentration tested, formic acid did not induce any alterations of the bound water evaporation, neither for event temperature nor considering weight loss (Kruskal-Wallis: *p-value* > 0.05). However, protein and chitin degradations were significantly altered by formic acid treatment. Firstly, considering the second event, event temperature occurred at higher temperature after a 10 % formic acid exposure (Kruskal-Wallis: *p-value* = 3.02×10^{-3}), then decreased at an intermediate state after a 100 % formic acid exposure. Weight loss attributed to this event increased in a concentration-dependent manner (Kruskal-Wallis: *p-value* = 2.45×10^{-4}). Chitin degradation occurred at a significant lower temperature with the highest acid concentration tested (Kruskal-Wallis: *p-value* = 1.38×10^{-2}), whereas the weight loss relative to this event

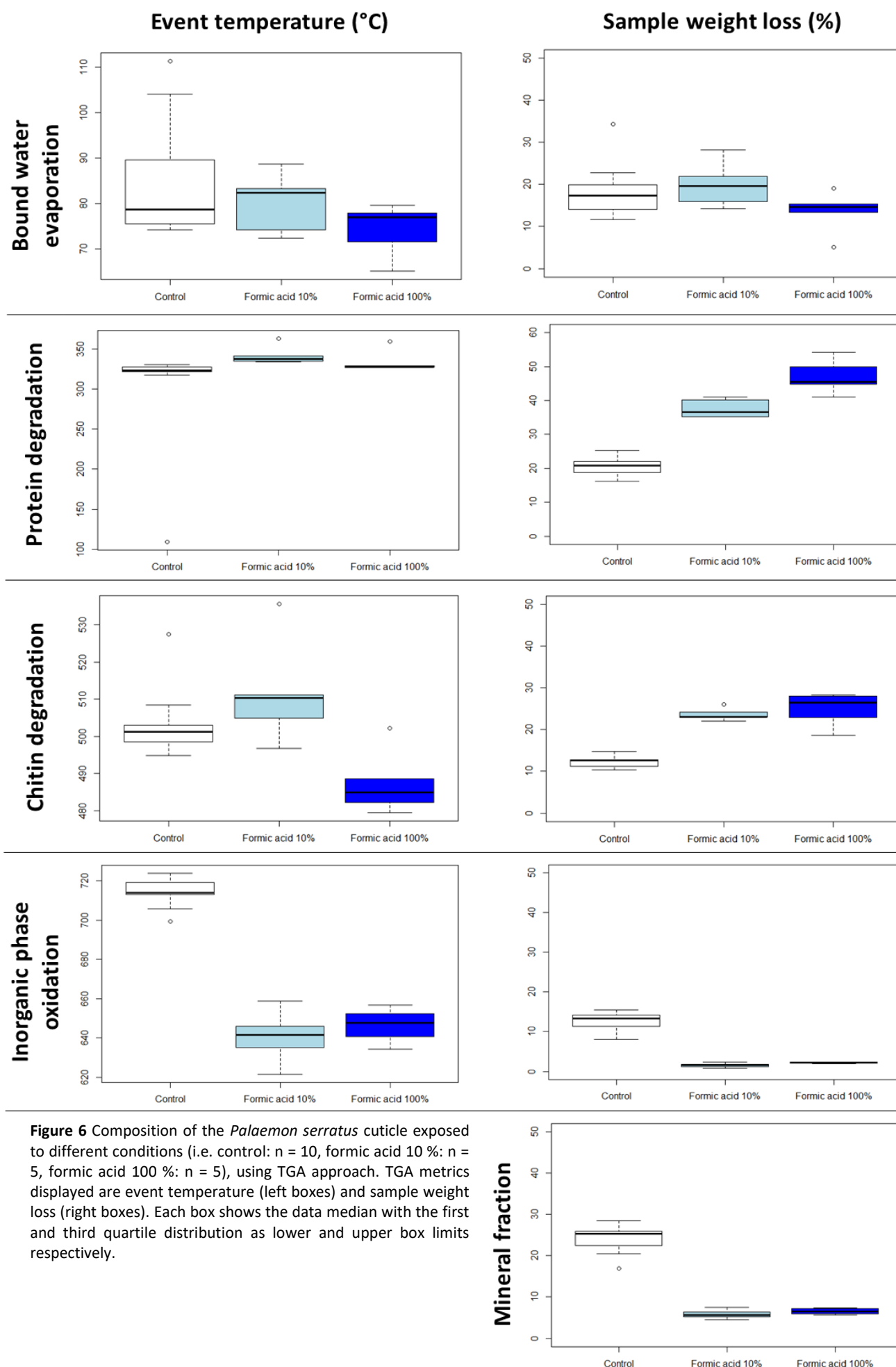
was higher after a formic acid exposure (Kruskal-Wallis: $p\text{-value} = 5.16 \times 10^{-4}$), whatever the concentration tested, with a similar weight loss between the two formic acid concentrations. These observations were consistent with the degradation role of formic acid, which altered the chitin-protein networks of the cuticle. Furthermore, acid is basically used to extract chitin from crustacean cuticle, deproteinizing this structure [54], [55]. By realising such interaction, acid may bring weaknesses in *P. serratus* cuticle organisation, causing a more fragile network which may be degraded easier, particularly in a heating process. Considering the oxidation of inorganic phase, this event occurred at a significant lower temperature when cuticle was exposed to formic acid, either at 10 or 100 % (Kruskal-Wallis: $p\text{-value} = 5.20 \times 10^{-4}$). Weight loss associated to this event displayed the same pattern than event temperature, having a significant lower weight loss by exposing cuticle to formic acid, for every concentration tested (Kruskal-Wallis: $p\text{-value} = 3.80 \times 10^{-4}$). Remaining mineral fraction was also significantly lower by being treated to formic acid (Kruskal-Wallis: $p\text{-value} = 4.73 \times 10^{-4}$). These observations may be consistent with the demineralisation role of acid, which in this case could dissolve inorganic elements before the TGA analysis was made.

Alteration of the cuticle fraction. Modifications of metal composition induced by formic acid exposures were displayed in Table 3. Metal proportion in cuticles exposed to acid treatment has, to our knowledge, never been made before. Starting with the calcium, element proportion in control cuticle displayed variabilities compared to the cuticle used for the moult cycle (control cuticles, which were in D1' moult stages: $463\ 137\ \text{mg.kg}^{-1}$; cuticles in D1' stage: $394\ 700\ \text{mg.kg}^{-1}$). Taking in account this variation, calcium proportion in exposed cuticles did not seem to be modulated. Magnesium and strontium proportions showed similar pattern, having slightly modulations in proportion induced by either variability or acid treatment. To confirm this point, same assays including a higher number of pools have to be done to assess the data variability. Considering minor elements, manganese, chromium and nickel proportions displayed a slight increase by exposing cuticles to formic acid, which has to be confirmed. However, zinc, copper and iron proportion greatly increased by formic acid exposures. These observations could be explained by the fact that iron, zinc and copper could be present in the *P. serratus* cuticle in oxide forms, thus being less affected to acid treatments than elements in basic forms as calcium or magnesium. Even if metal proportions did not seem to be affected, except minor elements, the metal content showed a significant weight loss, highlighting the fact that formic acid act by dissolving the mineral part of the cuticle with low pH, leading to an increase of element acid forms.

Alteration of surface composition. Modulation of spectra representing FTIR spectra of external and internal cuticle faces of *P. serratus* were shown in Fig 7. Considering external cuticle face, two main bands disappeared following formic acid exposure: 858 cm^{-1} and $1\,365\text{ cm}^{-1}$, which represented calcium salts and amide II of chitin. This disappearance was more important in a formic acid concentration-dependant way, which was in adequation with TGA results and by extension, to acid action on the demineralisation of inorganic phase and the degradation of chitin network. Conversely, bands at $1\,722\text{ cm}^{-1}$; $1\,625\text{ cm}^{-1}$; $1\,591\text{ cm}^{-1}$; $1\,539\text{ cm}^{-1}$ and 950 cm^{-1} , attributed to protein groups, displayed a higher intensity on an acid-treated cuticle, which was logical since protein assemblages were exposed after acid actions on minerals and chitin. Such results were already observed by Gbenebor et al. [36], who used cuticles of undetermined species specimens of crabs and shrimps, treated them with acid to produce chitin. Internal face of *P. serratus* cuticle displayed a similar pattern, with acid treatment exposing proteins, but with a less intensity. However, on this side, chitin, as well as calcium salts, seemed to be more visible at the surface with the action of formic acid (i.e. enhancement of band intensities at $1\,375\text{ cm}^{-1}$ and 790 cm^{-1} respectively). Hence, degradation of the inner part of *P. serratus* cuticle led to the exposition of a layer more mineralised and containing more chitin, probably the endocuticle. By comparing the two sides, formic acid degradation was more pronounced on the external face, whose results were also corroborated by TGA results, leading to prefer this face for assessing every alteration of cuticle surface composition.

Table 3 Proportion of major elements found with resting mineral fractions of the exposed cuticles (i.e. control: n = 10; formic acid 10 %: n = 5; formic acid 100 %: n = 5) of *Palaemon serratus*. Bold values refer to high difference compared to the control group.

Element proportion (mg.kg^{-1})	Condition		
	Control	Formic acid 10%	Formic acid 100%
Calcium	463 137	361 260	441 561
Magnesium	27 163	20 889	21 613
Strontium	4 610	4 910	5 780
Copper	12.6	437.4	251.5
Iron	24.5	241.6	268.2
Manganese	13.25	28.26	25.27
Zinc	45.5	175.7	438.2
Chromium	9.8	18.0	23.4
Nickel	1.1	3.9	4.8



3.4. Selection of relevant markers of cuticle structural properties

Physicochemical properties have been frequently used to characterise crustacean cuticles, particularly of crabs and shrimps of commercial interests, but never in a context of monitoring the cuticle structure under a stress influence. Such context involves thus the use of pertinent measured parameters allowing the well observation of any cuticle changes. Based on results previously exhibited, the following part will be used to select cuticle parameters recommendable to be monitored in a cuticle structure alteration approach.

Thermal properties. Firstly, considering the heating programs used, it appeared that DSC techniques gave same information about cuticle degradations than TGA, which was preferred in this context because this latter was more suitable for observing degradation events, displaying higher event repeatability on parameter responses. However, for both techniques, the event linked to the bound water evaporation was constant, having the same event temperature and weight loss even under moult cycle or formic acid influences. In consequence, this event was not the best to follow any cuticle structure changes but could underline the well and uniform lyophilisation of cuticle samples, which is required before parameter analyses. However, protein and chitin degradations, as well as inorganic phase oxidations and resting mineral fractions were good indicators of cuticle changes, responding to cuticle structure modifications induced by moult cycle (except sample weight loss associated to chitin degradation) and formic acid stress. These events, associated with the three main components of a basic crustacean cuticle, would be helpful in the monitoring of the composition quality of *P. serratus* cuticle.

Metal elements composing the mineral fraction. The proportion of metals forming the resting mineral phase was responsive to the moult cycle and formic acid but was better informative associated with complementary results such as the resting mass of the mineral fraction. Among metals included in *P. serratus* cuticle, even if Ca, Mg and Sr were the predominant elements, a higher response was found in minor elements such as Fe, Zn, Cu or Mn, particularly when cuticles were exposed to formic acid. This observation has to be confirmed by repeating this exposure with a higher number of cuticles.

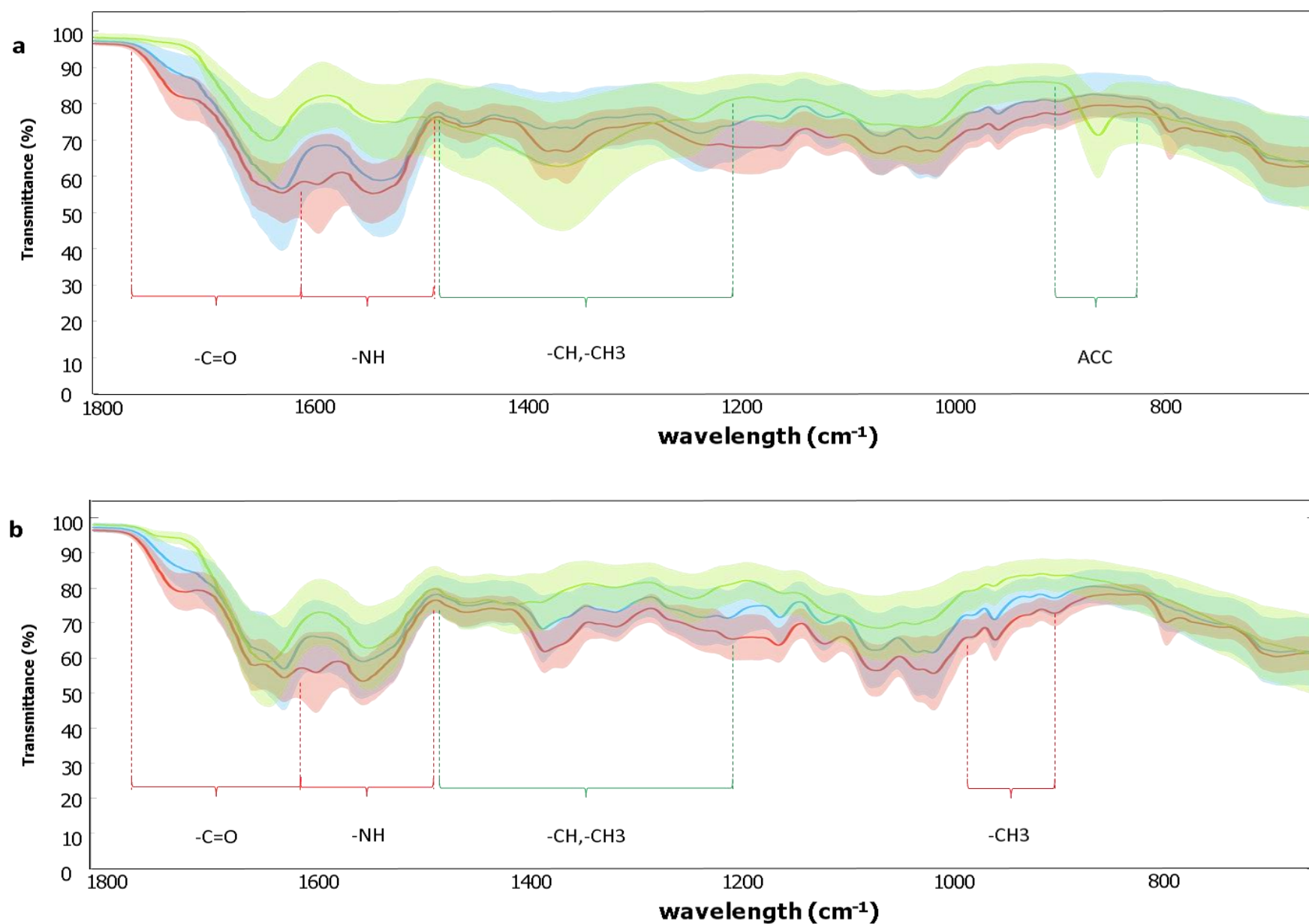


Figure 7 FTIR spectra of the external (a) and internal (b) faces of the *Palaemon serratus* cuticle, exposed to the tested conditions (control: green curve; formic acid 10 %: blue curve and formic acid 100 %: red curve). Bold curves correspond to the mean of spectrum values (control: n = 5; formic acid 10 %: n = 5; formic acid 100 %: n = 5). clouds around bold curves correspond to the standard deviation of the spectrum values of each corresponding condition. Annotations in green and red correspond to the 237 major changes of bands decreasing and increasing in intensity by cuticle formic acid exposure respectively.

Cuticle chemical surface composition. In the present study, FTIR measurements were complementary information to the TGA results, helping to determine what happened on the cuticles exposed to formic acid. However, no difference was observed on the cuticle surface composition along the moult cycle, which differed from TGA results. Thus, analysis of surface composition is interesting when the stress factor intends to change the whole cuticle structure, as it was the case for acid treatment. By comparing the two cuticle sides, the external one appeared to be more responsive to the acid treatment than internal side. Thus, cuticle external side would be more suitable to assess whole cuticle structure alterations.

Selected measured parameters, included TGA, metal proportion, and external side FTIR parameters would be used in further cuticle exposure scenarios, comprising ecotoxicological approaches, to better estimate their power to detect cuticle alterations.

4. Conclusion

The assessment of cuticle physicochemical properties, including thermal (DSC and TGA) and chemical (FTIR and ICP on mineral fraction) approaches, allowed for the first time the characterisation of the cuticle of a *Palaemonidae* prawn: *Palaemon serratus*.

Based on the measurement of parameters linked with these properties, *Palaemon serratus* cuticle has been studied in dynamical approaches leading to cuticle structure changes. Thus, for the first time in the literature, DSC, TGA and ICP detected changes in cuticle composition and organisation along the moult cycle, mainly on proteins, chitin, mineral phase contents and proportions. These changes, which were mainly localised at postmoult, were corroborated with physiological events occurring during this period. Then, by measuring parameters on acid exposed cuticles, TGA, FTIR and ICP detected the cuticle degradation induced by acid treatment. Finally, TGA, FTIR and ICP techniques were selected as good parameters to assess in a cuticle dynamical context. Owing to a heating process leading to the cuticle degradation only, DSC was not appropriate in this study and has to be tested in other conditions to bring complementary information on cuticle changes.

The use of physicochemical properties appears to be suitable to study the crustacean cuticle through dynamical context, giving a better understanding on how the cuticle structure changes occur. This new methodology of use these properties leads the possibility to assess cuticle under the influence of other factors as intrinsic, chemical or stress influences. The use

of this methodology on other crustaceans, as well as with other properties (mechanical, metal composition on the entire inorganic phase) could confirm observations on the cuticle changes obtained in this study.

Acknowledgements

This study was supported by the Research Federation CNRS 3730 Sciences Applied to the Environment (FR SCALE), the Normandie Region and the European Maritime and Fisheries Fund (action 28 “Partnerships between scientists and fishermen”; GeDuBouq project).

References

[1]

J. Olesen

The crustacean carapace—morphology, function, development, and phylogenetic history

Functional Morphology and Diversity. 1 (2013) 103.

[2]

T. Subramoniam,

Sexual biology and reproduction in crustaceans

Academic Press (2016)

[3]

D. Raabe, C. Sachs, P. Romano

The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material

Acta Materialia. 53 (2005) 4281–4292.

[4]

C. Sachs, H. Fabritius, D. Raabe

Experimental investigation of the elastic–plastic deformation of mineralized lobster cuticle by digital image correlation

Journal of Structural Biology. 155 (2006) 409–425.

[5]

F. Boßelmann, P. Romano, H. Fabritius, D. Raabe, M. Epple

The composition of the exoskeleton of two crustacea: The American lobster *Homarus americanus* and the edible crab *Cancer pagurus*

Thermochimica Acta. 463 (2007) 65–68.

[6]

F. Neues, A. Ziegler, M. Epple

The composition of the mineralized cuticle in marine and terrestrial isopods: a comparative study

CrystEngComm. 9 (2007) 1245–1251.

[7]

P. Romano, H. Fabritius, D. Raabe

The exoskeleton of the lobster *Homarus americanus* as an example of a smart anisotropic biological material

Acta Biomaterialia. 3 (2007) 301–309.

[8]

P.-Y. Chen, A.Y.-M. Lin, J. McKittrick, M.A. Meyers

Structure and mechanical properties of crab exoskeletons

Acta Biomaterialia. 4 (2008) 587–596.

[9]

C. Jeuniaux

Chitine et complexes chitino-protéiques de la cuticule

Traité de Zoologie: Insectes: Téguments, Système Nerveux, Organes Sensoriels. Tome VIII, Fascicule III. (1975) 31–44.

[10]

R. Dillaman, R. Roer, T. Shafer, S. Modla, L. Watling, M. Thiel

The crustacean integument: structure and function

The Natural History of Crustacea. 1 (2013) 140–65.

[11]

S. Modla

The effect of fixation on the morphology of the late premolt and early postmolt cuticle of the blue crab, *Callinectes sapidus*

University of North Carolina at Wilmington (2006).

[12]

Y. Bouligand

Twisted fibrous arrangements in biological materials and cholesteric mesophases

Tissue and Cell. 4 (1972) 189–217

[13]

R.F. Mary, G. Krishnan

On the nature and role of protein constituents of the cuticle of crustaceans in relation to permeability of the cuticle

Marine Biology. 25 (1974) 299–309.

[14]

D.M. Skinner, S.S. Kumari, J.J. O'brien

Proteins of the crustacean exoskeleton

American Zoologist. 32 (1992) 470–484.

[15]

P. Compère, M.-F. Jaspar-Versali, G. Goffinet

Glycoproteins from the cuticle of the Atlantic shore crab *Carcinus maenas*: I. Electrophoresis and Western-blot analysis by use of lectins

The Biological Bulletin. 202 (2002) 61–73.

[16]

H.-O. Fabritius, E.S. Karsten, K. Balasundaram, S. Hild, K. Huemer, D. Raabe

Correlation of structure, composition and local mechanical properties in the dorsal carapace of the edible crab *Cancer pagurus*

Zeitschrift Für Kristallographie-Crystalline Materials. 227 (2012) 766–776.

[17]

H.-O. Fabritius, A. Ziegler, M. Friák, S. Nikolov, J. Huber, B.H. Seidl, S. Ruangchai, F.I. Alagboso, S. Karsten, J. Lu

Functional adaptation of crustacean exoskeletal elements through structural and compositional diversity: a combined experimental and theoretical study

Bioinspiration & Biomimetics. 11 (2016) 055006.

[18]

H.R. Hepburn, I. Joffe, N. Green, K.J. Nelson

Mechanical properties of a crab shell

Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology. 50 (1975) 551-IN13.

[19]

B. Pratoomchat, P. Sawangwong, R. Guedes, M. de lurdés Reis, J. Machado

Cuticle ultrastructure changes in the crab *Scylla serrata* over the molt cycle

Journal of Experimental Zoology. 293 (2002) 414–426.

[20]

J.E. Dendinger, A. Alterman

Mechanical properties in relation to chemical constituents of postmolt cuticle of the blue crab, *Callinectes sapidus*

Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology. 75 (1983) 421–424.

[21]

D.A. Waugh, R.M. Feldmann, J.L. Burrell, A.L. Hull, K. Hein, C.E. Schweitzer

Ontogenetic variations in cuticle morphology in the blue crab *Callinectes sapidus*

Journal of Crustacean Biology. 29 (2009) 141–156.

[22]

I. Joffe, H.R. Hepburn, K.J. Nelson, N. Green

Mechanical properties of a crustacean exoskeleton

Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology. 50 (1975) 545–549.

[23]

W. Promwikorn, P. Boonyoung, P. Kirirat

Histological characterization of cuticular depositions throughout the molting cycle of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

Songklanakarin J. Sci. Technol. 27 (2005) 765–772.

[24]

F. Shahidi, J. Synowiecki

Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards

Journal of Agricultural and Food Chemistry. 39 (1991) 1527–1532.

[25]

R.H. Rødde, A. Einbu, K.M. Vårum

A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*)

Carbohydrate Polymers. 71 (2008) 388–393.

[26]

J. Hilton, D.W. Sutcliffe, T.R. Carrick, E. Rigg

Major inorganic components in some freshwater crustaceans (malacostraca), their exuviae and food items, and thermogravimetric-differential thermal analysis of organic and ash components

Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology. 77 (1984) 13–22.

[27]

J.V. Huner, H. Könönen, O.V. Lindqvist

Variation in body composition and exoskeleton mineralization as functions of the molt and reproductive cycles of the noble crayfish, *Astacus astacus* L.(Decapoda, Astacidae), from a pond in central Finland

Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology. 96 (1990) 235–240.

[28]

Y. Wang, Y. Chang, L. Yu, C. Zhang, X. Xu, Y. Xue, Z. Li, C. Xue

Crystalline structure and thermal property characterization of chitin from Antarctic krill (*Euphausia superba*)

Carbohydrate Polymers. 92 (2013) 90–97.

[29]

Y. Peng, W. Ji, D. Zhang, H. Ji, S. Liu

Composition and content analysis of fluoride in inorganic salts of the integument of Antarctic krill (*Euphausia superba*)

Scientific Reports. 9 (2019) 1–6.

[30]

A. Becker, A. Ziegler, M. Eppler

The mineral phase in the cuticles of two species of Crustacea consists of magnesium calcite, amorphous calcium carbonate, and amorphous calcium phosphate

Dalton Transactions. (2005) 1814–1820.

[31]

I.D. Gharagozlou-van Ginneken, Y. Bouligand

Studies on the fine structure of the cuticle of *Porcellidium*, Crustacea Copepoda

Cell and Tissue Research. 159 (1975) 399–412.

[32]

J.S. Park

Ultrastructural Changes in the Cuticle of *Palaemon serrifer* (Palaemonidae, Crustacea) during the Intermolt Cycle

Fisheries and Aquatic Sciences. 2 (1999) 78–84.

[33]

B. Pratoomchat, P. Sawangwong, P. Pakkong, J. Machado

Organic and inorganic compound variations in haemolymph, epidermal tissue and cuticle over the molt cycle in *Scylla serrata* (Decapoda)

Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 131 (2002) 243–255.

[34]

W.-N. Wang, A.-L. Wang, D.-M. Wang, L.-P. Wang, Y. Liu, R.-Y. Sun

Calcium, phosphorus and adenylate levels and Na⁺–K⁺–ATPase activities of prawn, *Macrobrachium nipponense*, during the moult cycle

Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 134 (2003) 297–305.

[35]

M.N. Wilder, S. Jasmani, V. Jayasankar, T. Kaneko, K. Aida, T. Hatta, S. Nemoto, A. Wigginton

Hemolymph osmolality, ion concentrations and calcium in the structural organization of the cuticle of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: changes with the molt cycle

Aquaculture. 292 (2009) 104–110.

[36]

O.P. Gbenebor, S.O. Adeosun, G.I. Lawal, S. Jun

Role of CaCO₃ in the physicochemical properties of crustacean-sourced structural polysaccharides

Materials Chemistry and Physics. 184 (2016) 203–209.

[37]

O.P. Gbenebor, E.I. Akpan, S.O. Adeosun

Thermal, structural and acetylation behavior of snail and periwinkle shells chitin

Progress in Biomaterials. 6 (2017) 97–111.

[38]

T.T. Dang, F. Jessen, H.J. Martens, N. Gringer, K. Olsen, N. Bøknæs, V. Orlien

Proteomic and microscopic approaches in understanding mechanisms of shell-loosening of shrimp (*Pandalus borealis*) induced by high pressure and protease

Food Chemistry. 289 (2019) 729–738.

[39]

A. Campillo

Contribution a l'étude de l'élevage de la crevette rose *Palaemon serratus* (Pennant) en captivité.

Revue Des Travaux de l'Institut Des Pêches Maritimes. 39 (1975) 381–393.

[40]

G.S. Anderson

Species profiles: Life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Gulf of Mexico): Grass shrimp

The Service, 1985.

[41]

J. Haig, N.M. Ryan, K.F. Williams, M.J. Kaiser

A review of the *Palaemon serratus* fishery: biology, ecology and management, Fisheries and Conservation Report

Bangor: Bangor University. (2014).

[42]

A. Erraud, M. Bonnard, A. Duflot, A. Geffard, J.-M. Danger, J. Forget-Leray, B. Xuereb

Assessment of sperm quality in palaemonid prawns using Comet assay: methodological optimization

Environmental Science and Pollution Research. 25 (2018) 11226–11237.

[43]

A. Erraud, M. Bonnard, A. Chaumot, O. Geffard, A. Duflot, J. Forget-Leray, F. Le Foll, A. Geffard, B. Xuereb

Use of sperm DNA integrity as a marker for exposure to contamination in *Palaemon serratus* (Pennant 1777): Intrinsic variability, baseline level and in situ deployment

Water Research. 132 (2018) 124–134.

[44]

A. Erraud, M. Bonnard, O. Geffard, R. Coulaud, A. Poret, A. Duflot, J. Forget-Leray, A. Geffard, B. Xuereb

Signification of DNA integrity in sperm of *Palaemon serratus* (Pennant 1777): Kinetic responses and reproduction impairment

Marine Environmental Research. 144 (2019) 130–140.

[45]

P. Drach

Mue et cycle d’intermue chez les Crustacés Décapodes

Ann. Inst. Oceanogr. Monaco. 19 (1939) 103–391.

[46]

P. Drach, C. Tchernigovtzeff

Sur la méthode de détermination des stades d’intermue et son application générale aux crustacés

Vie et Milieu. (1967) 595–610.

[47]

K.-D. Spindler, A. Van Wormhoudt, D. Sellos, M. Spindler-Barth

Ecdysteroid levels during embryogenesis in the shrimp, *Palaemon serratus* (Crustacea Decapoda): Quantitative and qualitative changes

General and Comparative Endocrinology. 66 (1987) 116–122.

[48]

M. Spindler-Barth, A. Van Wormhoudt, K.-D. Spindler

Chitinolytic enzymes in the integument and midgut-gland of the shrimp *Palaemon serratus* during the moulting cycle

Marine Biology. 106 (1990) 49–52

[49]

M. Rollin, R. Coulaud, B. Rocher, A. Duflot, A. Poret, F. Le Foll, B. Xuereb

N-acetyl- β -d-glucosaminidase activity in *Palaemon serratus*-Methodological optimisation and intrinsic variability

Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 256 (2021) 110932.

[50]

R Core Team, 2018

R: A Language and Environment for Statistical Computing

R Foundation for Statistical Computing, Vienna (2018), <https://www.R-project.org>

[51]

F. Zhou, Z. Wu, M. Wang, K. Chen

Structure and mechanical properties of pincers of lobster (*Procambarus clarkii*) and crab (*Eriocheir Sinensis*)

Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. 3 (2010) 454–463.

[52]

B.A. Juárez-De La Rosa, J. May-Crespo, P. Quintana-Owen, W.S. González-Gómez, J.M. Yañez-Limón, J.J. Alvarado-Gil

Thermal analysis and structural characterization of chitinous exoskeleton from two marine invertebrates

Thermochimica Acta. 610 (2015) 16–22.

[53]

F.S. Kittur, K.V. Harish Prashanth, K. Udaya Sankar, R.N. Tharanathan

Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry

Carbohydrate Polymers. 49 (2002) 185-193

[54]

W.-C. Huang, D. Zhao, N. Guo, C. Xue, X. Mao

Green and facile production of chitin from crustacean shells using a natural deep eutectic solvent

Journal of Agricultural and Food Chemistry. 66 (2018) 11897–11901.

[55]

D. Zhao, W.-C. Huang, N. Guo, S. Zhang, C. Xue, X. Mao

Two-step separation of chitin from shrimp shells using citric acid and deep eutectic solvents with the assistance of microwave

Polymers. 11 (2019) 409.

[56]

K. Pütz, F. Buchholz

Comparative ultrastructure of the cuticle of some pelagic, nekto-benthic and benthic malacostracan crustaceans

Marine Biology. 110 (1991) 49-58

[57]

J.R. Dodd

Magnesium and strontium in calcareous skeletons: a review

Journal of Paleontology. (1967) 1313–1329.

[58]

E.I. Adeyeye, H.O. Adubiaro, O.J. Awodola

Comparability of chemical composition and functional properties of shell and flesh of *Penaeus notabilis*

Pak. J. Nutr., (2008), 7, 6, 741-747.

[59]

H.M. Ibrahim, M.F. Salama, H.A. El-Banna

Shrimp's waste: Chemical composition, nutritional value and utilization

Food/Nahrung. 43 (1999) 418–423.

[60]

E.I. Adeyeye, H.O. Adubiaro

Chemical composition of shell and flesh of three prawn samples from Lagos lagoon

Journal of the Science of Food and Agriculture. 84 (2004) 411–414.

[61]

B.A. Stankiewicz, M. Mastalerz, C.H. Hof, A. Bierstedt, M.B. Flannery, D.E. Briggs, R.P. Evershed

Biodegradation of the chitin-protein complex in crustacean cuticle

Organic Geochemistry. 28 (1998) 67–76.

[62]

A. Shechter, A. Berman, A. Singer, A. Freiman, M. Grinstein, J. Erez, E.D. Aflalo, A. Sagi

Reciprocal Changes in Calcification of the Gastrolith and Cuticle During the Molt Cycle of the Red Claw Crayfish *Cherax quadricarinatus*

The Biological Bulletin. 214 (2008) 122–134.

[63]

S. Raz, O. Testeniere, A. Hecker, S. Weiner, G. Luquet

Stable Amorphous Calcium Carbonate Is the Main Component of the Calcium Storage Structures of the Crustacean *Orchestia cavimana*

The Biological Bulletin. 203 (2002) 269–274.

[64]

J. Tao

Chapter Twenty-Two - FTIR and Raman Studies of Structure and Bonding in Mineral and Organic–Mineral Composites, in: J.J. De Yoreo (Ed.), Methods in Enzymology

Academic Press, (2013) pp. 533–556.

[65]

R.A.A. Muzzarelli, P. Morganti, G. Morganti, P. Palombo, M. Palombo, G. Biagini, M. Mattioli Belmonte, F. Giantomassi, F. Orlandi, C. Muzzarelli

Chitin nanofibrils/chitosan glycolate composites as wound medicaments

Carbohydrate Polymers. 70 (2007) 274–284.

[66]

M. Kaya, T. Baran, A. Mentés, M. Asaroglu, G. Sezen, K.O. Tozak

Extraction and Characterization of α -Chitin and Chitosan from Six Different Aquatic Invertebrates

Food Biophysics. 9 (2014) 145–157.

[67]

R. Chandran, L. Williams, A. Hung, K. Nowlin, D. LaJeunesse

SEM characterization of anatomical variation in chitin organization in insect and arthropod cuticles

Micron. 82 (2016) 74–85.

[68]

C.-S. Shin, D.-Y. Kim, W.-S. Shin

Characterization of chitosan extracted from Mealworm Beetle (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*) and Rhinoceros Beetle (*Allomyrina dichotoma*) and their antibacterial activities

International Journal of Biological Macromolecules. 125 (2019) 72–77.

[69]

D.A. Vigh, J.E. Dendinger

Temporal relationships of postmolt deposition of calcium, magnesium, chitin and protein in the cuticle of the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun

Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology. 72 (1982) 365–369.

[70]

D.S. Neufeld, J.N. Cameron

Postmoult uptake of calcium by the blue crab (*Callinectes sapidus*) in water of low salinity

Journal of Experimental Biology. 171 (1992) 283–299.

[71]

S. Calhoun, E. Zou

Epidermal carbonic anhydrase activity and exoskeletal metal content during the molting cycle of the blue crab, *Callinectes sapidus*

Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology. 325 (2016) 200–208.

[72]

R. Roer, R. Dillaman

The structure and calcification of the crustacean cuticle

American Zoologist. 24 (1984) 893–909.

[73]

S. Hild, F. Neues, N. Žnidaršič, J. Štrus, M. Eppler, O. Marti, A. Ziegler

Ultrastructure and mineral distribution in the tergal cuticle of the terrestrial isopod *Titanethes albus*. Adaptations to a karst cave biotope

Journal of Structural Biology. 168 (2009) 426–436.

[74]

G. Luquet

Biom mineralizations: insights and prospects from crustaceans

Zookeys. (2012) 103.

[75]

S.T. Mergelsberg, R.N. Ulrich, S. Xiao, P.M. Dove

Composition systematics in the exoskeleton of the American lobster, *Homarus americanus* and implications for Malacostraca

Frontiers in Earth Science. 7 (2019) 69.

[76]

M. Katsikini, E. Proiou, N. Vouroutzis, F. Pinakidou, E.C. Paloura, D. Smirnov, M. Brzhezinskaya, S. Ves

Crystalline and amorphous calcium carbonate as structural components of the *Calappa granulata* exoskeleton

Journal of Structural Biology. 211 (2020) 107557.

[77]

J.R. Stevenson, D.E. Bliss, L.H. Mantel

Dynamics of the integument

The Biology of Crustacea. 9 (1985) 1–42.

[78]

J. Štrus, P. Compere

Ultrastructural analysis of the integument during the moult cycle in *Ligia italica* (Crustacea, Isopoda)

Pflugers Arch. 431 (1996) R251–R252.

VI. Application et pertinence des marqueurs de mue sous influence de stress chimiques

Ce chapitre regroupe les différents travaux menés concernant la mise en application des propriétés cuticulaires et de l'activité NAGase en tant que potentiels outils capables de détecter la présence d'altération dans le processus de mue. Pour cela, différentes expérimentations ont été menées chez le modèle *Palaemon serratus* afin d'estimer la sensibilité des marqueurs, tant en conditions contrôlées de laboratoire que lors de collectes d'individus *in natura*.

La première partie de ce chapitre se focalise sur la réponse des marqueurs de mue à la suite d'une exposition *in vivo* de crevettes bouquet à deux types de contaminants connus pour leur capacité à perturber le processus de mue : le cadmium et la pentoxifylline. Cette partie est constituée d'une publication :

Publication n°4 : Moulting responses of Palaemon serratus (Crustacea: Palaemonidae) exposed during one moult cycle to cadmium and pentoxifylline.

Le second paragraphe illustre l'application *in situ* des marqueurs de mue, à travers une campagne de prélèvement réalisée le long du littoral de baie de Seine en 2019. Cette partie exploratoire est constituée d'une note :

Note 1 : Etude de l'activité de la N-acétyl-β-D-Glucosaminidase et des propriétés structurales de la cuticule chez des spécimens de Palaemon serratus prélevés en baie de Seine.

6.1. Sensibilité en conditions contrôlées

Publication n° 4 :

Moult responses of *Palaemon serratus* (Crustacea: Palaemonidae) exposed during one moult cycle to cadmium and pentoxifylline.

Marc Rollin, Romain Coulaud, Céline Picard, Aurélie Duflot, Agnès Poret, Vincent Loisel, Odile Dedourge-Geffard, Nicolas Hucher, Frank Le Foll, Benoit Xuereb.

Résumé

Chez les crustacés, la mue est un trait de vie crucial mis en place par un mécanisme de régulation moléculaire complexe, soupçonné d'être sensible à une large gamme de polluants. En raison de leur position en aval des mécanismes régulateurs, l'activité de la N-acétyl- β -D-Glucosaminidase (NAGase) et les propriétés structurales de la cuticule sont des candidats intéressants dans l'évaluation de l'altération de la mue par l'action des contaminants. Dans ce contexte, la présente étude s'est focalisée sur la capacité de ces marqueurs à détecter de potentielles altérations de mue chez la crevette marine *Palaemon serratus*, dont les individus ont été exposés durant plus d'un cycle de mue à du cadmium (Cd) et de la pentoxifylline (Px) à une concentration respective de 56,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et de 27,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respectivement. Ces composés chimiques ont été sélectionnés pour leur capacité à altérer les cibles moléculaires impliquées dans le processus de mue. Pour cela, les spécimens mâles *P. serratus* ont été synchronisés selon les stades de mue D1'-D1'' au début de l'expérience et ont été arrêtés au stade D2 suivant (*i.e.* entraînant des variations de temps d'exposition entre les différents organismes). Durant cette période, la mortalité et le temps de mue ont été reportés. L'eau d'exposition a été renouvelée tous les deux jours, en échantillonnant une fraction de celle-ci pour mesurer les concentrations effectives de Cd et Px. A la fin de l'exposition, les marqueurs de mue ainsi que l'accumulation de Cd et Px dans les crevettes ont été mesurés. Ainsi, après $21,4 \pm 0,5$ jours, un taux de survie de 70-73 % a été calculé quelle que soit la condition d'exposition. En ce qui concerne l'accumulation des composés dans les crevettes, si Px n'est pas apparue comme s'accumulant dans les organismes, Cd a été retrouvé dans les tissus abdominaux à une concentration plus élevée que dans le milieu (*i.e.* avec facteur de bioconcentration estimé à 5,47 L.kg^{-1} de poids frais). De plus, l'exposition au Cd a entraîné une augmentation de proportion de Cd dans la cuticule des crevettes (*i.e.* équivalent à 181 fois les niveaux de la proportion retrouvée dans les individus « contrôle »). La présence de Cd dans les crevettes a également augmenté la proportion d'autres éléments métalliques mineurs dans la cuticule, ainsi que perturber

l'organisation de la structure cuticulaire, particulièrement au niveau du réseau protéique. Cependant, à la suite de l'exposition de Cd et Px, aucuns effets ont été détectés sur l'activité de la NAGase, ni sur le temps de mue.

Mots-clés : altération de la mue ; NAGase ; *Palaemon* ; cadmium ; propriétés structurales de la cuticule ; pentoxifylline

Publication en préparation pour *Aquatic toxicology*

Moult responses of *Palaemon serratus* (Crustacea: Palaemonidae) exposed during one moult cycle to cadmium and pentoxifylline.

Marc Rollin¹, Romain Coulaud¹, Céline Picard², Aurélie Duflot¹, Agnes Poret¹, Vincent Loisel², Odile Debourg-Geffard³, Nicolas Hucher², Frank Le Foll¹, Benoit Xuereb^{1*}

¹ Normandie Univ, UNIHAVRE, UMR-I 02 SEBIO, FR CNRS 3730 SCALE, 76600 Le Havre, France

² UNIHAVRE, FR 3038 CNRS, URCOM, Normandie Univ., Le Havre 76600, France.

³ Université Reims Champagne Ardenne, UMR-I 02 SEBIO, 51100 Reims, France.

* Corresponding author

Email: benoit.xuereb@univ-lehavre.fr

Tel: +33 2 32 85 99 11 ; fax : +33 2 32 74 45 05

Abstract

For Crustaceans, moult is a crucial life trait ensured by a complex molecular regulation mechanism which were suspected to be sensitive to a wide range of pollutants. Owe to their position downstream to the mechanisms of moult process achievement, N-acetyl- β -D-Glucosaminidase: NAGase activity and cuticle structure properties may be interesting for assessing moulting alterations by pollutant actions. In this context, the present study focused on the ability of these markers to detect potential moult alterations on the marine prawn *Palaemon serratus*, exposed over one moult cycle to cadmium (Cd) and pentoxifylline (Px) at a concentration of 56.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 27.8 mg.L^{-1} respectively. These compounds have been selected for their ability to alter molecular targets involved in the moulting process. To do this, male specimens of *P. serratus* were synchronised in moult stages D1'-D1'' at the beginning of the experiment and stopped at the next D2 stage (i.e. leading to variation of exposure time between organisms). During this period, mortality, and moult duration were recorded. Water was renewed every two days, with water samples collected to measure Cd and Px effective concentrations. At the end of the exposure, moult markers (i.e. NAGase activity, cuticle structure properties) as well as accumulation of Cd and Px in prawns have been assessed. After 21.4 ± 0.5 days, similar prawn survival rate of 70-73 % were found on control, Cd and Px. Considering the bioconcentration of compounds, if Px did not appear to be accumulated in prawns, Cd was retrieved in abdominal tissues at higher concentrations than in medium (i.e. with a calculated bioconcentration factor of 5.47 L.kg^{-1} wet weight). Furthermore, Cd exposure led to an increase of Cd proportion in cuticle (i.e. 181 fold compared to the control). The presence of Cd in prawns increased the proportion of other minor metals in cuticle, as well as disturbing cuticle structure organisation, particularly on protein-chitin network. However, for both Cd and Px, no effects were detected on NAGase activity, nor on moult duration.

1. Introduction

Moult is a physiological process allowing the temporary liberation of confined organisms such as crustaceans, achieved by the shedding of their rigid exoskeleton, the cuticle. This short liberation, occurring before the cuticle renewal, is crucial for the crustacean development, since this process is associated with the metamorphosis success of early stages, as well as growth, and for many species with reproduction (Subramoniam, 2016). The succession of cuticle synthesis and degradation forms the crustacean moult cycle, which is

classically subdivided into four main phases (Drach, 1939; Drach & Tchernigovtzeff, 1967). The beginning of each moult cycle starts with the ecdysis of the old cuticle. Then, after ecdysis starts the post-moult period, where the neo-cuticle formed is soft and progressively stiffen in some days to fulfil its protection role. Once the cuticle is fully mineralised and tanned, the following period named intermoult is characterised by its physiological stability. The pre-moult is marked by the degradation of the old cuticle, starting with apolysis (i.e. separation between epidermis and endocuticle by the action of the moulting fluid), and by the synthesis of a neo-cuticle, leading progressively to a new ecdysis. Such successions of macroscopical events need the well and precise realisation of complex molecular actions to guarantee a well moulting process. These mechanisms, as well as the molecular actors involved in the moulting regulation, have become more and more documented (Zou, 2005; LeBlanc, 2007; Chang & Mykles, 2011; Song et al. 2017).

In parallel of the increasing knowledge about molecular moulting process, impacts of xenobiotics on crustacean moulting have also become well-documented. In a recent review, Zou (2020) identified about 32 chemicals which were able to disrupt the crustacean moulting process. Among moulting disruption effects, individual descriptions as the number of moults, moulting delays and moulting success were one of the most frequently observations described. These individual moult markers were the first used to show the ability of xenobiotics to disturb the crustacean moulting process (Weis et al. 1992; Mckenney, 2005; Hosamani et al. 2017). They are relevant considering the fitness effects and are quite easy to be monitored within laboratory-controlled bioassay conditions, needing no specific devices. However, if individual responses are very integrative, they cannot easily discriminate direct disturbances of molecular targets involved in the moult regulation, indirect moult alteration linked with a modification of organism energy budget, or even life traits drifts linked to natural variations of environmental factors. Otherwise, the monitoring of such individual responses *in natura* requires the deployment of *in situ* bioassay methodologies, authorizing the calibration of exposed specimens and the control of exposure time, as propose by Chaumot et al. (2020) in *Gammarus fossarum*. Such methodologies are still relatively scarce. In this way, the development of sub-individual markers linked to moulting regulation offers an interesting approach to complete individual responses since they are more likely to identify the mechanisms of moult impairment and are potentially more easily applicable in natural populations (i.e. outside a bioassay methodological context).

In the literature, authors investigated moult disruption on molecular markers by focusing mainly targets involved in the moulting regulation. Among these, targets associated with ecdysteroids have been the most studied. Ecdysteroids family, particularly represented by 20-Hydroecdysone (20-HE), constitutes the moulting hormones triggering the old cuticle degradation, synthesis of the neo-cuticle and other crucial functions linked with moulting process (Song et al. 2017). In consequence, owe to the crucial roles of these hormones, ecdysteroid syntheses and signalling in crustaceans have been recognised as interesting markers for the detection of moulting disturbances (Soin et al. 2009). Furthermore, these markers were also proved to be sensitive to a wide range of xenobiotics (review Zou, 2005; Soin et al. 2009). However, measuring these markers alone does not allow to know the consequences of such disturbances on the organism physiology nor on the moult cycle achievement. To fill the gap between molecular and individual scale observations, a complementary approach to diagnose moult disturbance could consist of monitoring sub-individual responses localised downstream to the regulation process, which could be both more integrative of potential disturbances occurring during the molecular activation cascades of moult process, and more informative regarding physiological effects for the organisms.

Among targets concerned, the activity of N-Acetyl- β -Glucosaminidase (NAGase) has been well documented in the literature. Combined with chitinase, this enzyme is involved in the degradation of the old cuticle during the premoult (Jeuniaux, 1975; Gooday, 1990). Its action occurs downstream to the moult hormonal regulation system, making a bridge between this molecular regulation and physiological events observed macroscopically on the cuticle. Furthermore, the NAGase activity is easy to monitor, using a specific substrate. For these reasons, the NAGase activity has appeared as interesting marker to monitor the moult alteration by xenobiotics. The NAGase activity thus was used during *in vivo* bioassays performed on crustaceans, in controlled conditions, and it was showed to be sensitive to a wide range of xenobiotics such as heavy metals (cadmium: Luo et al. 2015; Mesquita et al. 2015), organic solvents (4-octyphenol: Zou & Fingerman, 1999a), PBDE and PCBs (Zou & Fingerman, 1999a,b; Gismondi & Thomé, 2014), pesticides (Zou & Fingerman, 1999a; Williams, 2012; Lafontaine et al. 2016; Qi et al. 2018; De Melo et al. 2020), plasticisers (Zou & Fingerman, 1999b), PAHs (Zou, 2009) and pharmaceuticals (oestrogen compounds: Zou & Fingerman, 1999a; antidepressants: Richards et al. 2008; Mesquita et al. 2011; anticonvulsant: Chen et al. 2019). The crustacean NAGase activity was also proved to be altered by *in vitro* exposure involving heavy metals (mercury: Lin et al. 2005; Pan et al. 2006a; cadmium: Lin et al. 2005;

Yang et al. 2006), organic solvents (ethanol: Wang et al. 2004; DMSO: Pan et al. 2006b; dioxane: Xie & Chen, 2004) antibiotics (Yan et al. 2007; Du et al. 2008) and disinfectants (Xie et al. 2009).

Otherwise, the study of the cuticle physicochemical properties are inherent to cuticle structure, depending to the well realisation of the moult regulation. They allow the cuticle to ensure its role protection of the organism as well as other important physiological functions (e.g. respiration, locomotion, reproduction: Olesen, 2013). Among the properties linked with the cuticle structure, thermal and chemical ones have been used to define the composition and organisation of some crustacean cuticles, as Brachyuras (*Scylla serrata*: Pratoomchat et al. 2002; Cancer pagurus: Fabritius et al. 2012) Penaeidae (*Penaeus monodon*: Promwikorn et al. 2005; *Pandalus borealis*: Shahidi & Synowiecki, 1991, Rodde et al. 2008), Astacidae (*Homarus americanus*: Romano et al. 2007; *Astacus astacus*: Hilton et al. 1984, Huner et al. 1990), Euphausiidae (*Euphausia superba*: Wang et al. 2013, Peng et al. 2019), Peracaridas (*Gammarus lacustris*: Hilton et al. 1984; woodlouses: Becker et al, 2005; Neues et al. 2007; *Procellidium* spp.: Gharagozlou-Van Ginneken & Bouligand, 1975), and non-specified shrimps (Gbenebor et al. 2016, Gbenebor et al. 2017; Huang et al. 2018; Zhao et al. 2019). In parallel, during material extractions from the cuticle, thermal and chemical properties of this structure appeared to be sensitive to acid treatment (Gbenebor et al. 2016; Zhao et al. 2019), alkaline treatment (Romano et al. 2007; Gbenebor et al. 2017), solvent action (Zhao et al. 2019) EDTA action (Romano et al. 2007) and protease action (Dang et al. 2019). Despite these observations, cuticle physicochemical properties have never been assessed in a toxicological context. These properties, more particularly their sensitivity in response to a pollutant exposure, remain interesting to assess.

Among crustaceans, the caridean prawn *Palaemon serratus* (Pennant 1777) is an interesting model for ecotoxicology investigations. This marine species is widely distributed all around the European coasts (Campillo, 1975), where it is present all along the year and can be found in high density as function of the season. This prawn plays a key role in trophic chains, being a prey of interest for many fishes and other crustaceans (Anderson, 1985). Specimens are relatively easy to collect and maintain under laboratory conditions, and their deployment *in situ* within caging systems is practicable. Furthermore, *P. serratus*, as other Palaemonidae species, has been used as a suitable species in ecotoxicological and ecological approaches (Guerao & Ribera, 2000; Key et al. 2006; Gonzalez-Ortegón et al. 2015; Erraud et al. 2018a,b).

Recently, preliminary studies were performed in *P. serratus* (1) to develop methodologies of the NAGase activity measurement and the characterisation of cuticular structural properties, and (2) to appreciate their modulations occurring throughout the moult cycle (Rollin et al. 2021; Article 2). The aim of the present study was to measure the effects of two contaminants suspected to disturb the moult process on these both moult-related sub-individual responses in *P. serratus* and appreciate the potential of these ones to detect disturbances. For this purpose, male specimens of *P. serratus* have been exposed either to cadmium (Cd) or pentoxifylline (Px) over one moult cycle - i.e. from the premoult to the next premoult. In parallel with the measurement of NAGase activity and the characterization of cuticle physicochemical properties, survival, moulting time, condition indexes and energetic reserves were recorded to follow the global prawn conditions. Cd was selected as model contaminant for this study since, as other heavy metals, it is commonly found to be an endocrine disruptor, including on the crustacean moulting throughout many disturbance ways. At individual scale, Cd was showed to decrease the rate of moulting of the brachyura *Chasmagnathus granulata* (Moreno et al. 2003). At sub-individual level, Cd was reported to disturb the ecdysteroid production Y-organ (i.e. moult gland) in amphipods (Abidi et al. 2016), as well as chitinolytic enzyme activities of brachyurans exposed *in vivo* (i.e. chitinase: Luo et al. 2015; NAGase: Luo et al. 2015 and Mesquita et al. 2015). Cd is also known to be competitive with calcium – i.e. the main inorganic element found in crustacean cuticle - and *in fine* suspected to alter the cuticle properties (Rainbow, 1997). In other way, Px can't be considered as an environmental contaminant, but this methylxanthine-based drug is particularly interesting in this context since it has been showed to inhibit several chitinase families (Rao et al. 2005; Cohen, 2010; Tsirilakis et al. 2012). Being mostly used to inhibit bacteria and yeast chitinases, Px has been also demonstrated to alter chitinolytic enzyme activities of the isoptera *Reticulitermes flavipes*, by both *in vivo* and *in vitro* exposures (Husen & Kamble, 2013; Husen et al. 2015). Considering crustaceans, *in vitro* assays showed a same pattern of NAGase activity inhibition assessed on the Palaemonid prawn *Palaemon serratus* (Rollin, unpublished data).

2. Materials and methods

2.1. Prawn sampling

At the end of January 2020, male specimens of *Palaemon serratus* were bought to a professional fisherman of Le Havre (DYFLO), who captured prawns with specific traps in the 2-nautical mile zone of the Cap of La Hève (Le Havre, Normandy, France). Once bought, prawns were transferred to the laboratory within the hour in 30-L polypropylene tanks filled with Seawater (SW, 30 ‰; 19 ± 1 °C) coming from thalassotherapy Centre of Deauville (Normandy, France). Then, prawns were transferred into 80 L-aquariums that were supplied with SW, under both constant aeration and filtration. Temperature and a photoperiod were fixed at 19 ± 1 °C and 16/8 light/dark, respectively, and a maximum density of one prawn per litre was respected. Specimens were daily fed with shrimp pellets (Vanna starter, Le Gouessant®) until their use for the exposure assay, which occurred in less than a week after their introducing into laboratory.

2.2. Chemicals

Cadmium (Cd; CdCl_2) and pentoxifylline (Px) were purchased from Merck/ Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). All chemicals used were of the highest purity grade commercially available.

2.3. In vivo exposure assay

Three conditions were tested – i.e. an uncontaminated SW control, a chloride cadmium exposure condition at a nominal concentration of $0.5 \mu\text{mol. L}^{-1}$, and a pentoxifylline exposure condition at a nominal concentration of $100 \mu\text{mol. L}^{-1}$ (respectively $91.7 \mu\text{g.L}^{-1}$ CdCl_2 or $56.2 \mu\text{g.L}^{-1}$ Cd and 27.8 mg.L^{-1}). Exposures were performed in 2 L-Beakers supplied with 1 L of medium. The mediums were maintained in constant aeration, with a photoperiod of 16/8 light/dark, and renewed every two days. To prevent the contaminant loss by adsorption on vessel surface, propylene beakers were used for cadmium and control conditions, whereas glass beakers were used for pentoxifylline. Contaminated mediums were obtained by adding of 1 mL of cadmium chloride or pentoxifylline stock solutions (i.e. 0.5 and 100 mmol.L⁻¹ in deionised water, respectively) to 1 L of SW. In the same way, vessels were acclimatized with the respective exposure mediums, one week before the exposure start. In order to check the

compliance with nominal concentrations, samples of water were randomly performed in two Beakers per condition during exposure, before and after renewing of mediums. The samples were filtered (0.22 µm), pooled (i.e. 125 mL per beaker, $n = 4$ beakers per condition) and stored at 4 °C, in adapted amber vessels (i.e. propylene or glass) until analyses.

The day before the exposure start, prawns were gendered, sized, weighted, and sorted according to their moult stages. The moult stages were determined according the setogenesis progress (Erraud *et al.* 2018), by *in toto* microscopic observation of uropods rime to minimise the organisms stress. Indeed, this non-invasive procedure (i.e. requiring no appendices cutting) was performed in less than 1 min per specimen. *In fine*, only the male specimens with a total body length ranges from 5 to 7 cm and synchronised in D1'-D1'' premoult stages (i.e. the predominant stage within prawn collection) were kept for experiment. At this step, 10 selected prawns were immediately euthanized and dissected as described below to serve as exposure control (T0). At the exposure start, 2 specimens (i.e. one in D1' and the other in D1'' moult stages) were distributed per beakers for $n = 10$ and 20 in SW control and contaminated conditions, respectively. Daily, prawns were fed with shrimp pellets (Vanna starter, Le Gouessant®) and mortality was checked. Moult stages were regularly monitored according to the device previously described and the dates of exuviation were recorded. The exposure was stopped when prawns reached the D2 stage at the end of the second premoult period. Exposure duration was 21.4 ± 0.5 days (with a minimum and a maximum of 16.2 ± 0.5 25.7 ± 0.9 days respectively). At the end of exposure, 10 prawns per condition were euthanized on ice, measured, and weighted, then dissected. Briefly, hepatopancreas, uropods and muscle of the last abdominal segment were sampled, weighted, immediately snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until analyses of energy reserve contents and NAGase activity (see section 2.4 and 2.5). Abdominal cuticle was separated from epidermis, and individually stored into microtubes filled with filtered SW at 4 °C. In a < 24 h-period, cuticles were lyophilized during 2 h and stored at -20 °C until analyses of cuticular properties (see section 2.6). The rest of abdominal muscles were pooled per condition and stored at -20 °C for dosages of cadmium and pentoxifylline bioaccumulation.

2.4. Condition index and energetic reserves

Based on the weight and the seize measured, the condition of the prawns was evaluated using the Fulton coefficient K, calculated with the following equation:

$$K = \frac{W}{L^3}$$

where W was the prawn weight, expressed in gram, and L was the total length of the prawn, measured from the rostrum to the basis of the telson and expressed in millimeter.

Hepatopancreas were crushed in 50 mmol.L⁻¹ phosphate buffer (pH 8) at 10:1 (v/w) ratio. For each studied specimen ($n = 6-10$ per condition), lipid, protein, and glycogen contents were determined in triplicates. Protein content was measured using the method of Bradford (1976) adapted to microplate. Lipid and glycogen analyses were based on the techniques developed by Van Handel (1985a,b) and adapted by Plaistow *et al.* (2001). Briefly 100 μ L of homogenate was added to 50 μ L of 20 g.L⁻¹ sodium sulfate and 1 350 μ L of a chloroform/methanol mix at 1:2 ratio. The mix was left on ice during 1 h and then centrifuged at 3 000 xg for 10 min at 4 °C. The supernatant was used to measure lipid concentrations. For that, 50 μ L was mixed with 100 μ L of 95 % phosphoric acid for 10 min in a water bath at 95 °C. A volume of 2.4 mL of vanillin reagent (see Van Handel 1985a) was added to the mix, before being left in the dark for 10 min. The absorbance OD of samples was measured at 525 nm. The lipid content in each sample was determined from a calibration curve constructed using a concertation gradient of commercial olive oil of 0, 250, 500, 750 and 1 000 μ g.mL⁻¹. Contrary to the lipid measurements, the pellet was used to measure glycogen concentrations. This pellet was put into 400 μ L of deionised water and incubated during 3 h on ice. After being crushed once more, 50 μ L of supernatant was added to 2.45 mL of Anthrone reagent (see Van Handel, 1985b), then the mix was homogenised at 35 °C during 20 min. Solution was cooled on ice during 5 min, then the absorbance OD was measured at 630 nm. The glycogen content in each sample was determined from a calibration curve constructed using a concertation gradient of glucose of 0, 250, 500, 1 000 μ g.mL⁻¹. All absorbance OD was measured using a Tecan® Infinite 2000 spectrometer.

2.5. NAGase activity measurement

For each studied specimen ($n = 6-10$ per condition), NAGase activity was measured in triplicates for both uropods and last abdominal segment, following the optimised protocols

described in Rollin *et al.* (2021). Briefly, organs were put in citrate phosphate buffer (17.5 mmol.L⁻¹, pH 5.15) at a specific w:v ratio of 1:8 and 1:20 for last abdominal segment and uropods, respectively. Then, organs were crushed using a bead homogenizer Precellys®, and the supernatant produced was centrifuged at 10 000 xg, for 20 min at 4 °C. For each replicate, 2 x 30 or 20 µL of the enzyme extract (for last abdominal segment and uropods, respectively) were put into a microplate well, then citrate phosphate buffer was added to obtain a final volume of 180 µL. NAGase reaction was started by adding 20 µL of the specific substrate with a chromogenic ligand, 4-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide, at optimum concentrations of 750 and 1 000 µmol.L⁻¹ for last abdominal segment and uropods, respectively. Reaction was performed at 37 °C and stopped after incubations of 10 and 20 min for each replicate, by adding 20 µL of 1 M NaOH (to reveal the the nitrophenol liberated by colouration). Production of nitrophenol was monitored by a reading of absorbance OD at 410 nm, using a Tecan® Infinite 2000 spectrometer. Finally, NAGase activity was expressed as micromoles of the nitrophenol produced per min and per litre, using the following equation:

$$\text{NAGase activity } (\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}) = \frac{\Delta A}{\epsilon.l}$$

Where $A = \frac{\text{mean absorbance at time 2} - \text{mean absorbance at time 1}}{\text{time 2} - \text{time 1 (min)}}$, ϵ is the molar extinction coefficient of nitrophenol (*i.e.* 18 300 M⁻¹.cm⁻¹), and l is the path length of the beam of light through the sample well (*i.e.* 0.486 cm for the present NAGase assays).

2.6. Analytic methods of the cuticle structural properties

The cuticle structural properties were analysed on 5 specimens per condition ($n = 5$).

Thermal analyses. Cuticle composition was analysed using Thermogravimetric analysis (TGA) which was performed on a Setsys apparatus (Setaram, Caluire-et-Cuire, France), with the Setsoft software. For each prawn, a cuticle sample of 15-20 mg was weighed and heated under air atmosphere by realizing the following program: *i*) isotherm at 20 °C for 10 min, *ii*) heat from 25 to 900 °C at a heating rate of 10 °C.min⁻¹ and *iii*) isotherm at 900 °C for 10 min. At the end of the heating program, ash, corresponding to cuticle mineral fraction, has been collected for chemical analysis described below. Furthermore, the weight loss was plotted as a function of temperature (TGA curve), allowing the determination of the number of weight loss events. Sample weight loss and temperature of maximum weight loss (T_{event} ,

estimated by the temperature for which the first derivative of the TGA is at its maximum) were recorded.

Analyses of surface composition. Fourier Transform InfraRed (FTIR) measurements were performed using a ZnSE/diamond attenuated total reflectance (ATR) accessory on a Perkin Elmer® spectrometer. Hence, for each prawn, external and internal sides of cuticle were analysed three times per side. Since ATR technique involves a high pressure on the material of interest to be analysed, each observation was performed using an intact piece of cuticle. Data obtained for each replicate was averaged over 16 runs with a resolution of 4 cm^{-1} in a wavelength range between 650 and $4\,000\text{ cm}^{-1}$.

Analyses of residual mineral fraction. For each condition, mineral fraction cuticles that remained after TGA were pooled in plastic cups sealed by screwed covers. Each pool was weighed and then dispatched to La Drôme Laboratoire (Valence, France) for metal analyses. At their arrival, pools were mineralised with nitric acid in micro-waves following the NF EN 13805 procedure. Quantitative aluminium (Al) analysis was achieved thanks to ICP-MS Nexion 300 apparatus from Perkin Elmer. Quantitative calcium (Ca) and magnesium (Mg) analyses were achieved using an ICP-AES IRIS Intrepid II apparatus from Thermo-Scientific. Metal determination followed the NF EN 17294-2 standard. For total metal content, limit of quantification in milligram(metal) per kilogram of dried sample (DS) are $2\text{ mg.kg}^{-1}\text{ DS}$, $10\text{ mg.kg}^{-1}\text{ DS}$. and $10\text{ mg.kg}^{-1}\text{ DS}$ for Al, Ca and Mg, respectively.

2.7. Contaminant quantification in water and prawns

Considering all the environmental matrices, pollutant quantification was realised by Labeo laboratories (Labeo, Caen, France). Cd in water was measured by ICP-MS according to the standard protocol NF EN ISO 17294-2 (2016). Owing to the fact that Px has never been measured by the Labeo laboratory before, Px innovative protocol was realised with dosed addition added to a standard water sample, analysed by LC/MS/MS.

Considering pollutant quantification in abdominal muscle of prawns, Cd was measured according to methodology developed by ANSES (ANSES/LSAliments/LSA-INS-0084). This methodology consisted of the acid digestion of organic tissues and ICP-MS analyses. Intern methodology of measuring Px in prawns has been realised, using LC/MS/MS for analysis.

Obtention of Cd and Px values in water and in prawns allowed the calculation of bioconcentrated factor, as recommended by Sire & Amouroux (2016, Ifremer), with the following equation:

$$\text{Bioconcentration factor (L.kg}^{-1}\text{)} = \frac{C_p}{C_w}$$

Where C_s was the pollutant concentration found in the prawn abdominal muscle tissue (expressed in $\mu\text{g.kg}^{-1}$), and C_w represented the pollutant concentration measured in the exposure water (expressed in $\mu\text{g.L}^{-1}$).

2.8. Statistical analyses

Except for FTIR data, statistical procedures were implemented with R software (R Core Team, 2018). Normality and homoscedasticity were checked using the Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively, before conducting parametric analysis.

Variabilities of moulting period, protein, lipid and glycogen contents in prawn hepatopancreas were assessed using the ANOVA procedure (*lm* function, classical type I decomposition). In parallel, variabilities in cuticle indexes, as well as cuticle composition assessed by TGA technique were tested using Kruskal-Wallis tests, with post hoc analysis (*pairwise.wilcox.test* with holm correction). FTIR spectra were analysed with Orange data mining software, using PCA to determine differences between the tested conditions. No statistical analyses were used with the mineral fraction nor with the contaminant contents in the different matrices tested, as they were mainly used as descriptive data to complete information on prawn exposures.

3. Results

3.1. Contaminant concentrations in water and prawn tissues

Analyses of contaminant concentration in water are reported in Table 1. Differences between nominal and measured concentrations were all below 14.6 % and 12.1 % for cadmium (Cd) and pentoxifylline (Px) respectively. No decrease of Cd nor Px concentrations were observed after 48 h of exposure.

Table 1 Nominal and measured concentrations of cadmium and pentoxifylline in *i*) water samples following the medium renewals (T0), after 48h of contamination (T48 h) and *ii*) abdomen tissues of *Palaemon serratus* exposed over 1 moult cycle (i.e. from mid premoult to the next D2 moult stage; 21.4 ± 0.5 days). Measures were performed on triplicate on matrix homogenates

Water	SW control condition	Expective exposure condition
Nominative concentrations ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
Cadmium		56.2
Pentoxifylline		27 831
Effective concentrations ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
<u>Cadmium content ($\mu\text{g.L}^{-1}$)</u>		
T0	< 0.05	48
T48 h (before renewing)	< 0.05	48,84
<u>Pentoxifylline content</u>		
T0	< 0.2	25 450
T48 h (before renewing)	< 0.2	24 470
Prawn		
Accumulation during 1 moult cycle		
<u>Level in prawn muscle ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)</u>		
Cadmium	< 5	265
Pentoxifylline	<1	56.04
Bioconcentration factors		
Cadmium		5.47
Pentoxifylline		0.002

By regarding the values obtained in prawn exposed after 21 days (Table 1), Cd was found at a greater concentration in abdomen tissues than the one measured in ambient water ($265.0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ vs. $48.4 \pm 0.6 \mu\text{g.L}^{-1}$), contrarily to Px which was found at much lower level than its concentration measured in ambient water ($56.2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ vs. $24\,960.0 \pm 693.0 \mu\text{g.L}^{-1}$). Unlike Px, Cd was thus accumulated in prawns during this exposure, with an extrapolated bioconcentration factor of 5.5.

3.2. Survival, condition index and energetic reserves

After 21.4 ± 0.5 days of exposure, the survival range were 70 % for control and Cd exposed specimens and 73 % for the Px exposure condition. The observed mortality was mainly due to the cannibal behaviour of prawns.

No significant effect of treatment on the condition index was observed (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$). By comparing length and weight on prawns before the experiment and after their exposure, a significant decrease of the condition index was found (Kruskal-Wallis, p -

value = $2.28 \cdot 10^{-2}$), which is a logical result according to the exuviae occurring between the two collects.

Lipid, protein, and glycogen contents found in exposed prawns were presented in Table 2. No significant differences were observed in lipid contents between the three conditions, nor in protein levels (ANOVA, p -value > 0.05). However, glycogen in control prawns was present in a significant higher level than in prawns exposed to Cd (ANOVA, p -value = $3.11 \cdot 10^{-3}$). No differences were reported between prawns exposed to Px and the other conditions.

Table 2 Lipid, protein and glycogen contents (mean $\pm$ standard deviation, $n = 6, 10, 10$ for control, pentoxifylline and cadmium prawns respectively) found in hepatopancreas of *Palaemon serratus* specimens exposed to the tested solutions (i.e. control, cadmium, pentoxifylline) over one moult cycle (from mid premoult to the next D2 moult stage; 21.4 ± 0.5 days). Difference in letters refers to significant difference between the tested conditions.

prawn content ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Control	Pentoxifylline	Cadmium
Lipids	58.47 ± 25.16	47.48 ± 16.60	40.09 ± 15.52
Proteins	134.65 ± 12.25	130.59 ± 11.25	130.00 ± 15.66
Glycogens	14.84 ± 2.48^a	11.92 ± 3.31^{ab}	9.28 ± 2.36^b

3.3. Moult-related endpoints

During the experiment, the time between the exuviation and the end of the next premoult (i.e. D2 moult stage) was 21.7 ± 2.6 , 21.7 ± 3.0 and 21.5 ± 2.8 days for control, Cd and Px exposure conditions, respectively. No significant delays triggered by the contaminants were characterized (ANOVA, p -value > 0.05).

In the same way, no significant difference of NAGase activity levels was observed between the different conditions (ANOVA, p -value > 0.05, Table 3), whatever the considered tissue (i.e. uropods or last abdominal segment).

Table 3 The NAGase activity (expressed in $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$, mean $\pm$ standard deviation, $n = 6, 10, 10$ for control, pentoxifylline and cadmium prawns respectively) found in uropods and last abdominal segment of *Palaemon serratus* specimens exposed to the tested solutions (i.e., control, cadmium, pentoxifylline) over one moult cycle (from mid premoult to the next D2 moult stage; 21.4 ± 0.5 days).

NAGase activity ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$)	Control	Pentoxifylline	Cadmium
Uropods	3.58 ± 0.65	3.66 ± 0.53	3.76 ± 0.42
Last abdominal segment	2.32 ± 0.32	2.47 ± 0.51	2.48 ± 0.27

Results of thermogravimetry analyses (TGA) obtained on the cuticles of *Palaemon serratus* are presented in Fig 1. These analyses allowed to determine the composition of the cuticle, particularly the type and mass of materials composing it. As observed previously (Rollin et al. unpublished), the *Palaemon serratus* is mainly composed of bound water, protein, chitin and inorganic salts, which are detected by TGA. Considering the bound water evaporation event, T_{event} showed a tendency to decrease for exposed prawns, being more pronounced with Cd exposure, but not significant effects were observed (control: 102.2 ± 14.1 °C, Px: 86.6 ± 16.5 °C Cd: 77.8 ± 3.7 °C; Kruskal-Wallis, $p\text{-value} > 0.05$). In a similar way, exposed prawns displayed a higher weight loss for this event, but not significant (control: 11.7 ± 0.5 %, Px: 14.8 ± 1.9 %, Cd: 14.2 ± 2.3 % Kruskal-Wallis, $p\text{-value} > 0.05$). For the protein degradation event, sample weight loss of cuticles showed no significant effect (control: 25.9 ± 3.2 %, Px: 25.6 ± 2.9 %, Cd: 25.9 ± 5.2 %; Kruskal-Wallis: $p\text{-value} > 0.05$), while event temperature was significantly higher in control cuticles, compared to Cd exposed cuticles (328.4 ± 0.9 °C vs 322.8 ± 3.0 °C, Kruskal-Wallis: $p\text{-value} = 3.53 \times 10^{-2}$). The cuticles of Px exposed prawns showed an intermediary state of event temperature (i.e. 327.5 ± 1.7 °C), being not significantly different from control ones (Pairwise Wilcoxon test: $p\text{-value} > 0.05$). Chitin degradation event displayed no significant difference in T_{event} (control: 500.0 ± 17.6 °C, Px: 493.3 ± 10.3 °C, Cd: 498.2 ± 19.0 °C) nor in sample weight loss (control: 19.4 ± 1.3 %, Px: 18.6 ± 2.3 %, Cd: 16.3 ± 4.6 %), despite of a tendency of decreasing this latter parameter when cuticles were exposed to Cd condition (Kruskal-Wallis: $p\text{-values} > 0.05$). Parameters attributed to inorganic phase oxidation event were quite steady, displaying no difference for T_{event} (control: 713.6 ± 2.91 °C, Px: 711.3 ± 4.3 °C, Cd: 705.3 ± 10.1 °C) nor for sample weight loss (control: 13.1 ± 2.8 %, Px: 13.1 ± 3.1 %, Cd: 11.7 ± 3.3 %; Kruskal-Wallis: $p\text{-value} > 0.05$). In a same way, no difference was observed on the weight of resting mineral fraction (control: 23.8 ± 2.9 %, Px: 23.7 ± 4.0 %, Cd: 25.7 ± 5.4 %; Kruskal-Wallis: $p\text{-value} > 0.05$).

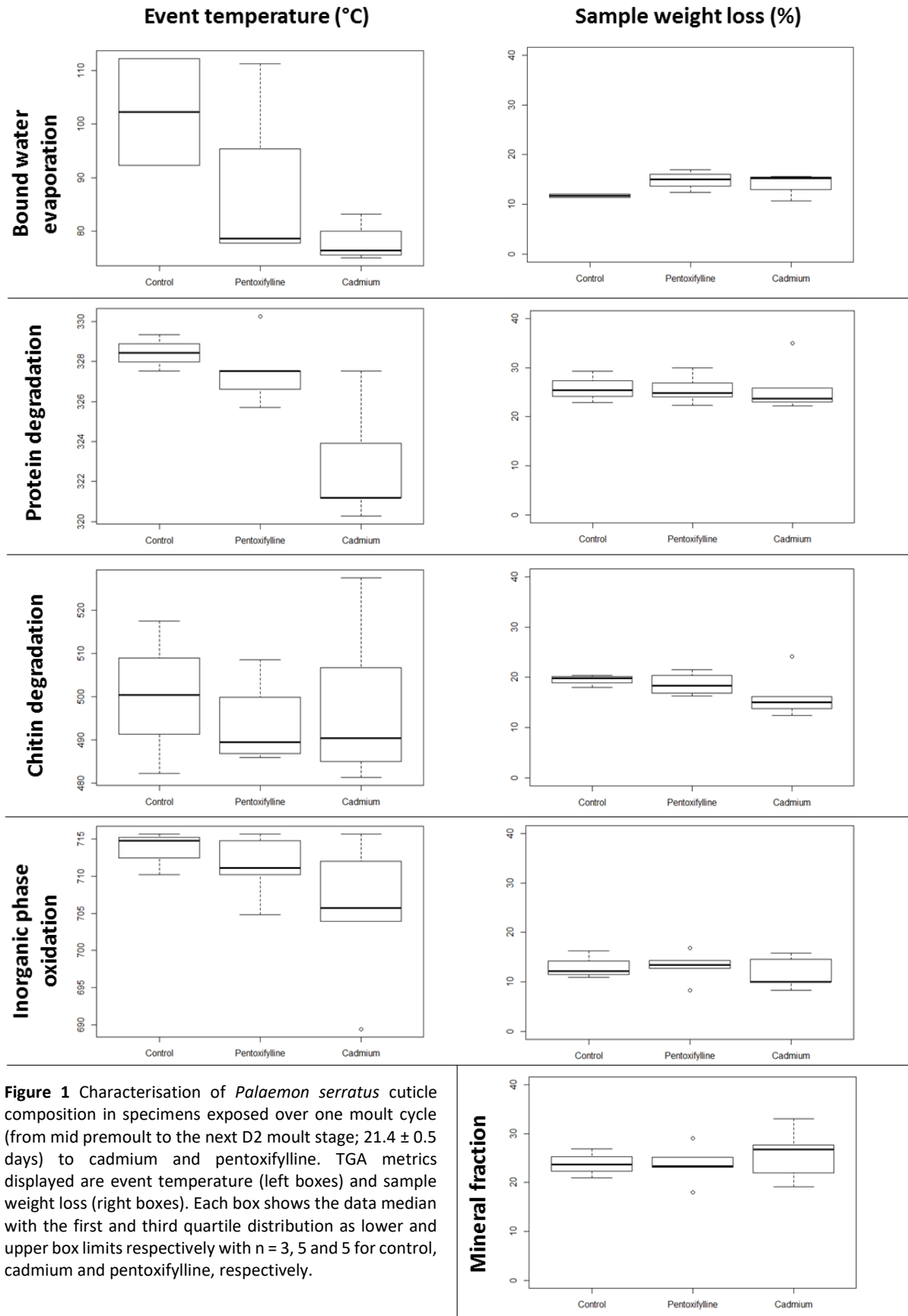


Figure 1 Characterisation of *Palaemon serratus* cuticle composition in specimens exposed over one moult cycle (from mid premoult to the next D2 moult stage; 21.4 ± 0.5 days) to cadmium and pentoxifylline. TGA metrics displayed are event temperature (left boxes) and sample weight loss (right boxes). Each box shows the data median with the first and third quartile distribution as lower and upper box limits respectively with $n = 3, 5$ and 5 for control, cadmium and pentoxifylline, respectively.

Results of chemical composition performed on ashes obtained after TGA heating program are presented in Table 4. Here, ICP-AES and ICP-MS were performed on the resting mineral fraction of the cuticle to determine the type of metals present in this fraction, as well as their proportion. As observed previously (Rollin et al. unpublished), the *P. serratus* cuticle has an inorganic phase composed mainly of Ca, Mg, Sr, and minorly by elements such as Fe, Mn, Cu, Zn. Other metals measured were found at trace levels. Starting with Ca, which represented approximately 93.5 ± 1.1 % of the resting mineral fraction, this element did not appear to vary among all exposure conditions. The same absences of effects were observed for the two other major elements, magnesium and strontium, representing a cuticle proportion of 4.5 ± 1.0 % and 1.7 ± 0.2 % respectively. Considering metallic minor elements (proportion < 1 %), Cu proportion showed no variation among the exposure conditions. Conversely, Zn proportion did not change when prawns are exposed to Cd, but greatly decreased (i.e. 11.2 fold) in cuticles of Px exposed specimens (434.0 mg.kg^{-1} vs 38.5 mg.kg^{-1} for control and Px exposed specimens respectively). Comparing with control specimens, Cd proportion in cuticles increased by 181.0-fold with Cd exposure, without being affected in proportion during Px exposure. The same pattern was found on Mn (2.9-fold), V (8-fold), Fe (7.9-fold), Cr (12.7-fold), Co (1.7-fold), Mo (23.5-fold) and Ni (78.9-fold), with a higher proportion in cuticles of Cd exposed prawns, compared to the control ones.

Table 4 Proportion of major elements found with resting mineral fractions of the cuticles of *Palaemon serratus* specimens exposed to cadmium and pentoxifylline, over one moult cycle (i.e. from mid premoult to the next D2 moult stage; 21.4 ± 0.5 days), in comparison to the control condition. Data are presented as measured simplicate performed from a pool of TGA ashes (control: n = 3; pentoxifylline: n = 6; cadmium: n = 6). Bold values show a high difference compared to SW control.

proportion (mg.kg^{-1})	Control	Pentoxifylline	Cadmium
Calcium	414 200	367 200	392 300
Magnesium	16 800	15 800	24 100
Strontium	6 900	7 700	6 300
Zinc	434	38.5	425
Copper	96	92	91
Iron	60	33	474
Manganese	14.9	11.8	44
Nickel	1.9	0.8	150
Chromium	12	11	153
Molybdenum	0.6	0.2	14.1
Cobalt	0.1	0.1	1.7
Vannadium	0.1	0.1	0.8
Cadmium	0.07	0.06	12.2

Modulations of surface composition. Modulations of surface composition of cuticle external and internal side by Cd and Px exposures were displayed in supplementary data. Cuticle external side of control specimens displayed main FTIR bands at 860 cm⁻¹, 1 026 cm⁻¹, 1 070 cm⁻¹, 1 158 cm⁻¹, 1 240 cm⁻¹, 1 369 cm⁻¹, 1 516 cm⁻¹, 1 642 cm⁻¹, 1 726 cm⁻¹, 2 163 cm⁻¹, 2 853 cm⁻¹, 2 878 cm⁻¹, 2 927 cm⁻¹, 2 963 cm⁻¹ and 3 280 cm⁻¹; whereas internal side showed main FTIR bands at 896 cm⁻¹, 952 cm⁻¹, 1 011 cm⁻¹, 1 062 cm⁻¹, 1 112 cm⁻¹, 1 152 cm⁻¹, 1 205 cm⁻¹, 1 259 cm⁻¹, 1 310 cm⁻¹, 1 375 cm⁻¹, 1 444 cm⁻¹, 1 539 cm⁻¹, 1 638 cm⁻¹, 1 724 cm⁻¹, 2 163 cm⁻¹, 2 876 cm⁻¹, 2 931 cm⁻¹, 2 963 cm⁻¹ and 3 274 cm⁻¹. By comparing exposed specimens with control ones, no Px nor Cd effects were observed on cuticle surface composition.

4. Discussion

The consideration of the moult cycle chronology is essential for interpretation of moult associated responses in a such bioassay context. That evidently implies to work with specimens previously synchronised according to their moult stages, at the experimentation start. Nevertheless, two strategies are possible for ending the experimentation. The first one consists classically of stopping the exposure at a fixed time for all specimens. This strategy is reliable in species displaying a strong regularity in moult cycle duration as showed in female amphipods (Blanchet et al. 1979; Geffard et al. 2010; Chaumot et al., 2020). Conversely, when the moult cycle duration presents an inter-individual variability, this strategy exposes to misinterpretations due to comparisons of specimen at different moult stages following sampling bias. To get around this problem, another strategy is to stop the experiment at a fixed moult stage, even if that would mean some differences in exposure duration. This second strategy was opted in the present study, where *Palaemon serratus* specimens were exposed to cadmium (Cd) or pentoxifylline (Px) during one moult cycle revolution, from the premoult to the next premoult (i.e. from D2 stage to the next D2 Stage). In this approach, the possibility to characterise the moult stages of *P. serratus* using non-invasive observation constituted a real advantage. The time of the moult cycle revolution described here was relatively constant with a mean of 21.4 ± 0.5 days. It can be noted this duration was in adequation with the inter-exuviation time reported by Richard (1978) in *P. serratus*. Indeed, this author observed that specimens of 4-5 cm length (i.e. from eyestalk to telson) completed their moult cycle in 20 days, for a temperature of 18 °C. In other hand, the monitoring of contaminant levels in water confirmed that the nominal concentrations were respected for both Cd and Px, the concentrations staying

constant between two renewals of exposure medium. At the end of experiment, the survival rates were ranged from 70 to 73 %, which stay acceptable for the interpretation of sub-individual end points. Besides, the observed mortality was mainly caused by the cannibal behaviour of prawns, which was exacerbated by the maintenance in microcosm, as previously reported by Erraud et al. (2019). In the same way, the prawns displayed a decrease of the global index condition, independently of treatments. The observation could also be attributed to the microcosm maintenance for these organisms particularly sensitive to stress, despite the care taken to respect their welfare. (Araneda et al. 2008)

The exposure to 0.5 μM of Cd (i.e. 91.7 $\mu\text{g.L}^{-1}$ CdCl_2 or 56.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Cd) did not cause noteworthy mortality of prawns. This observation is consistent with LC_{50} values reported in literature in other marine decapod species for Cd long-term exposures (review in Ahsanullah et al., 1981). For example, 30d- LC_{50} was estimated at 120 and 720 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respectively for the shrimp *Palaemonetes vulgaris* and the prawn *Penaeus duorarum*, exposed at the temperature of 25 ± 2 °C and the salinity of 20 ± 2 ‰. In the present study, *P. serratus* was exposed at 19 ± 1 °C and 30 ‰. The protective effect of salinity toward Cd toxicity was documented in many aquatic organisms, including crustaceans (e.g. *Callinectes sapidus*: Frank and Roberston, 1979; *Litopenaeus vannamei*: Wu and Chen, 2004; *Palaemonetes pugio*: Sunda et al., 1978). In marine crustaceans, that could manly be explained by the decrease in free Cd ion concentration due to complexation to chloride ions, decreasing consequently the uptake and accumulation of Cd (review in Rainbow, 1995). In the present study, the measurement of bioaccumulation in the abdomen tissue of *P. serratus*, after 21.4 ± 0.5 days of exposure, showed the Cd was bioconcentrated with a factor of 5.5 L.kg^{-1} wet weight (wt). According to the review made by Taylor (1983), this value is quite comparable to other bioconcentration factors calculated on crustacean, which for an exposed concentration of 50-100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ Cd, varies between 6 to 110 L.kg^{-1} wt. This high variability comes from several factors including the level of salinity, the time of exposure and the cadmium excretion rate of each species. By comparing with similar conditions, Eisler et al. (1972) found a similar bioconcentrated factor of 12.8 L.kg^{-1} in muscle tissues of decapods (i.e. *Homarus americanus*) exposed during 21 days in seawater (i.e. 18.4 °C; 34 ‰) containing 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ CdCl_2 . If no significant effect of Cd on the condition index and on the hepatopancreas lipid and protein contents were observed, exposed prawns displayed a reduced content of glycogen at the end of the exposure. The decrease of glycogen reserves in Cd exposed organisms have even been reported in other decapod crustaceans (e.g. in the mud shrimp *Austinopecten edulis*: Das et al., 2019; in the crab *Scylla serrata*: Reddy and

Bhagyalakshmi, 1994). In fish, this metal-induced glycogenolysis was linked to a concomitant increase of glycaemia (discussed in Cicik and Engin, 2005). In the same way, short-term exposures to heavy metals including Cd have been showed to induce hyperglycaemia in the shrimps *Palaemonetes elegans* (Lorenzon et al., 2000). These studies suggest Cd exposure induce a switch metabolism, resulting in mobilisation of glucose reserves by glycogenolysis to assure the maintenance of the organism metabolism and compensate the toxic effects. In the present case, the reduction of glycogen reserves demonstrates that the *P. serratus* specimens was affected by Cd. Despite this observation, no significant effects of Cd on intermoult duration nor on NAGase activity of *P. serratus* were detected. However, Cd has already been reported to delay the moulting process of autotomised Brachyuras *Uca pugilator* at 1 mg.L⁻¹ (Weis, 1976a) as well as on eyestalkless *Chasmagnatus granulata* and *Procambarus clarkii* specimens at 0.5 mg.L⁻¹ and 5 mg.L⁻¹ Cd respectively (Reddy et al. 1994; Moreno et al. 2003). Furthermore, by exposing eyestalkless *Sinopotamon henanense* specimens to 29 mg.L⁻¹ during 5 days, Luo et al. (2015) observed both a delay in moult duration and an inhibition of NAGase activity.. In parallel, moult delays as well as NAGase activity impairments have been reported on intact crustaceans exposed to Cd. For instance, Geffard et al. (2010) reported moult delays on females *Gammarus fossarum* exposed to 3 µg.L⁻¹ Cd during 21 days. Concerning NAGase activity, Mesquita et al (2015) reported an inhibition of epidermal NAGase activity on the Brachyura *Carcinus Maenas* exposed to 2 mg.L⁻¹ Cd during 7 days, at a lower salinity than the present study (i.e. 15 ‰.). All of these observations remain difficult to rely with the present study since in most of the studies *i*) crustaceans were exposed at low salinity (i.e. in hypo osmotic medium), favouriting Cd bioavailability, *ii*) Cd was assessed at high concentrations (i.e. 1 to 29 mg.L⁻¹ for main studies), and *iii*) organisms were in majority eyestalk ablated.

Considering the structural properties of cuticle, the results cannot be compared since the present study is the first to propose the use of such parameters in contaminant exposed crustaceans. Cd exposure led to modifications of cuticle properties of *P. serratus* specimens, particularly in the protein organization. One hypothesis explaining this observation is that great amount of cadmium accumulated (i.e. 181.0 fold compared to the cuticles of control specimens) in the cuticle may interfere in interaction between materials composing this structure. This idea would confirm the other tendencies showed on chitin composition and organization. In parallel, the mineral part, particularly Ca content, appeared not to be affected by the presence of Cd. Hence, even if Cd mimics Ca by using Ca pumps and interfering in some organization, no effects on Ca organization, proportion and composition were observed. Furthermore, contrary

to Ca unchanged proportion, several metals (i.e. Fe, Mn, Ni, Cr, Mo, Co, V) present in cuticle drastically increased in proportion when prawns were exposed to Cd. However, as observed with TGA results, the amount of inorganic phase did not change, only their proportions in the cuticle do. To our knowledge, this result cannot be compared since this is the first time that a cadmium effect has been highlighted on cuticle metal proportion. These changes could be partly explained by Cd alteration on the organism, particularly its physiology. Among its possible impacts, Cd is well-known to alter the gill structure and its functions (Soegianto et al. 1999; Lignot et al. 2000; Felten et al. 2008; Issartel et al. 2010). Furthermore, crustacean gills are, with exoskeleton and hepatopancreas, a preferential site of Cd accumulation, facilitating their dysfunction (White & Rainbow, 1986; Nuñez-Nogueira & Rainbow, 2005; Cresswell et al. 2015). Gill dysfunction, combined the increase of energy budget of the organism to resist to the Cd stress, would lead to an increase of oxygen consumption as well as changes in osmoregulation and in internal acid/base balance (Gaudy et al. 1991; Barbieri, 2007; Felten et al. 2008; Barbieri, 2009). Such biochemistry changes in the organism could favor the internalization of anionic forms, such as vanadate (V), molybdate (Mo) or chromate (Cr) for instance, which may be retrieved in aquatic systems (Rainbow, 1997). To confirm this hypothesis, monitoring of the respiration markers (e.g. oxygen consumption) as well as prawn biochemistry (e.g. hemolymph osmolarity) have to be realized. Furthermore, analyses of the gill structure and Cd accumulation rate in prawns on one hand, and SEM characterization and metal quantification of the Cd exposed cuticle on the other hand should bring complementary data to have a better understanding of Cd alterations on exposed prawns.

At the end of *in vivo* exposure of *P. serratus* specimens to 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ of Px, no effect was observed as well as on the global condition of organisms (i.e. survival rate, condition index and hepatopancreas energetic reserves) than the moult-associated end-point (i.e. moult cycle time, cuticle structural properties and NAGase activity). Only an increase Zn proportion in mineral fraction of cuticle, which stay unexplained, was recorded. However, Px was demonstrated to cause *in vitro* inhibition of the *P. serratus* NAGase activity (Rollin et al. in preparation). Likewise, Husen et al. (2015) reported NAGase inhibitions in the subterranean termite *Reticulitermes flavipes* exposed 1, 2 and 3 weeks by trophic way, for all Px concentrations tested (12.5; 25; 50; 100 and 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). The innocuousness of Px reported here in *P. serratus* could be linked to the inability of Px to be bioaccumulated by the prawn. Indeed, this observation tends to show that Px did not penetrate in prawn tissues by or which was too quickly metabolised and/or excreted to induce damages. Conversely, in works of Husen

et al. (2015), Px accumulation rate in thermite could be more efficient by the way of ingestion. Furthermore, termites living in terrestrial ecosystem, their physiology is adapted to preserve water reserve, that could lead to difficulty for the contaminant excretion, accentuating the Px accumulated in organism and triggering more toxic effects such as those observed on NAGase activity. Further investigation could consist of the assessment of Px effects in *P. serratus* when specimens are exposed by trophic way.

Contrary to what was *a priori* hypothesised, Cd and Px only altered *P. serratus* cuticle structure, while they did not cause any NAGase activity impairments. These compounds have been mainly selected for their simplicity to be used and solubilised, as well as their ability to alter arthropod molecular targets involved in the regulation of moulting process (*e.g.* NAGase activity, Husen et al. 2015; Luo et al. 2015; Mesquita et al. 2015). However, Cd and Px are not the only compounds showing an ability to alter the crustacean moulting process. Recently in its review, Zou (2020) identified 32 compounds able to alter this physiological process. This identification yet does not take in account many other compounds which are able to disturb the moulting regulation, and possibly altering the macroscopically events resulting from this regulation. In total, around fifty compounds are interesting to be tested further in a moult marker alteration bioassay context such the present study. Among these compounds, it is possible to mention other heavy metals (lead: Weis, 1976b, zinc: Beltrame et al. 2010, copper: Yang et al. 2006), HAPs (dimethylnaphthalene: Cantelmo et al. 1982, benzene: Cantelmo et al. 1981), PBDEs (Davies & Zou, 2012), pharmaceuticals (carbamazepine: Chen et al. 2019), pesticides (Chlorpyrifos: Taylor et al. 2019, Arochlor; Zou & Fingerman, 1999b, Endosulfan: Montagna & Collins, 2007), nanoparticles (TiO₂ : Dabrunz, et al. 2011), or ecdysone and juvenoid hormone agonist (ponasterone: Baldwin et al. 2001, RH5849: Clare et al. 1992).

5. Conclusion

Even if exposure methodology was validated, particularly for cadmium (Cd) in view of its bioaccumulation within prawn tissues and its physiological effects on glycogen contents, no massive effects on moult markers (*i.e.* moult duration, NAGase activity) of *Palaemon serratus* specimens exposed were observed whatever the considered compounds, Cd and pentoxifylline (Px). However, subtle alterations on cuticle protein organisation and cuticle trace metal proportion were observed in Cd exposed prawns. The mechanisms leading to these defects in cuticle structure as well as

their interest to diagnose moult disruptions would deserve to be more characterised. Furthermore, it could be equally interesting to investigate longer term effects, throughout several successive, of chemicals suspected to disturb moult process.

Reference

- Abidi, S., Abbaci, K.T., Geffard, O., Boumaiza, M., Dumet, A., Garric, J., Mondy, N., 2016. Impact of cadmium on the ecdysteroids production in *Gammarus fossarum*. *Ecotoxicology* 25, 880–887.
- Ahsanullah, M., Negilski, D.S., Mobley, M.C., 1981. Toxicity of zinc, cadmium and copper to the shrimp *Callinassa australiensis*. I. Effects of individual metals. *Marine biology* 64, 299–304.
- Anderson, G.S., 1985. Species profiles: Life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Gulf of Mexico): Grass shrimp. The Service.
- Araneda, M., Pérez, E.P., Gasca-Leyva, E., 2008. White shrimp *Penaeus vannamei* culture in freshwater at three densities: condition state based on length and weight. *Aquaculture* 283, 13–18.
- Baldwin, W.S., Bailey, R., Long, K.E., Klaine, S., 2001. Incomplete ecdysis is an indicator of ecdysteroid exposure in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 20, 1564–1569.
- Barbieri, E., 2009. Effects of zinc and cadmium on oxygen consumption and ammonium excretion in pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*, Pérez-Farfante, 1967, Crustacea). *Ecotoxicology* 18, 312–318.
- Barbieri, E., 2007. Use of oxygen consumption and ammonium excretion to evaluate the sublethal toxicity of cadmium and zinc on *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936, Crustacea). *Water environment research* 79, 641–646.
- Becker, A., Ziegler, A., Epple, M., 2005. The mineral phase in the cuticles of two species of Crustacea consists of magnesium calcite, amorphous calcium carbonate, and amorphous calcium phosphate. *Dalton Transactions* 1814–1820.
- Beltrame, M.O., De Marco, S.G., Marcovecchio, J.E., 2010. Effects of zinc on molting and body weight of the estuarine crab *Neohelice granulata* (Brachyura: Varunidae). *Science of the total environment* 408, 531–536.

- Blanchet, M.F., Porcheron, P., Dray, F., 1979. Variations du taux des ecdystéroïdes au cours des cycles de mue et de vitellogenèse chez le Crustacé Amphipode, *Orchestia gammarellus*. International Journal of Invertebrate Reproduction 1, 133–139.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72, 248–254.
- Campillo, A., 1975. Contribution à l'étude de l'élevage de la crevette rose *Palaemon serratus* (Pennant) en captivité. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes 39, 381–393.
- Cantelmo, A., Mantel, L., Lazell, R., Hospod, F., Flynn, E., Goldberg, S., Katz, M., 1982. The effects of benzene and dimethylnaphthalene on physiological processes in juveniles of the blue crab, *Callinectes sapidus*, in: Physiological Mechanisms of Marine Pollutant Toxicity. Elsevier, pp. 349–389.
- Cantelmo, A.G., Lazell, R.J., Mantel, L.M., 1981. effects of benzene on molting and limb regeneration in juvenile *Callinectes sapidus* rathbun. Marine biology letters.
- Chang, E.S., Mykles, D.L., 2011. Regulation of crustacean molting: a review and our perspectives. General and comparative endocrinology 172, 323–330.
- Chaumot, A., Coulaud, R., Adam, O., Quéau, H., Lopes, C., Geffard, O., 2020. *In situ* reproductive bioassay with caged *Gammarus fossarum* (Crustacea): Part 1—Gauging the confounding influence of temperature and water hardness. Environmental toxicology and chemistry 39, 667–677.
- Chen, H., Gu, X., Zeng, Q., Mao, Z., Liang, X., Martyniuk, C.J., 2019. Carbamazepine disrupts molting hormone signaling and inhibits molting and growth of *Eriocheir sinensis* at environmentally relevant concentrations. Aquatic Toxicology 208, 138–145.
- Cicik, B., Engin, K., 2005. The effects of cadmium on levels of glucose in serum and glycogen reserves in the liver and muscle tissues of *Cyprinus carpio* (L., 1758). Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 29, 113–117.
- Clare, A.S., Rittschof, D., Costlow Jr, J.D., 1992. Effects of the nonsteroidal ecdysone mimic RH 5849 on larval crustaceans. Journal of Experimental Zoology 262, 436–440.
- Cohen, E., 2010. Chitin biochemistry: synthesis, hydrolysis and inhibition. Advances in insect physiology 38, 5–74.
- Cresswell, T., Simpson, S.L., Mazumder, D., Callaghan, P.D., Nguyen, A., 2013. Where do the metals go? Investigating uptake, retention and spatial distribution of cadmium and zinc using radiotracers within a freshwater decapod crustacean.

- Dabrunz, A., Duester, L., Prasse, C., Seitz, F., Rosenfeldt, R., Schilde, C., Schaumann, G.E., Schulz, R., 2011. Biological surface coating and molting inhibition as mechanisms of TiO₂ nanoparticle toxicity in *Daphnia magna*. PloS one 6, e20112.
- Dang, T.T., Jessen, F., Martens, H.J., Gringer, N., Olsen, K., Bøknæs, N., Orlie, V., 2019. Proteomic and microscopic approaches in understanding mechanisms of shell-loosening of shrimp (*Pandalus borealis*) induced by high pressure and protease. Food chemistry 289, 729–738.
- Das, S., Tseng, L.-C., Chou, C., Wang, L., Souissi, S., Hwang, J.-S., 2019. Effects of cadmium exposure on antioxidant enzymes and histological changes in the mud shrimp *Austinoegobius edulis* (Crustacea: Decapoda). Environmental Science and Pollution Research 26, 7752–7762.
- Davies, R., Zou, E., 2012. Polybrominated diphenyl ethers disrupt molting in neonatal *Daphnia magna*. Ecotoxicology 21, 1371–1380.
- de Melo, M.S., Nazari, E.M., Müller, Y.M.R., Gismondi, E., 2020. Roundup® disrupts chitinolytic enzyme activity and ecdysteroid concentration in *Macrobrachium potiuna*. Environmental Science and Pollution Research 27, 43396–43402.
- Drach, P., 1939. Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes. Ann. Inst. Oceanogr. Monaco 19, 103–391.
- Drach, P., Tchernigovtzeff, C., 1967. Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. Vie et milieu 595–610.
- Eisler, R., Zaroogian, G.E., Hennekey, R.J., 1972. Cadmium uptake by marine organisms. Journal of the Fisheries Board of Canada 29, 1367–1369.
- Erraud, A., Bonnard, M., Chaumot, A., Geffard, O., Duflot, A., Forget-Leray, J., Le Foll, F., Geffard, A., Xuereb, B., 2018. Use of sperm DNA integrity as a marker for exposure to contamination in *Palaemon serratus* (Pennant 1777): Intrinsic variability, baseline level and in situ deployment. Water research 132, 124–134.
- Erraud, A., Bonnard, M., Geffard, O., Coulaud, R., Poret, A., Duflot, A., Forget-Leray, J., Geffard, A., Xuereb, B., 2019. Signification of DNA integrity in sperm of *Palaemon serratus* (Pennant 1777): Kinetic responses and reproduction impairment. Marine environmental research 144, 130–140.
- Fabritius, H.-O., Karsten, E.S., Balasundaram, K., Hild, S., Huemer, K., Raabe, D., 2012. Correlation of structure, composition and local mechanical properties in the dorsal carapace of the edible crab *Cancer pagurus*. Zeitschrift für Kristallographie-Crystalline Materials 227, 766–776.

- Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J., Geffard, O., 2008. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology* 86, 413–425.
- Frank, P.M., Robertson, P.B., 1979. The influence of salinity on toxicity of cadmium and chromium to the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Bulletin of environmental Contamination and Toxicology* 21, 74–78.
- Gaudy, R., Guerin, J.-P., Kerambrun, P., 1991. Sublethal effects of cadmium on respiratory metabolism, nutrition, excretion and hydrolase activity in *Leptomysis lingvura* (Crustacea: Mysidacea). *Marine Biology* 109, 493–501.
- Gbenebor, O.P., Adeosun, S.O., Lawal, G.I., Jun, S., 2016. Role of CaCO₃ in the physicochemical properties of crustacean-sourced structural polysaccharides. *Materials Chemistry and Physics* 184, 203–209.
- Gbenebor, O.P., Akpan, E.I., Adeosun, S.O., 2017. Thermal, structural and acetylation behavior of snail and periwinkle shells chitin. *Progress in biomaterials* 6, 97–111.
- Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagianti, S., Noël, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., 2010. Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: application for reproductive toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 2249–2259.
- Gharagozlou-van Ginneken, I.D., Bouligand, Y., 1975. Studies on the fine structure of the cuticle of *Porcellidium*, Crustacea Copepoda. *Cell and tissue research* 159, 399–412.
- Gismondi, E., Thomé, J.-P., 2014. Effects of two PBDE congeners on the moulting enzymes of the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Environmental pollution* 191, 119–125.
- González-Ortegón, E., Giménez, L., Blasco, J., Le Vay, L., 2015a. Effects of food limitation and pharmaceutical compounds on the larval development and morphology of *Palaemon serratus*. *Science of the total environment* 503, 171–178.
- Gooday, G.W., 1990. The ecology of chitin degradation. *Advances in microbial ecology* 387–430.
- Guerao, G., Ribera, C., 2000. Population characteristics of the prawn *Palaemon serratus* (Decapoda, Palaemonidae) in a shallow Mediterranean Bay. *Crustaceana* 73, 459–468.
- Hilton, J., Sutcliffe, D.W., Carrick, T.R., Rigg, E., 1984. Major inorganic components in some freshwater crustaceans (malacostraca), their exuviae and food items, and thermogravimetric-differential thermal analysis of organic and ash components. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 77, 13–22.

- Hosamani, N., Reddy, S.B., Reddy, R.P., 2017. Crustacean molting: regulation and effects of environmental toxicants. *J. Mar. Sci. Res. Dev* 7.
- Huang, W.-C., Zhao, D., Guo, N., Xue, C., Mao, X., 2018. Green and facile production of chitin from crustacean shells using a natural deep eutectic solvent. *Journal of agricultural and food chemistry* 66, 11897–11901.
- Huner, J.V., Könönen, H., Lindqvist, O.V., 1990. Variation in body composition and exoskeleton mineralization as functions of the molt and reproductive cycles of the noble crayfish, *Astacus astacus* L.(Decapoda, Astacidae), from a pond in central Finland. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 96, 235–240.
- Husen, T.J., Kamble, S.T., 2013. Delayed toxicity of two chitinolytic enzyme inhibitors (psammaplin A and pentoxifylline) against eastern subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of economic entomology* 106, 1788–1793.
- Husen, T.J., Kamble, S.T., Stone, J.M., 2015. Effect of pentoxifylline on chitinolytic enzyme activity in the Eastern subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Entomological Science* 50, 295–310.
- Issartel, J., Boulo, V., Wallon, S., Geffard, O., Charmantier, G., 2010. Cellular and molecular osmoregulatory responses to cadmium exposure in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). *Chemosphere* 81, 701–710.
- Jeuniaux, C., 1975. III. Chitine et complexes chitino-protéiques de la cuticule. *Traité de zoologie: Insectes: Téguments, système nerveux, organes sensoriels. Tome VIII, fascicule III* 31–44.
- Key, P.B., Wirth, E.F., Fulton, M.H., 2006. A review of grass shrimp, *Palaemonetes* spp., as a bioindicator of anthropogenic impacts. *Environmental Bioindicators* 1, 115–128.
- Lafontaine, A., Gismondi, E., Boulangé-Lecomte, C., Geraudie, P., Dodet, N., Caupos, F., Lemoine, S., Lagadic, L., Thomé, J.-P., Forget-Leray, J., 2016. Effects of chlordecone on 20-hydroxyecdysone concentration and chitinase activity in a decapod crustacean, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquatic toxicology* 176, 53–63.
- LeBlanc, G.A., 2007. Crustacean endocrine toxicology: a review. *Ecotoxicology* 16, 61–81.
- Lignot, J.-H., Spanings-Pierrot, C., Charmantier, G., 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture* 191, 209–245.
- Lorenzon, S., Francese, M., Ferrero, E.A., 2000. Heavy metal toxicity and differential effects on the hyperglycemic stress response in the shrimp *Palaemon elegans*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39, 167–176.

- Luo, J., Pei, S., Jing, W., Zou, E., Wang, L., 2015. Cadmium inhibits molting of the freshwater crab *Sinopotamon henanense* by reducing the hemolymph ecdysteroid content and the activities of chitinase and N-acetyl- β -glucosaminidase in the epidermis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 169, 1–6.
- McKenney Jr, C.L., 2005. The influence of insect juvenile hormone agonists on metamorphosis and reproduction in estuarine crustaceans. *Integrative and Comparative Biology* 45, 97–105.
- Mesquita, S.R., Guilhermino, L., Guimarães, L., 2011. Biochemical and locomotor responses of *Carcinus maenas* exposed to the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. *Chemosphere* 85, 967–976.
- Mesquita, S.R., Ergen, Ş.F., Rodrigues, A.P., Oliva-Teles, M.T., Delerue-Matos, C., Guimarães, L., 2015. N-acetyl- β -d-glucosaminidase activity in feral *Carcinus maenas* exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology* 159, 225–232.
- Montagna, M.C., Collins, P.A., 2007. Survival and growth of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda; Caridea) exposed to insecticides with chlorpyrifos and endosulfan as active element. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53, 371–378.
- Moreno, P.A.R., Medesani, D.A., Rodríguez, E.M., 2003. Inhibition of molting by cadmium in the crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda Brachyura). *Aquatic toxicology* 64, 155–164.
- Neues, F., Ziegler, A., Epple, M., 2007. The composition of the mineralized cuticle in marine and terrestrial isopods: a comparative study. *CrystEngComm* 9, 1245–1251.
- Núñez-Nogueira, G., Rainbow, P.S., 2005. Cadmium uptake and accumulation by the decapod crustacean *Penaeus indicus*. *Marine environmental research* 60, 339–354.
- Olesen, J., 2013. The crustacean carapace—morphology, function, development, and phylogenetic history. *Functional morphology and diversity* 1, 103.
- Peng, Y., Ji, W., Zhang, D., Ji, H., Liu, S., 2019. Composition and content analysis of fluoride in inorganic salts of the integument of Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Scientific reports* 9, 1–6.
- Plaistow, S.J., Troussard, J.-P., Cézilly, F., 2001. The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host *Gammarus pulex*. *International journal for parasitology* 31, 346–351.
- Pratoomchat, B., Sawangwong, P., Pakkong, P., Machado, J., 2002. Organic and inorganic compound variations in haemolymph, epidermal tissue and cuticle over the molt cycle in

- Scylla serrata* (Decapoda). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 131, 243–255.
- Promwikorn, W., Boonyoung, P., Kirirat, P., 2005. Histological characterization of cuticular depositions throughout the molting cycle of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Songklanakarin J. Sci. Technol 27, 765–772.
- Qi, S., Wang, Chen, Chen, X., Qin, Z., Li, X., Wang, Chengju, 2013. Toxicity assessments with *Daphnia magna* of Guadipyr, a new neonicotinoid insecticide and studies of its effect on acetylcholinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and chitobiase activities. Ecotoxicology and environmental safety 98, 339–344.
- R Core Team, 2018. R: a language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, n.d.
- Rainbow, P.S., 1997. Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. Estuarine, coastal and shelf science 44, 169–176.
- Rainbow, P.S., 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. Marine pollution bulletin 31, 183–192.
- Rao, F.V., Andersen, O.A., Vora, K.A., DeMartino, J.A., Van Aalten, D.M., 2005. Methylxanthine drugs are chitinase inhibitors: investigation of inhibition and binding modes. Chemistry & biology 12, 973–980.
- Reddy, P.S., Bhagyalakshmi, A., 1994. Changes in oxidative metabolism in selected tissues of the crab (*Scylla serrata*) in response to cadmium toxicity. Ecotoxicology and environmental safety 29, 255–264.
- Reddy, P.S., Devi, M., Sarojini, R., Nagabhushanam, R., Fingerman, M., 1994. Cadmium chloride induced hyperglycemia in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*: possible role of crustacean hyperglycemic hormone. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology 107, 57–61.
- Richard, P., 1978. Influence de la température sur la croissance et la mue de *Palaemon serratus* en fonction de leur taille. Aquaculture 14, 13–22.
- Richards, S.M., Kelly, S.E., Hanson, M.L., 2008. Zooplankton chitobiase activity as an endpoint of pharmaceutical effect. Archives of environmental contamination and toxicology 54, 637–644.
- Rødde, R.H., Einbu, A., Vårum, K.M., 2008. A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). Carbohydrate polymers 71, 388–393.

- Rollin, M., Coulaud, R., Rocher, B., Duflot, A., Poret, A., Le Foll, F., Xuereb, B., 2021. N-acetyl- β -d-glucosaminidase activity in *Palaemon serratus*-Methodological optimisation and intrinsic variability. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 256, 110932.
- Romano, P., Fabritius, H., Raabe, D., 2007. The exoskeleton of the lobster *Homarus americanus* as an example of a smart anisotropic biological material. *Acta Biomaterialia* 3, 301–309.
- Shahidi, F., Synowiecki, J., 1991. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *Journal of agricultural and food chemistry* 39, 1527–1532.
- Sire, A., Amouroux, I., 2016. Détermination de Valeurs Guides Environnementales (VGE) mollusques alternatives aux Normes de Qualité Environnementale (NQE) définies dans la DCE.
- Soegianto, A., Charmantier-Daures, M., Trilles, J.-P., Charmantier, G., 1999. Impact of cadmium on the structure of gills and epipodites of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *Aquatic Living Resources* 12, 57–70.
- Soin, T., Verslycke, T., Janssen, C., Smagghe, G., 2009. Ecdysteroids and their importance in endocrine disruption research, in: *Ecdysone: Structures and Functions*. Springer, pp. 539–549.
- Song, Y., Villeneuve, D.L., Toyota, K., Iguchi, T., Tollefsen, K.E., 2017. Ecdysone receptor agonism leading to lethal molting disruption in arthropods: review and adverse outcome pathway development. *Environmental science & technology* 51, 4142–4157.
- Subramoniam, T., 2016. Sexual biology and reproduction in crustaceans. Academic Press.
- Sunda, W.G., Engel, D.W., Thuotte, R.M., 1978. Effect of chemical speciation on toxicity of cadmium to grass shrimp, *Palaemonetes pugio*: importance of free cadmium ion. *Environmental Science & Technology* 12, 409–413.
- Taylor, D., 1983. The significance of the accumulation of cadmium by aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 7, 33–42.
- Taylor, L.J., Mann, N.S., Daoud, D., Clark, K.F., van den Heuvel, M.R., Greenwood, S.J., 2019. Effects of sublethal chlorpyrifos exposure on postlarval American lobster (*Homarus americanus*). *Environmental toxicology and chemistry* 38, 1294–1301.
- Tsirilakis, K., Kim, C., Vicencio, A.G., Andrade, C., Casadevall, A., Goldman, D.L., 2012. Methylxanthine inhibit fungal chitinases and exhibit antifungal activity. *Mycopathologia* 173, 83–91.

- Van Handel, E., 1985a. Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. J. Am. Mosq. Control Assoc 1, 299–301.
- Van Handel, E., 1985b. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. J Am Mosq Control Assoc 1, 302–304.
- Wang, Y., Chang, Y., Yu, L., Zhang, C., Xu, X., Xue, Y., Li, Z., Xue, C., 2013. Crystalline structure and thermal property characterization of chitin from Antarctic krill (*Euphausia superba*). Carbohydrate polymers 92, 90–97.
- Weis, J.S., 1976a. Effects of mercury, cadmium, and lead salts on regeneration and ecdysis in the fiddler crab, *Uca pugilator*. Fish. Bull.:(United States) 74.
- Weis, J.S., 1976b. Effects of environmental factors on regeneration and molting in fiddler crabs. The Biological Bulletin 150, 152–162.
- Weis, J.S., Cristini, A., Ranga Rao, K., 1992. Effects of pollutants on molting and regeneration in Crustacea. American Zoologist 32, 495–500.
- White, S.L., Rainbow, P.S., 1986. Accumulation of cadmium by *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda). Mar. Ecol. Prog. Ser 32, 17–25.
- Williams, L., 2012. The effects of river sediment, endosulfan, and moderate hypoxia on blue crabs (*Callinectes sapidus*) from the tidal, freshwater James River.
- Wu, J.P., Chen, H.-C., 2004. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Chemosphere 57, 1591–1598.
- XIE, X., HUANG, Q., WEI, X., DU, J., WANG, Y., KE, C., CHEN, Q., 2009. The Effects of Some Aquacultural Disinfectors on the Activity of NAGase from Prawn (*Litopenaeus vannamei*). Journal of Hydroecology.
- Xie, X.-L., Chen, Q.-X., 2004. Inactivation kinetics of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*) in dioxane solution. Biochemistry (Moscow) 69, 1365–1371.
- Yang, Z., Zhao, Y., Zhou, Z., Yang, J., 2006. Effects of water CuSO_4 concentration on molting, growth and survival of *Eriocheir sinensis*. Acta Hydrobiologica Sinica 30, 569.
- Zhao, D., Huang, W.-C., Guo, N., Zhang, S., Xue, C., Mao, X., 2019. Two-step separation of chitin from shrimp shells using citric acid and deep eutectic solvents with the assistance of microwave. Polymers 11, 409.
- Zou, E., 2020. Invisible endocrine disruption and its mechanisms: A current review. General and comparative endocrinology 293, 113470.

- Zou, E., 2009. Effects of Hypoxia and Sedimentary Naphthalene on the Activity of N-acetyl- β -Glucosaminidase in the Epidermis of the Brown Shrimp, *Penaeus aztecus*. Bulletin of environmental contamination and toxicology 82, 579–582.
- Zou, E., 2005. Impacts of xenobiotics on crustacean molting: the invisible endocrine disruption. Integrative and Comparative Biology 45, 33–38.
- Zou, E., Fingerman, M., 1999b. Effects of estrogenic agents on chitobiase activity in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca pugilator*. Ecotoxicology and environmental safety 42, 185–190.
- Zou, E., Fingerman, M., 1999a. Effects of exposure to diethyl phthalate, 4-(tert)-octylphenol, and 2, 4, 5-trichlorobiphenyl on activity of chitobiase in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca pugilator*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology 122, 115–120.
- 杜娟 D., 安刚, 谢晓兰, 黄乾生, 王烨, 陈清西, 2008. Commonly used antibacterial drugs for breeding on the shell membrane of *Penaeus vannamei* Effect of N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity. 厦门大学学报: 自然科学版 47, 883–886.
- 杨学敏 Y., 谢进金, 张继平, 林建成, 陈清西, 2006. Effect of metal ions on the activity of NAGase. 台湾海峡 25, 343–347.
- 林建城 L., 王悦, 谢晓兰, 龚敏, 陈清西, 2005. Effects of metal ions on activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*). 台湾海峡 24, 78–82.
- 潘小芳 P., 汪荣峰, 黄金敏, 2007. Effect of metal ions on the activity of *Tenebrio molitor* NAGase. 泉州师范学院学报 25, 113–117.
- 潘小芳 P., 谢晓兰 X., 徐海金 X., 赖志青 L., 2006b. Effect of organic solvents on the activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase from *Tenebrio molitor*. 宁德师专学报: 自然科学版 18, 352–356.
- 王悦 W., 谢晓兰 X., 王勤 W., 陈清西 C., 2004. Effect of Ethanol on Activity and Conformation of β -N-Acetyl-D-glucosaminidase from Prawn (*Penaeus vannamei*). 厦门大学学报 (自然科学版).
- 颜雅雯 Y., 张继平 Z., 王勤 W., 谢进金 X., 陈清西 C., 2007. Effects of fungus drugs on the activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase of Saw-saw crab. 台湾海峡 26, 231–235.

6.2. Application *in situ*

Note n°1 :

Etude de l'activité de la N-acétyl- β -D-Glucosaminidase et des propriétés structurales de la cuticule chez des spécimens de *Palaemon serratus* prélevés en baie de Seine

Résumé

Après avoir établi des protocoles de mesure robustes pour évaluer l'activité de la N-Acétyl- β -D-Glucosaminidase (NAGase) et déterminer les propriétés structurales inhérentes à la cuticule de la crevette marine *Palaemon serratus*, ces marqueurs associés à la mue ont été déployés lors d'une prospection terrain réalisée en 2019. Ainsi, l'objectif de cette étude était de déterminer la capacité des marqueurs déployés à renseigner de la qualité de mue *in situ*. Pour ce faire, six sites présents le long du littoral de la baie de Seine, et historiquement connus pour présenter des qualités chimiques de l'eau contrastées, ont été prospectés.

A l'issue de cette campagne, les mesures d'activités NAGase ainsi que la composition de surface des cuticules ont montré des différences de réponse selon les sites prospectés. De plus, ces différences étaient en adéquation avec l'historique de contamination recensé sur les différents sites. En revanche, si la composition cuticulaire déterminée par analyse ATG a mis en avant des différences entre les sites, celle-ci ne suivait pas le même profil que les autres marqueurs de mue. Ces résultats sont prometteurs pour l'utilisation des marqueurs de mue sur les populations naturelles, tout en soulignant l'importance de connaître les différents facteurs susceptibles de faire varier la réponse suivie.

Mots-clés : *in situ*, qualité de la mue, N-Acétyl- β -D-Glucosaminidase, propriétés structurales, *Palaemon*

Etude de l'activité de la N-acétyl- β -D-Glucosaminidase et des propriétés structurales de la cuticule chez des spécimens de *Palaemon serratus* prélevés en baie de Seine

1. Introduction

Depuis les dernières décennies, les faisceaux de preuves concernant la perturbation du processus de mue chez les crustacés par l'action des xénobiotiques se sont accumulés. Ce développement de connaissances a néanmoins été permis par la découverte et l'approfondissement des mécanismes moléculaires et tissulaires sous tendus pendant le cycle de mue (Skinner, 1962 ; Song *et al.* 2017). Toutefois, en l'absence de méthodologies et d'outils adaptés pour un tel diagnostic, l'altération du processus de mue en condition *in natura* reste à ce jour très peu décelable, demeurant une perturbation invisible telle qu'énoncée par Zou (2005).

Parmi les méthodes développées afin de détecter la présence d'altération de la mue en conditions contrôlées de laboratoire, les marqueurs individuels associés à la physiologie et aux traits de vie des organismes (*i.e.* temps d'intermue, succès de mue) ont été parmi les plus utilisés (*e.g.* Montagna & Collins, 2007 ; Gonzalez-Ortegón *et al.* 2015 ; Vrinda *et al.* 2019). Toutefois, afin d'être déployés *in natura*, ces marqueurs individuels nécessitent le déploiement d'une méthodologie permettant un contrôle des organismes vis-à-vis de leur taille, âge et paramètres physiologiques tels que le stade de mue. Si de telles méthodologies sont appliquées chez des espèces modèles fortement connues, à l'image de l'amphipode *Gammarus fossarum* (Chaumot *et al.* 2020 ; Lopes *et al.* 2020), celles-ci sont rares voire non mis en œuvre chez la plupart des crustacés. De plus, en conditions contrôlées comme *in situ*, l'utilisation des marqueurs individuels ne permet pas de mettre en évidence des altérations directes de la mue par l'action de contaminants, rendant difficilement compte des mécanismes d'actions de ces derniers sur la régulation de la mue. A l'opposé des marqueurs individuels se trouvent les marqueurs moléculaires associés à la régulation hormonale de la mue. Ces cibles (*e.g.* mécanismes de synthèse et régulation d'ecdystéroïdes, activités au niveau des récepteurs d'ecdysone) s'avèrent être sensibles à une large gamme de contaminants (*e.g.* Tuberty & McKenney, 2005 ; Lye *et al.* 2008 ; Abidi *et al.* 2016), permettant de détecter des perturbations spécifiques du processus de mue. Néanmoins, l'utilisation de ces marqueurs moléculaires a jusque-là été exclusivement réalisée en conditions contrôlées de laboratoire. De plus, lors d'expositions à des contaminants,

les variations de réponse obtenues par les cibles moléculaires associées à la régulation hormonale permettent difficilement d'estimer les conséquences finales sur le processus physiologique de mue. Compte tenu de la variabilité des réponses induites par certains facteurs intrinsèques (*e.g.* taille, âge, stade de mue), ce constat est particulièrement vrai en conditions non contrôlées, tels que lors d'approches passives *in situ*.

Une approche complémentaire pour pallier ce manque d'information consiste en l'étude des effecteurs moléculaires localisés en aval des cascades de régulation hormonale du processus de mue. En raison de leur position, l'étude de ces cibles permet de bénéficier d'une approche spécifique au mécanisme d'action des xénobiotiques, tout en rendant compte des conséquences sur le processus physiologique de la mue.

Parmi ces cibles moléculaires, la N-Acétyle- β -D-Glucosaminidase (NAGase) présente plusieurs intérêts à être déployée en tant que marqueur de qualité de mue chez les crustacés. Cette enzyme chitinolytique forme avec la chitinase le système moléculaire assurant la dégradation de la chitine de l'ancienne cuticule lors de la prémue (Jeuniaux, 1975 ; Gooday, 1990). De plus, l'activité de cette enzyme est facile à suivre, notamment à l'aide d'un substrat spécifique auquel est greffé un ligand chromogénique. Les caractéristiques des NAGase des crustacés ont fait l'objet de quelques études, permettant d'adapter une méthode de mesure robuste et répétable sur plusieurs espèces (*Uca pugilator* : Zou & Fingerman, 1999a ; *Scylla serrata* : Zhang et al. 2006 ; *Daphnia magna* : Espie & Roff, 1995 ; *Euphausia superba* & *Meganyctiphanes norvegica* : Spindler & Buchholz, 1988 ; Buchholz & Vetter, 1993 ; *Litopenaeus vannamei* : Xie et al. 2004). D'un point de vue toxicologique, l'activité de la NAGase a exprimé une sensibilité à une large gamme de contaminants dont les métaux lourds (Luo et al. 2015 ; Mesquita et al. 2015), les solvants organiques (4-octylphenol : Zou & Fingerman, 1999b), les PBDE et PCB (Zou & Fingerman, 1999b,c ; Gismondi & Thomé, 2014), les pesticides (Zou & Fingerman, 1999b ; Williams, 2012 ; Lafontaine et al. 2016 ; Qi et al. 2018 ; De Melo et al. 2020), les produits plastifiants (Zou & Fingerman, 1999c), les hydrocarbures (Zou, 2009) et les substances médicamenteuses (Zou & Fingerman, 1999b ; Richards et al. 2008 ; Mesquita et al. 2011 ; Husen et al. 2015 ; Chen et al. 2019). En parallèle, la mesure en conditions contrôlées de l'activité NAGase dans des échantillons d'eau a pu être corrélée à la biomasse de population de crustacés planctoniques y résidant (Oosterhuis et al. 2008 ; Sastri & Roff, 2000 ; Sastri et al. 2013). De telles mesures ont permis, par le déploiement d'approches passives, de mettre en évidence des variations spatiales et temporelles d'état de santé des communautés de crustacés présentes en écosystèmes fluviaux (Hanson & Lagadic,

2005) et estuariens (Avila *et al.* 2012). Si ce contexte de déploiement à montrer un intérêt de la mesure de NAGase en tant qu'indice globale de la qualité des écosystèmes aquatiques, aucune étude à notre connaissance ne rapporte des mesures de NAGase au sein des tissus de crustacés dans une perspective de diagnostic de leur état de santé et plus spécifiquement du processus de mue.

En parallèle, d'autres effecteurs tels que l'ensemble des propriétés structurales de la cuticule semblent être tout autant de prometteurs marqueurs pouvant être déployés en conditions *in natura*. Ces approches innovantes en écotoxicologie, permettent de rendre compte de l'intégrité de la mue au cours de son cycle. Principalement étudiées en conditions contrôlées pour caractériser la structure cuticulaire des crustacés et la nature des matériaux la composant (*e.g.* Hilton *et al.* 1984 ; Bosselmann *et al.* 2007 ; Neues *et al.* 2007 ; Romano *et al.* 2007 ; Fabritius *et al.* 2012), ces propriétés ont néanmoins la capacité de détecter des changements de structure imputables au cycle de mue (Pratoomchat *et al.* 2002 ; Calhoun & Zou, 2016), au mode de vie (Neues *et al.* 2007) ainsi qu'aux dégradations structurales (Romano *et al.* 2007 ; Gbenebor *et al.* 2016 ; Huang *et al.* 2018). Toutefois, à l'instar de l'activité de la NAGase, ces propriétés n'ont jamais été utilisées en vue de renseigner la qualité de la cuticule des organismes présents en milieu naturel.

Au cours de nos précédents travaux, une attention particulière au développement et à l'optimisation des méthodologies de mesure de l'activité de la NAGase ([article 1, section 4.1.](#)) et de l'analyse des propriétés structurales de la cuticule ([article 3, section 5.1.](#)) chez la crevette *Palaemon serratus*. En parallèle, l'étude des réponses au cours du cycle de mue a permis de mettre en évidence ce cycle comme un étant un facteur de modulations de la réponse des deux marqueurs d'intérêt. Par la suite, des expositions *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées afin de déceler des altérations de l'activité de la NAGase et des propriétés structurales de la cuticule, permettant d'observer des effets généralement de faible ampleur ([article 2 et 4, section 4.2. et 6.1.](#)).

Ainsi, l'objectif de cette étude était de mettre en application les méthodologies de mesure de l'activité de la NAGase et des propriétés structurales de la cuticule chez *Palaemon serratus*, dans un contexte environnementalement réaliste. Pour ce faire, l'approche passive par collecte de crevettes bouquet au sein de sites localisés en baie de Seine et présentant des niveaux de contamination (et donc une charge en contaminants de différentes natures) contrastés historiquement connus (Table 1). Ainsi, les réponses obtenues à l'issue de cette étude permettront d'estimer si la méthodologie d'utilisation des effecteurs moléculaires permet de

renseigner de la qualité de mue *in situ* ou, le cas échéant, s'il est nécessaire d'approfondir les connaissances sur la réponse de ces effecteurs.

2. Matériels et méthodes

2.1. Description des sites d'étude

Durant la période de septembre à octobre 2019, une prospection de six sites localisés le long de la baie de Seine, Yport, Antifer Nord, Antifer Sud, Octeville, Cap de la Hève et Longues sur mer, a été réalisée (Fig 1). De plus, ces sites sont connus pour présenter des niveaux de pollution et contaminants biodisponibles contrastés, remarquables par i) le suivi de la teneur en contaminants modèles des eaux du littoral, effectué par le Réseau d'Observation de la Contamination Chimique (ROCCH : <https://wwz.ifremer.fr/littoral/Reseaux-de-surveillance/Environnement/ROCCH-Reseau-d-Observation-de-la-Contamination-CHimique-du-littoral>), ainsi que ii) le suivi annuel depuis 2015 en baie de Seine de l'imprégnation génotoxique de la population de *Palaemon serratus* réalisé au sein du laboratoire SEBIO Le Havre (Table 1) Plus précisément, les sites du Cap de la Hève, d'Octeville et d'Antifer sud sont historiquement connus pour se situer dans la zone d'influence de la dérive du panache sédimentaire issu de l'estuaire de Seine. La dérive sédimentaire charrie également des contaminants en suspension, se déposant le long du littoral entre le Cap de la Hève et Antifer sud. Au nord de ce dernier se trouve une digue de 4 km de longueur, faisant dériver le panache au large, protégeant ainsi les sites plus au nord. Ainsi, bien qu'espacés de seulement quelques kilomètres, les sites d'Antifer sud et nord présentent des niveaux de contamination totalement contrastés. Ce constat tend toutefois à varier selon les années (montrant une haute variabilité inter-individuelle des outils mesurés), avec des niveaux de contaminations s'élevant à Antifer nord et inversement à Antifer sud. En revanche, les sites d'Yport et de Longues sur mer, en raison de leur position respective au nord de la digue d'Antifer et au sud de la baie de Seine, sont relativement épargnés par le panache sédimentaire, montrant des niveaux d'impacts classiquement faibles.



Figure 1 Localisation géographique des sites prospectés en baie de Seine, durant le mois d'octobre 2019

Table 1 Caractérisation du niveau de qualité des sites prospectés au regard de l'indice de contamination du biote (calculé sur la base des données de bioaccumulation des bivalves publiées par le ROCCH pour l'année 2015-2016 ; selon Erraud *et al.* 2018b) et des niveaux de génotoxicité mesurés sur spermatozoïdes de crevettes durant l'automne 2019

Stations	Indice de contamination ROCCH	Indice génotoxique (UA)
Yport	1,8	62,9
Antifer nord	N.D.	71,0
Antifer sud	3,2	79,3
Octeville	N.D.	89,0
Cap de la Hève	6	69,4
Longues sur mer	2	54,0

2.2. Collecte des organismes et prélèvement du matériel biologique

Pour réaliser la prospection, les spécimens *Palaemon serratus* ont été collectés à l'aide d'épuisettes à marée basse au sein des flaques présentes dans la zone intertidale. Lors de la collecte, les organismes ont été sexés par la présence des caractères sexuels secondaires décrits par Erraud *et al.* (2018a). Les individus ainsi collectés ont été rapportés au laboratoire dans l'heure suivante, en utilisant des seaux en propylène de 15 L contenant de l'eau de site. De retour au laboratoire, les crevettes ont été mises sous oxygénation constante à $19 \pm 1^\circ\text{C}$ avec une photopériode de 16 : 8 jour : nuit, avant leur utilisation le jour suivant.

En amont des analyses, dans le but de minimiser l'influence des facteurs confondants, les organismes ont été sélectionnés afin de posséder une taille et un stade de mue homogène. Ainsi, la mesure de la longueur totale des organismes a permis d'estimer une taille homogène entre les sites situés entre 3 et 5 cm. De même, l'identification des stades de mue par observation de la sétogenèse au niveau des uropodes (Erraud *et al.* 2018a) a permis de révéler la présence majoritaire de crevettes en intermue-début de prémue. La synchronisation autour des stades C à D1' a été retenue lors de cette prospection. Cette période correspond à la proportion maximale des individus collectés au sein des sites de la baie de Seine, ainsi qu'au plateau basal d'activité de la NAGase (Article 1, section 4.1.) et à une stabilité des propriétés thermiques et chimiques (Article 3, section 5.1.).

Les individus sélectionnées, mâles comme femelles, ont par la suite été déposés sur de la glace en vue d'y être disséqués. Les uropodes et le dernier segment abdominal (*i.e.* muscles et épidermes séparés de la cuticule les bordant) ont été extraits puis placés dans des microtubes, pesés avant d'être congelés dans de l'azote liquide pour être stockés *in fine* à -80 °C. La cuticule de l'abdomen a été coupée en deux le long de l'axe antéro-postérieur puis séparée du reste des tissus organiques. Chaque demi-cuticule ainsi récupérée a été maintenue dans de l'eau de mer (*i.e.* eau provenant de Deauville et utilisée en thalassothérapie, 30 psu, filtrée à 0,22 µm), à 4 °C, pour une durée maximum de 24 h dans l'attente d'être lyophilisé durant 2 h. Les cuticules ainsi lyophilisées ont été stockées à -20 °C.

2.3. Mesure de l'activité de la N-Acétyle-β-D-Glucosaminidase

La mesure de l'activité de la NAGase chez les spécimens *P. serratus* a été réalisée sur deux tissus différents : le dernier segment abdominal et les uropodes, selon les protocoles adaptés et optimisés décrits au sein de l'article 1 présent en section 4.1. Brièvement, l'extrait enzymatique a été obtenu par ajout de tampon citrate phosphate (pH 5,15 ; 17,5 mmol.L⁻¹) selon un ratio poids : volume de 1 : 8 et 1 : 10 pour le segment et les uropodes respectivement. Le mix a été homogénéisé à l'aide d'un Precellys® puis centrifugé à 4°C. La réaction enzymatique a été effectuée en microplaques 96 puits, en ajoutant un mélange de tampon citrate phosphate et de substrat spécifique (le 4-nitrophényl-N-Acétyle-B-D-Glucosaminide : 4-NAG à 750 et 1500 µmol.L⁻¹ pour le dernier segment et les uropodes respectivement) à un volume adéquat d'extrait enzymatique (respectivement 30 et 20 µL pour le dernier segment et les uropodes). La réaction a été réalisée à 37°C en triplicat de mesure pour chaque échantillon. Afin d'arrêter la

réaction, 20 μL de NaOH à 1 mol.L^{-1} a été inoculé dans chaque puit, stoppant définitivement la réaction et permettant de révéler la coloration inhérente à la libération du nitrophénol par action de la NAGase sur le substrat. En vue d'estimer l'activité de l'enzyme, deux temps d'arrêt à respectivement 10 et 20 min ont été réalisés, permettant de calculer l'activité enzymatique selon la formule suivante :

$$\text{Activité de la NAGase (nmol..min}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta A}{\epsilon.l} * V$$

Où $\Delta A = \frac{\text{Absorbance moyenne à 15 min} - \text{Absorbance moyenne à 5 min}}{15 \text{ min} - 5 \text{ min}}$, avec ϵ , le coefficient molaire du nitrophénol (18300 $\text{L.mol}^{-1} .\text{cm}^{-1}$), l la longueur du trajet optique dans le milieu (0.486 cm) et V le volume du milieu réactionnel.

2.4. Mesure des propriétés cuticulaires de *Palaemon serratus*

La description de la mesure des propriétés cuticulaires est **décrite dans la section 3.3.**, brièvement rappelée au cours des prochaines lignes.

Analyse des propriétés thermiques. L'analyse Thermogravimétrique (ATG) des cuticules de *P. serratus* a été réalisée à l'aide d'un analyseur Setsys® Setaram (Caluire-et-Cuire, France). Cette analyse permet d'obtenir des informations relatives à la composition du matériau analysé. Ainsi, 15 à 20 mg de cuticule, représentant $\frac{3}{4}$ des demi-cuticules échantillonnées, ont été placés dans un creuset en alumine descendu dans un four sous oxygénation. A l'intérieur du four, chaque échantillon a été soumis au programme de chauffage suivant : 10 min d'isotherme à 20°C, puis chauffage de 20 à 900°C à 10°C.min⁻¹ avant une isotherme réalisée pendant 10 min à 900°C. Chaque événement a été déterminé par une température d'événement (T_{event} , représentant la température à laquelle le taux de dégradation de l'échantillon est au maximum), ainsi qu'un pourcentage de perte de masse de l'échantillon.

Composition chimique de surface. La composition chimique de la surface des faces internes et externes des cuticules de *P. serratus* a été déterminée par IRTF, en utilisant un spectromètre Perkin Elmer Frontier possédant un accessoire de réflectance totale atténuée en ZnSe/diamant. Pour chaque face, 3 observations ont été réalisées, moyennées sur 16 runs d'analyses chacune, à une résolution de 4 cm^{-1} entre les longueurs d'onde de 650 à 4000 cm^{-1} . Chacune des 3 observations été effectuée sur un sous-échantillon de cuticule différent afin de prévenir d'une éventuelle superposition des spectres engendrée par un écrasement successif de l'échantillon.

2.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R studio v1.2.5019 (R Core Team, 2018). La normalité des données a été évaluée par le test de Shapiro-Wilk, tandis que l'homoscédasticité a été vérifiée à l'aide du test de Bartlett. Les différences d'activité de la NAGase ont été établies à l'aide du test d'ANOVA, suivi d'une analyse post-hoc par utilisation de la fonction *pairwise.t.test*. La présence de modulations des propriétés thermiques a été évaluée à l'aide du test de Kruskal-Wallis. Les spectres IRTF ont été obtenus à l'aide du logiciel de data mining Orange®, dont la fonction ACP a permis de mettre en évidence des différences entre les profils.

3. Résultats

3.1. Modulations de l'activité NAGase le long du littoral de la baie de Seine

Quel que soit le tissu considéré, l'activité NAGase de *Palaemon serratus* était significativement plus élevée à Yport (ANOVA, $p\text{-value} = 9.11 \times 10^{-3}$, Fig 2a, b). Cette haute activité est retrouvée chez les crevettes de Longues-sur-mer, qui ont une activité significativement différente des crevettes collectées au Cap de la Hève, à Octeville et à Antifer nord. A l'inverse, les activités les plus basses sont retrouvées au niveau des crevettes du Cap de la Hève et d'Octeville. Les crevettes d'Antifer nord et sud exprimaient des niveaux d'activité intermédiaires au niveau des deux tissus. Au niveau du segment abdominal, l'activité mesurée chez les crevettes d'Antifer nord était proche de celle mesurée chez les crevettes d'Octeville et du Cap de la Hève, tandis que les crevettes d'Antifer sud présentaient des niveaux plus élevés. A l'inverse, l'activité mesurée sur les uropodes des crevettes d'Antifer sud présentait des niveaux similaires à celles d'Octeville et du Cap de la Hève, tandis que les crevettes d'Antifer nord montraient des activités plus élevées.

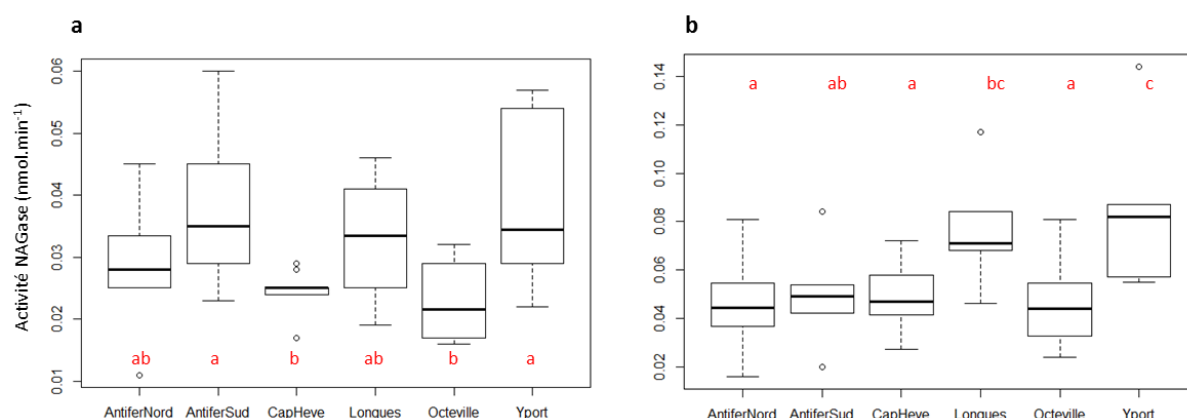


Figure 2 Activités NAGase mesurées sur le dernier segment abdominal (a) et les uropodes (b) des spécimens sélectionnés de *Palaemon serratus* (i.e. stade de mue entre C et D1') collectés au sein des différents sites de la baie de Seine (i.e. Yport : n = 6, Antifer nord : n = 8, Antifer sud : n = 7, Octeville : n = 8, Cap de la Hève : n = 9, Longues-sur-mer : n = 6)

3.2. Modulations des propriétés cuticulaires le long du littoral de la baie de Seine

La mesure des propriétés cuticulaires au cours de cette prospection de l'année 2019 n'a été effectuée qu'au niveau de 5 sites du littoral de la baie de Seine, les cuticules des crevettes du site Yport ayant été détériorées du fait d'un aléa logistique.

Composition de surface. Les spectres moyens des faces externes et internes des cuticules de crevettes collectées le long du littoral de la baie de Seine sont représentés en Fig 3a et 3b. Quelle que soit la face cuticulaire considérée, les bandes caractéristiques des spectres de *P. serratus* sont retrouvées (voir article 3 en section 5.1.). Au niveau de la face externe, les différences majeures entre les sites apparaissent au niveau des bandes 859 cm⁻¹ et 1 364 cm⁻¹, avec un gradient décroissant d'intensité selon les sites (Antifer Sud > Longues sur mer >>> Cap de la Hève > Longues sur mer > Octeville), ainsi qu'à 1733 cm⁻¹, avec un gradient d'intensité inverse. En ce qui concerne la face interne, les différences majeures apparaissent autour des bandes 957 cm⁻¹, 1013 cm⁻¹, 1065 cm⁻¹, 1376 cm⁻¹, 1540 cm⁻¹, 1642 cm⁻¹ avec un gradient d'intensité décroissant selon les sites (Octeville > Antifer nord > Cap de la Hève > Longues sur mer >>> Antifer sud), ainsi qu'à 1742 cm⁻¹ avec un gradient d'intensité inverse.

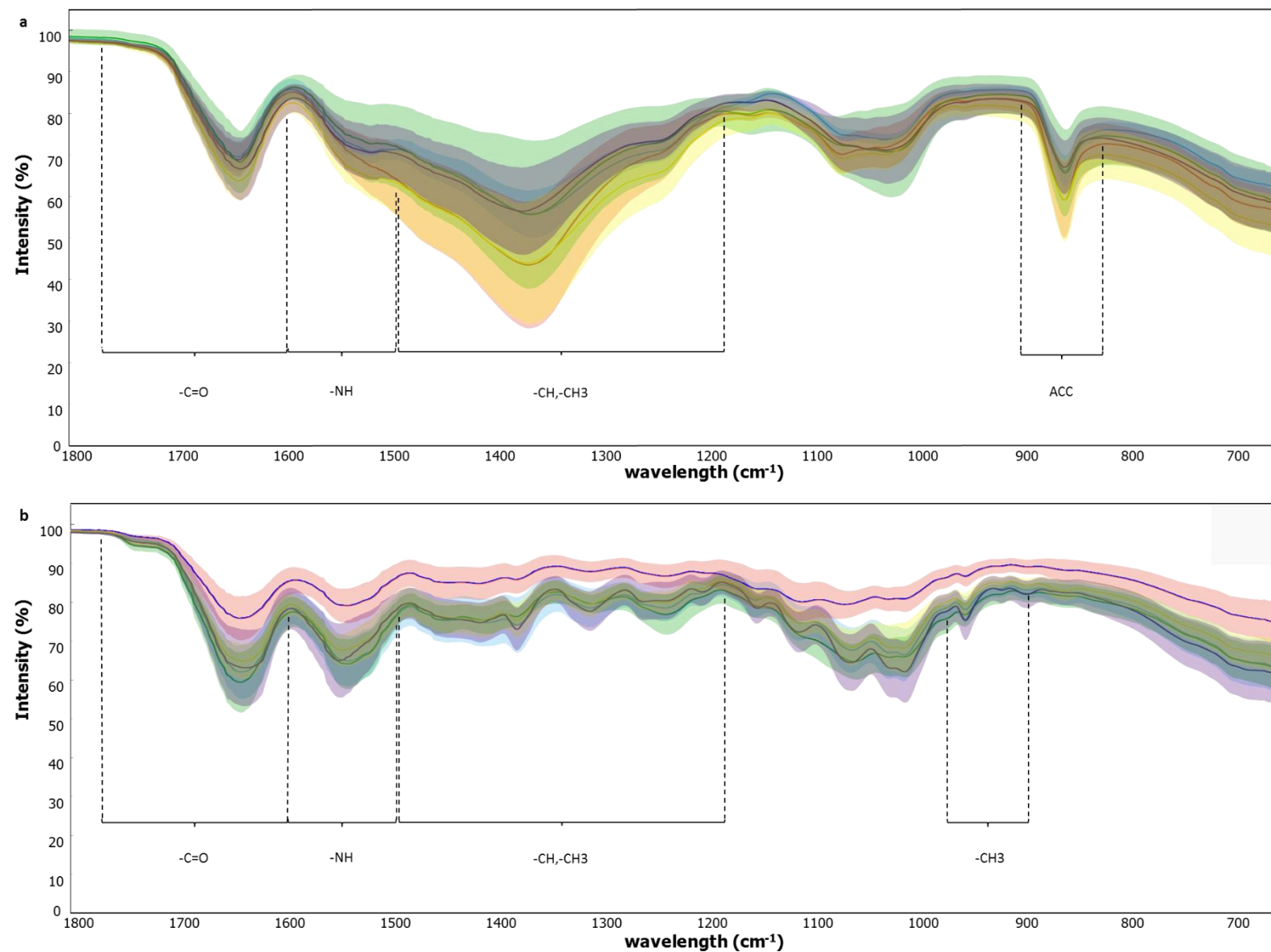
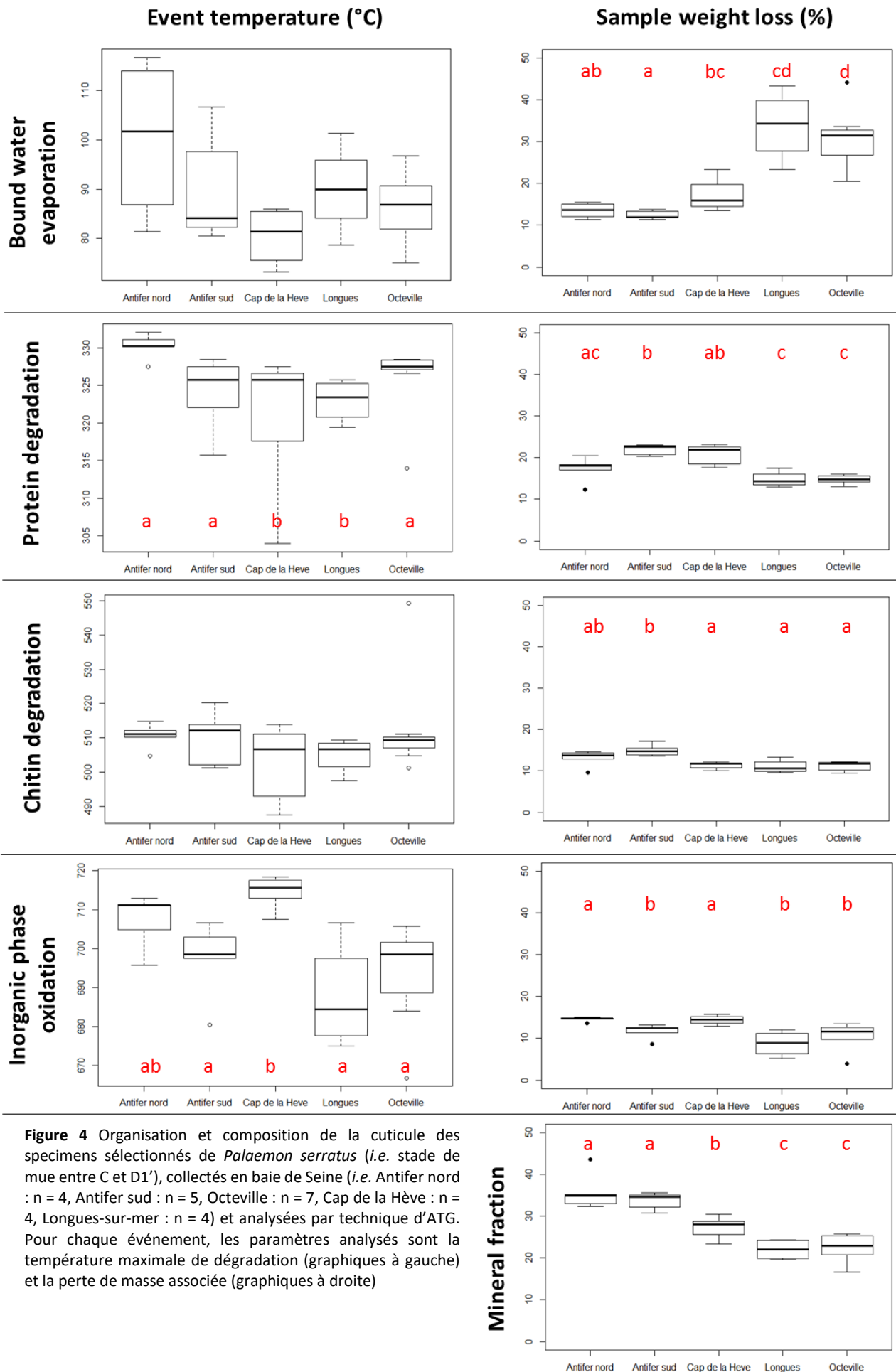


Figure 3 Spectres IRTF des faces externes (a) et internes (b) de la cuticule de spécimens de *Palaemon serratus* collectés le long du littoral de la Baie de Seine. Les différentes couleurs de courbes représentent les sites prospectés : jaune = Longues-sur-mer ; vert = Cap de la Hève ; violet = Octeville ; rouge = Antifer sud ; bleu = Antifer nord (cinq sites, n = 3 par site). Les courbes en gras correspondent aux moyennes des spectres obtenus pour les différents sites, tandis que les nuages colorés correspondent à l'écart-type associé aux moyennes.

Propriétés thermiques. Les résultats d'ATG représentant la composition et l'organisation cuticulaire des crevettes bouquet collectées sur les différents sites sont représentés en Fig 4. De manière générale, quatre événements sont observés en ATG : l'évaporation de l'eau liée, la dégradation des protéines hydrophiles, la dégradation de la chitine et l'oxydation des composés minéraux labiles. Concernant l'événement associé à l'eau liée, aucune différence n'est observée vis-à-vis de la température T_{event} (Kruskal-Wallis, $p\text{-value} > 0.05$). En revanche, la perte de masse associée était plus importante pour les crevettes de Longues-sur-mer et Octeville comparé à Antifer sud et Antifer nord (Kruskal-Wallis, $p\text{-value} = 1.00 \times 10^{-3}$). La dégradation des protéines a eu lieu à des températures plus basses pour les cuticules de crevettes issues du Cap de la Hève et de Longues-sur-mer (Kruskal-Wallis, $p\text{-value} = 3.51 \times 10^{-2}$). La perte de masse associée était plus importante chez les crevettes d'Antifer sud et du Cap de la Hève, et plus basse chez les crevettes de Longues-sur-mer et Octeville (Kruskal-Wallis, $p\text{-value} = 2.75 \times 10^{-3}$). Les crevettes d'Antifer nord présentaient une perte de masse intermédiaire par rapport aux autres sites, significativement différente des crevettes d'Antifer sud. Au niveau de l'événement associé à la dégradation de la chitine, la température T_{event} était similaire quel que soit le site étudié (Kruskal-Wallis, $p\text{-value} > 0.05$). En revanche, la perte de masse associée à la dégradation de la chitine était significativement plus importante chez les crevettes d'Antifer sud (Kruskal-Wallis, $p\text{-value} = 1.33 \times 10^{-2}$). L'oxydation des éléments inorganiques labiles s'est effectuée à plus haute température pour les crevettes collectées au Cap de la Hève (Kruskal-Wallis, $p\text{-value} = 1,28.10^{-2}$). De manière similaire, la perte de masse associée à cet événement est plus importante chez les crevettes du Cap de la Hève et d'Antifer Nord (Kruskal-Wallis, $p\text{-value} : 2,67.10^{-3}$). Lors de la fin du programme de chauffage, la fraction minérale restante est significativement plus importante pour les cuticules des crevettes d'Antifer nord et Antifer sud, et plus faible pour les crevettes provenant de Longues sur mer et Octeville (Kruskal-Wallis, $p\text{-value} = 7,23.10^{-4}$).



4. Discussion

4.1. Modulations de l'activité de la NAGase au sein de la baie de Seine

Au sein de la baie de Seine, l'activité de la NAGase apparaît plus élevée chez les crevettes d'Yport et de Longues sur mer, quel que soit le tissu examiné. *A contrario*, les niveaux les plus bas d'activité de la NAGase étaient systématiquement exprimés chez les crevettes du Cap de la Hève et d'Octeville. Ce contraste est cohérent avec la connaissance *a priori* de ces sites, notamment *via* leur position géographique et leur historique de contamination (voir le paragraphe « Matériel et Méthodes », section 3.1.1.). De plus, en comparant avec les données présentées dans l'article 1 présenté en section 4.1., obtenues avec des spécimens mâles de *P. serratus* présents au large des côtes (*i.e.* en dehors de l'influence du panache sédimentaire), les profils les plus proches en termes d'activité de la NAGase des uropodes et du dernier segment, pour un stade de mue similaire, corroborent avec les niveaux observés chez les crevettes de Longues-sur-mer et d'Yport. En ce qui concerne les sites d'Antifer nord et sud, les profils intermédiaires exprimés par la NAGase semblent fluctuer selon le tissu considéré. Le constat de profil intermédiaire semble relativement cohérent compte tenu de l'importante variabilité inter-individuelle et variabilité temporelle observées sur les données R.O.C.C.H et d'imprégnation génotoxiques recensées sur ces sites. Concernant la variabilité entre les tissus, le dernier segment abdominal et les uropodes avaient été les deux tissus recommandés à l'issue de l'optimisation méthodologique (voir article 1 en section 4.1.), notamment pour leur forte activité et faible variabilité inter-individuelle. La différence de profil dans la présente étude permettrait d'affiner le choix des tissus recommandés. En effet, les uropodes semblent davantage être cohérents avec les données de contamination enregistrées sur les sites, en particulier *i)* l'historique d'Antifer sud à être un site pollué, influencé par le panache sédimentaire de l'estuaire de Seine, et *ii)* la tendance actuelle d'Antifer nord à présenter des niveaux d'imprégnation chimiques et génotoxiques variables selon les années, avec une hausse globale du niveau de contamination. Cependant, afin de confirmer l'hypothèse des uropodes en tant que tissus préférentiels dans l'analyse de l'activité de la NAGase chez les spécimens *P. serratus*, un déploiement et une comparaison des deux tissus durant les prochains suivis de la qualité du littoral de baie de Seine sont préconisés.

4.2. Modulations des propriétés cuticulaires au sein de la baie de Seine

La chimie de surface a montré des variations selon les sites de prélèvement des crevettes. Ainsi, les sites d'Antifer sud et Longues-sur-mer présentaient des bandes intenses relatives aux formes amorphes de calcium (859 cm^{-1}) et à la chitine (1364 cm^{-1}), mais moins intenses au niveau de la bande représentant les liaisons peptidiques des protéines (1733 cm^{-1}). L'inverse a été observé au niveau des cuticules de crevettes d'Octeville et du Cap de la Hève particulièrement. Cette baisse d'intensité a déjà été observée auparavant, notamment lors d'exposition de cuticules à des conditions stringentes (voir article 3, section 5.1. ; Gbenebor *et al.* 2016). De plus, le profil de variation de chimie de surface observée chez les crevettes de la baie de Seine suit la même tendance que celui décrit par les activités des NAGases mesurées en parallèle.

Au regard des propriétés thermiques, les cuticules des crevettes des sites de Longues-sur-mer et d'Octeville présentent une organisation et composition cuticulaires différentes des autres sites prospectés (Fig 5). Cela se traduit par une teneur en eau plus chargée, ainsi qu'une teneur en minéraux moins importante que les cuticules présentes à Yport, Antifer nord et Antifer sud. Par ailleurs, les données présentées en section 4.1., issues de l'optimisation méthodologique des mesures des propriétés cuticulaires, s'avèrent être similaires à celles obtenues chez les crevettes d'Antifer sud. Toutefois, que ce soit par comparaison avec les autres résultats issus de cette prospection et par étude des niveaux d'imprégnation de chaque site, il apparaît étrange que des sites tels qu'Octeville et Longues sur mer soient appariés. En ce sens, il convient de davantage se focaliser sur les variabilités des réponses et sur les éventuels facteurs confondants afin de pouvoir mieux appréhender les résultats obtenus par prospections *in situ*.

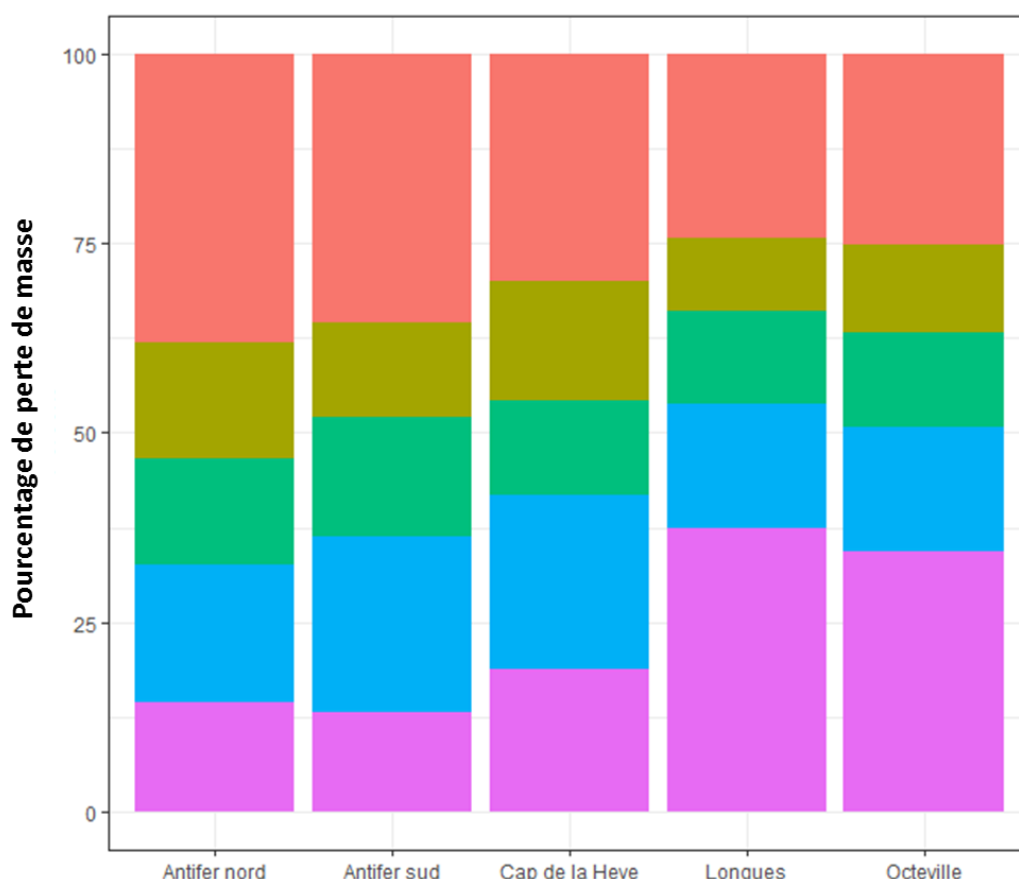


Figure 5 Variabilité de la composition cuticulaire des crevettes sélectionnées (*i.e.* stade de mue de C à D1') selon les sites prospectés en baie de Seine (*i.e.* Antifer nord : n = 4, Antifer sud : n = 5, Octeville : n = 7, Cap de la Hève : n = 4, Longues-sur-mer : n = 4). Les différentes couleurs représentent les matériaux composant la cuticule (violet = eau liée, bleu = protéine, vert = chitine, kaki = phase inorganique volatile, rose = fraction minérale restante), tandis que leur hauteur symbolise la proportion de ces matériaux.

5. Conclusion

Le déploiement d'une méthodologie *in situ* basée sur une approche passive a été permis via la description de la fluctuation du signal des outils tout au long du cycle de mue ([voir articles 1 et 3, sections 4.1. et 5.1.](#)). Ainsi, par synchronisation des stades de mue des organismes collectés, cette méthodologie a permis de mettre en évidence des disparités dans les marqueurs mesurés entre les différents sites prospectés au sein de la baie de Seine. A ce titre, la mesure de l'activité de la NAGase et la composition chimique de surface des cuticules ont montré une réponse cohérente avec le gradient de contamination connu, observé historiquement le long du littoral de la baie de Seine. En revanche, les propriétés thermiques, bien qu'ayant détecté des disparités inter-sites, restent difficiles à interpréter au regard des indices de contamination des sites, et méritent de plus amples investigations, dans un premier temps en conditions contrôlées, afin de mieux appréhender la variabilité des réponses observées. Pour l'ensemble des outils, il

est nécessaire d'acquérir plus de données issues de prospections *in situ* afin de comprendre les variations de réponses liées aux conditions naturelles ainsi qu'à la contamination du milieu. Cette amélioration de connaissances relatives aux déploiements des outils passe par l'acquisition de données sur une échelle temporelle et spatiale étendue, mais aussi le déploiement d'une méthodologie de monitoring actif. Cette dernière permettra une plus grande maîtrise de la variabilité inter-individuelle et d'établir un potentiel lien entre la réponse des outils déployés et le suivi d'autres marqueurs associés au déroulement de la mue (*e.g.* temps d'intermue).

Références bibliographiques

- Abidi, S., Abbaci, K.T., Geffard, O., Boumaiza, M., Dumet, A., Garric, J., Mondy, N., 2016. Impact of cadmium on the ecdysteroids production in *Gammarus fossarum*. *Ecotoxicology* 25, 880–887.
- Avila, T.R., de Souza Machado, A.A., Bianchini, A., 2012. Estimation of zooplankton secondary production in estuarine waters: comparison between the enzymatic (chitobiase) method and mathematical models using crustaceans. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 416, 144–152.
- Boßelmann, F., Romano, P., Fabritius, H., Raabe, D., Epple, M., 2007. The composition of the exoskeleton of two crustacea: The American lobster *Homarus americanus* and the edible crab *Cancer pagurus*. *Thermochimica Acta* 463, 65–68.
- Buchholz, F., Vetter, R.A.H., 1993. Enzyme kinetics in cold water: characteristics of N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in the Antarctic krill, *Euphausia superba*, compared with other crustacean species. *Journal of Comparative Physiology B* 163, 28–37.
- Calhoun, S., Zou, E., 2016. Epidermal carbonic anhydrase activity and exoskeletal metal content during the molting cycle of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 325, 200–208.
- Chaumot, A., Coulaud, R., Adam, O., Quéau, H., Lopes, C., Geffard, O., 2020. In situ reproductive bioassay with caged *Gammarus fossarum* (Crustacea): Part 1—Gauging the confounding influence of temperature and water hardness. *Environmental toxicology and chemistry* 39, 667–677.
- Chen, H., Gu, X., Zeng, Q., Mao, Z., 2019. Acute and chronic toxicity of carbamazepine on the release of chitobiase, molting, and reproduction in *Daphnia similis*. *International journal of environmental research and public health* 16, 209.
- de Melo, M.S., Nazari, E.M., Müller, Y.M.R., Gismondi, E., 2020. Roundup® disrupts chitinolytic enzyme activity and ecdysteroid concentration in *Macrobrachium potiana*. *Environmental Science and Pollution Research* 27, 43396–43402.

- Espie, P.J., Roff, J.C., 1995. Characterization of chitobiase from *Daphnia magna* and its relation to chitin flux. *Physiological zoology* 68, 727–748.
- Fabritius, H.-O., Karsten, E.S., Balasundaram, K., Hild, S., Huemer, K., Raabe, D., 2012. Correlation of structure, composition and local mechanical properties in the dorsal carapace of the edible crab *Cancer pagurus*. *Zeitschrift für Kristallographie-Crystalline Materials* 227, 766–776.
- Gbenebor, O.P., Adeosun, S.O., Lawal, G.I., Jun, S., 2016. Role of CaCO_3 in the physicochemical properties of crustacean-sourced structural polysaccharides. *Materials Chemistry and Physics* 184, 203–209.
- Gismondi, E., Thomé, J.-P., 2014. Effects of two PBDE congeners on the moulting enzymes of the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Environmental pollution* 191, 119–125.
- González-Ortegón, E., Giménez, L., Blasco, J., Le Vay, L., 2015a. Effects of food limitation and pharmaceutical compounds on the larval development and morphology of *Palaemon serratus*. *Science of the total environment* 503, 171–178.
- Gooday, G.W., 1990. The ecology of chitin degradation. *Advances in microbial ecology* 387–430.
- Hanson, M.L., Lagadic, L., 2005. Chitobiase activity as an indicator of aquatic ecosystem health. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 8, 441–450.
- Hilton, J., Sutcliffe, D.W., Carrick, T.R., Rigg, E., 1984. Major inorganic components in some freshwater crustaceans (Malacostraca), their exuviae and food items, and thermogravimetric-differential thermal analysis of organic and ash components. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 77, 13–22.
- Huang, W.-C., Zhao, D., Guo, N., Xue, C., Mao, X., 2018. Green and facile production of chitin from crustacean shells using a natural deep eutectic solvent. *Journal of agricultural and food chemistry* 66, 11897–11901.
- Husen, T.J., Kamble, S.T., Stone, J.M., 2015. Effect of pentoxifylline on chitinolytic enzyme activity in the Eastern subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Entomological Science* 50, 295–310.
- Jeuniaux, C., 1975. III. Chitine et complexes chitino-protéiques de la cuticule. *Traité de zoologie: Insectes: Téguments, système nerveux, organes sensoriels. Tome VIII, fascicule III* 31–44.
- Lafontaine, A., Gismondi, E., Boulangé-Lecomte, C., Geraudie, P., Dodet, N., Caupos, F., Lemoine, S., Lagadic, L., Thomé, J.-P., Forget-Leray, J., 2016. Effects of chlordecone on 20-hydroxyecdysone concentration and chitobiase activity in a decapod crustacean, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquatic toxicology* 176, 53–63.
- Lopes, C., Chaumot, A., Xuereb, B., Coulaud, R., Jubeaux, G., Quéau, H., François, A., Geffard, O., 2020. In situ reproductive bioassay with caged *Gammarus fossarum* (Crustacea): Part 2—Evaluating the relevance of using a molt cycle temperature-dependent model as a reference to assess toxicity in freshwater monitoring. *Environmental toxicology and chemistry* 39, 678–691.

- Luo, J., Pei, S., Jing, W., Zou, E., Wang, L., 2015. Cadmium inhibits molting of the freshwater crab *Sinopotamon henanense* by reducing the hemolymph ecdysteroid content and the activities of chitinase and N-acetyl- β -glucosaminidase in the epidermis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 169, 1–6.
- Lye, C.M., Bentley, M.G., Galloway, T., 2008. Effects of 4-nonylphenol on the endocrine system of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Environmental Toxicology: An International Journal* 23, 309–318.
- Mesquita, S.R., Ergen, Ş.F., Rodrigues, A.P., Oliva-Teles, M.T., Delerue-Matos, C., Guimarães, L., 2015. N-acetyl- β -d-glucosaminidase activity in feral *Carcinus maenas* exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology* 159, 225–232.
- Mesquita, S.R., Guilhermino, L., Guimarães, L., 2011. Biochemical and locomotor responses of *Carcinus maenas* exposed to the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. *Chemosphere* 85, 967–976.
- Montagna, M.C., Collins, P.A., 2007. Survival and growth of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda; Caridea) exposed to insecticides with chlorpyrifos and endosulfan as active element. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53, 371–378.
- Neues, F., Ziegler, A., Eppler, M., 2007. The composition of the mineralized cuticle in marine and terrestrial isopods: a comparative study. *CrystEngComm* 9, 1245–1251.
- Oosterhuis, S.S., Baars, M.A., Breteler, W.C.K., 2000. Release of the enzyme chitinase by the copepod *Temora longicornis*: characteristics and potential tool for estimating crustacean biomass production in the sea. *Marine Ecology Progress Series* 196, 195–206.
- Pratoomchat, B., Sawangwong, P., Guedes, R., Reis, M. de Iurdes, Machado, J., 2002. Cuticle ultrastructure changes in the crab *Scylla serrata* over the molt cycle. *Journal of Experimental Zoology* 293, 414–426.
- Qi, S., Liu, X., Zhu, L., Chen, X., Wang, C., 2018. Racemic, R-, and S-tebuconazole altered chitinase and chitinase activity of *Daphnia magna*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 53, 171–175.
- R Core Team, 2018. R: a language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, n.d.
- Richards, S.M., Kelly, S.E., Hanson, M.L., 2008. Zooplankton chitinase activity as an endpoint of pharmaceutical effect. *Archives of environmental contamination and toxicology* 54, 637–644.
- Romano, P., Fabritius, H., Raabe, D., 2007. The exoskeleton of the lobster *Homarus americanus* as an example of a smart anisotropic biological material. *Acta Biomaterialia* 3, 301–309.
- Sastri, A.R., Juneau, P., Beisner, B.E., 2013. Evaluation of chitinase-based estimates of biomass and production rates for developing freshwater crustacean zooplankton communities. *Journal of plankton research* 35, 407–420.
- Sastri, A.R., Roff, J.C., 2000. Rate of chitinase degradation as a measure of development rate in planktonic Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57, 1965–1968.

- Skinner, D.M., 1962. The structure and metabolism of a crustacean integumentary tissue during a molt cycle. *The Biological Bulletin* 123, 635–647.
- Song, Y., Villeneuve, D.L., Toyota, K., Iguchi, T., Tollefsen, K.E., 2017. Ecdysone receptor agonism leading to lethal molting disruption in arthropods: review and adverse outcome pathway development. *Environmental science & technology* 51, 4142–4157.
- Spindler, K.-D., Buchholz, F., 1988. Partial characterization of chitin degrading enzymes from two euphausiids, *Euphausia superba* and *Meganctiphanes norvegica*. *Polar Biology* 9, 115–122.
- Tuberty, S.R., McKenney Jr, C.L., 2005. Ecdysteroid responses of estuarine crustaceans exposed through complete larval development to juvenile hormone agonist insecticides. *Integrative and comparative biology* 45, 106–117.
- Vrinda, S., Abdulaziz, A., Abhilash, K.S., Jasmin, C., Kripa, V., Singh, I.B., 2019. Neuroendocrine and immunotoxicity of polyaromatic hydrocarbon, chrysene in crustacean post larvae. *Ecotoxicology* 28, 964–972.
- Williams, L., 2012. The effects of river sediment, endosulfan, and moderate hypoxia on blue crabs (*Callinectes sapidus*) from the tidal, freshwater James River.
- Xie, X.-L., Chen, Q.-X., Lin, J.-C., Wang, Y., 2004a. Purification and some properties of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*). *Marine Biology* 146, 143–148.
- Zhang, J.-P., Chen, Q.-X., Wang, Q., Xie, J.-J., 2006. Purification and some properties of β -N-Acetyl-D-glucosaminidase from viscera of green crab (*Scylla serrata*). *Biochemistry (Moscow)* 71, S55–S59.
- Zou, E., 2009. Effects of Hypoxia and Sedimentary Naphthalene on the Activity of N-acetyl- β -Glucosaminidase in the Epidermis of the Brown Shrimp, *Penaeus aztecus*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 82, 579–582.
- Zou, E., 2005. Impacts of xenobiotics on crustacean molting: the invisible endocrine disruption. *Integrative and Comparative Biology* 45, 33–38.
- Zou, E., Fingerman, M., 1999c. Effects of estrogenic agents on chitinase activity in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Ecotoxicology and environmental safety* 42, 185–190.
- Zou, E., Fingerman, M., 1999b. Effects of exposure to diethyl phthalate, 4-(tert)-octylphenol, and 2, 4, 5-trichlorobiphenyl on activity of chitinase in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 122, 115–120.
- Zou, E., Fingerman, M., 1999a. Patterns of N-acetyl- β -glucosaminidase isoenzymes in the epidermis and hepatopancreas and induction of N-acetyl- β -glucosaminidase activity by 20-hydroxyecdysone in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 124, 345–349.

VII. Transférabilité de la méthode de mesure de l'activité N-Acétyl- β -D-Glucosaminidase chez *Gammarus fossarum*

Le présent chapitre détaille l'utilisation de la méthode de mesure de l'activité de la NAGase et son adaptation méthodologique à l'espèce d'eau douce *Gammarus fossarum*. Ce travail, comme pour *Palaemon serratus*, a reposé sur une démarche articulée en trois temps. Dans un premier temps, la méthodologie de mesure de l'activité enzymatique a été optimisée afin d'obtenir une réponse sensible et répétable. Une fois le protocole de mesure optimal déterminé, la réponse enzymatique a été mesurée au cours du cycle de mue et selon le genre des organismes afin de déterminer les variations naturelles du signal imputables à la physiologie de l'amphipode. Enfin, le dosage de l'activité de la NAGase a été réalisé chez des organismes exposés *ex situ* à des effluents de STEP, afin d'appréhender la sensibilité du marqueur nouvellement établi. L'ensemble de ce travail est constitué d'une note :

Note n°2 : Mesure de l'activité de la N-Acétyl- β -D-Glucosaminidase chez l'amphipode d'eau douce : Gammarus fossarum : variabilité intrinsèque et application en contexte écotoxicologique.

7.1. Mesure et utilisation de l'activité N-Acétyl- β -D-Glucosaminidase chez *Gammarus fossarum*

Note n°2

Mesure de l'activité de la N-Acétyl- β -D-Glucosaminidase chez l'amphipode d'eau douce : *Gammarus fossarum* : variabilité intrinsèque et application en contexte écotoxicologique.

Résumé

Après avoir évalué le potentiel intéressant de la mesure de l'activité de la N-Acétyl- β -D-Glucosaminidase (NAGase) en tant que marqueur de la qualité de mue chez l'espèce marine *Palaemon serratus*, l'objectif de cette étude était de transférer la méthode de mesure chez un crustacé d'eau douce connu en écotoxicologie : *Gammarus fossarum*. Pour cela, une démarche identique au développement de la mesure de la NAGase chez *Palaemon serratus* a été appliquée. Ainsi, l'optimisation méthodologique des paramètres de la réaction enzymatique (e.g. optimum de substrat, charge en extrait enzymatique) a permis de définir un protocole de mesure répétable et sensible. Cette étape d'optimisation a abouti sur un protocole de mesure différent de celui obtenu chez la crevette, soulignant l'importance d'adapter la mesure à l'espèce utilisée. En second lieu, une fluctuation de l'activité de la NAGase a été observée au cours du cycle de mue, se traduisant par un pic d'activité survenant lors de la prémue (i.e. stade D1). Au cours de ce cycle, de légères différences de cinétique ont été observées entre spécimens mâles et femelles. Enfin, la réalisation d'une exposition *ex situ* de 16 jours sur des spécimens de gammarus femelles à un gradient de concentration en effluent de STEP a conduit à l'apparition de délais de mue de plus en plus marqués selon la concentration testée. Malgré ces retards, aucun effet sur l'activité de la NAGase n'a été reporté, soulignant l'importance de la réalisation du processus de mue pour les organismes, quelle que soit leur condition énergétiques et morphologiques.

Mots-clés : N-Acétyl- β -D-Glucosaminidase ; optimisation méthodologique ; *Gammarus fossarum* ; mue ; retards de mue

Mesure de l'activité de la N-Acétyl- β -D-Glucosaminidase chez l'amphipode d'eau douce : *Gammarus fossarum* : variabilité intrinsèque et application en contexte écotoxicologique

1. Introduction

Comme nous l'avons souligné précédemment et bien que la mue soit un processus fondamental chez les crustacés, il existe finalement peu d'outils moléculaires qui permettent de mesurer et formaliser les effets de la contamination sur cette fonction, dans un contexte environnemental. Dans le cadre de ces travaux de thèse, un travail de recherche et de développement a été produit chez la crevette bouquet *Palaemon serratus* pour caractériser et mesurer des réponses sub-individuelles reliées à la mue (*i.e.* mesure de l'activité NAGase et caractérisation des propriétés cuticulaires), dans une perspective de pouvoir suivre des populations autochtones (*i.e.* biomonitoring passif) chez cette espèce représentative des milieux littoraux. Dans la poursuite de ces travaux, une collaboration avec le laboratoire d'écotoxicologie de l'INRAE de Lyon nous a donné l'opportunité d'étudier la mesure de l'activité NAGase chez un autre modèle de crustacé très étudié en écotoxicologie mais emblématique, celui-ci, des systèmes aquatiques continentaux, l'amphipode *Gammarus fossarum*.

A l'instar des Gammaridae, l'amphipode *G. fossarum* est une espèce d'intérêt au regard de son abondance, de sa large répartition géographique et de son rôle écologique, (Rinderhagen *et al.* 2000). C'est une espèce échantillonnable tout au long de l'année et relativement simple à maintenir en conditions contrôlées. Par ailleurs, *G. fossarum* présente une grande sensibilité à une large gamme de contaminants, favorisant son utilisation dans l'évaluation de la qualité des milieux (Ohe & Liess, 2004). A ce titre, depuis une quinzaine d'années, les travaux de l'INRAE ont contribué à développer des méthodologies pertinentes (*e.g.* mesures d'activité d'acétylcholine estérase : Xuereb *et al.* 2009 ; indicateur de génotoxicité : Lacaze *et al.* 2011 ; approches écotoxico-protéomiques : Gouveia *et al.* 2017 ; mesures de bioaccumulation : Besse *et al.* 2013) articulées autour du déploiement de bioessais *in situ* par exposition directe des organismes aux milieux (*i.e.* biomonitoring actif). Ces méthodologies permettent alors d'utiliser le gammare en tant que sonde biologique pour l'évaluation de la qualité environnementale. Parmi les réponses mesurables, un intérêt particulier peut être porté sur le suivi simultané des temps d'intermue, de la gamétogénèse et du développement embryonnaire dans la poche incubatrice, chez la femelle (Geffard *et al.* 2010 ; Chaumot *et al.* 2020). Ces processus sont

synchronisés, si bien que tout décalage de l'un d'eux laisse présager une atteinte spécifique de type perturbation endocrinienne. En vue d'affiner la compréhension des effets observés en cas de délais du temps d'intermue, il apparaissait particulièrement intéressant d'étudier la modulation de réponses sub-individuelles liées au processus de la mue, telle que l'activité NAGase.

La NAGase est une enzyme chitinolytique dont l'activité permet la mise en place de l'apolyse et de la dégradation de l'ancienne cuticule, nécessaires à la réalisation de la fin du cycle de mue. Chez les amphipodes, une seule étude rapporte la mesure de l'activité de la NAGase chez *G. fossarum*, mettant en évidence i) le genre comme un facteur confondant, ainsi que ii) l'action inhibitrice des PolyBromoDiphénylEthers 47 et 99 (PBDE) (Gismondi & Thomé, 2014). Toutefois, cette étude ne fait pas référence à des points d'optimisation méthodologique définis comme indispensables à la mise en place d'une mesure robuste et répétable (voir article 1, section 4.1.). De même, si l'influence du genre est soulignée, aucune référence à la compréhension de la variabilité naturelle de l'activité de la NAGase au cours du cycle de mue, facteur confondant par défaut, (voir article 1, section 4.1.) n'a été décrite, ni mentionnée.

L'objectif de la présente étude était de développer la mesure de l'activité de la NAGase chez l'amphipode d'eau douce *G. fossarum* afin d'évaluer et étudier si la modulation de cette activité est impliquée dans le cas de retards de mue observés chez des organismes exposés à un milieu contaminé. La mise en place d'une démarche identique à celle réalisée chez la crevette bouquet *P. serratus* a été effectuée. Dans une première étape, des points méthodologiques clés du protocole de mesure de l'activité de la NAGase – i.e. le ratio de broyage des tissus, la concentration de substrat, la quantité d'extrait enzymatique, ainsi que de la caractérisation de la phase linéaire de la réaction -ont été optimisés pour assurer une bonne robustesse et reproductibilité de la mesure de l'activité de la NAGase. La seconde étape avait pour objectif de caractériser les fluctuations de l'activité de la NAGase au cours du cycle de mue, au regard du genre de l'organisme, dans une démarche physiologique descriptive. Connaître la variabilité intrinsèque de la réponse est indispensable à la définition des conditions de bioessai et à l'interprétation des valeurs obtenues. Pour finir, l'activité NAGase a été mesurée chez des *G. fossarum* femelles exposés en début de cycle de mue pour une période de 16 jours à des effluents de sortie de STEP dilués ou non.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

Les gammarès ont été collectés au sein d'une population provenant d'une ancienne crevette, située à Saint-Maurice-de-Rémans (coordonnées : 5°17'45'' E, 45°58'09'' N) sur laquelle le laboratoire d'INRAE de Lyon, en collaboration avec la startup Biomae®, assure la production de ces organismes. L'échantillonnage a été réalisé au filet troubleau permettant de capturer les individus emmenés par le courant. Ces individus sont ensuite triés sur une colonne de tamis, permettant de retenir les organismes entre les mailles d'ouverture de 1,6 et 2,0 mm. Les gammarès retenus ont été ramenés au laboratoire pour y être maintenus dans des aquariums de 20 L (à raison de 2000-3000 individus par aquarium) dont le milieu, soit de l'eau contrôlée issue d'un forage au laboratoire INRAE Lyon, a été renouvelé en continu. Les gammarès ont été maintenus à $12 \pm 1^\circ\text{C}$, sous une photopériode de 16 : 8 h jour : nuit, et nourris *ad libitum* à l'aide de feuilles d'aulne et de larves de tubifex.

En vue de réaliser une analyse de l'activité de la NAGase, le stade et le sexe des individus ont été déterminés selon la démarche explicitée en [section 2.4](#). Les organismes d'intérêt ont alors été disséqués sur un tapis de glace, afin de retirer leur tube digestif. Cette opération consistait à retirer les isoformes de NAGase spécialisés dans la digestion de chitine, et présentant des cinétiques d'activité différentes des NAGases tégumentaires associés à la mue. Les organismes dépourvus de tube digestifs ont ensuite été stockés à -20°C jusqu'à leur expédition au laboratoire UMR I-02 SEBIO Le Havre afin d'évaluer l'activité de la NAGase.

2.2. Mesure de l'activité de la NAGase

En vue de l'obtention de l'extrait enzymatique, les échantillons de gammarès ont été pesés puis ajoutés à un volume de tampon citrate phosphate (pH 5,15 ; 17,5 mmol.L⁻¹) selon un ratio poids : volume différent en fonction du nombre d'organismes (*i.e.* 1 : 20 pour un extrait individuel ; 1 : 10 pour un extrait sur homogénat de deux à cinq gammarès). De la même manière que décrit dans le protocole développé chez *P. serratus* ([voir article 1, section 4.1.](#)), le mélange a été broyé à l'aide d'un homogénéiseur à billes Precellys® (2 broyages à 6000 g pendant dix secondes, entrecoupés d'une pause de cinq secondes), puis centrifugé pendant 20 minutes à 10 000 g. Le surnageant a ensuite été récupéré puis maintenu à 4°C avant utilisation afin de réduire la dégradation enzymatique.

La méthodologie de mesure de l'activité de la NAGase chez les spécimens *Gammarus fossarum* a été adaptée de celle mise en place chez la crevette *Palaemon serratus* (voir article 1, section 4.1.). Brièvement, 10 µL de substrat chromogénique (i.e. 4 nitrophényl-N-Acétyl-β-D-Glucosaminide ou 4-NAG, dont la concentration optimale a été déterminée selon la méthode décrite en section « optimisation de la méthodologie de mesure ») étaient additionnés à 160 µL de tampon citrate phosphate et pré-incubé à 37°C. Après l'ajout d'extrait enzymatique (dont le volume a été déterminé selon la méthode décrite en section « optimisation de la méthodologie de mesure »), la réaction était incubée à 37°C dans des microplaques 96 puits. La réaction a été stoppée par ajout de 20 µL de NaOH à 1 mol.L⁻¹, selon deux pas de temps d'incubation différents, compris dans la zone de linéarité de la réaction (définie selon la méthode décrite en section « optimisation de la méthodologie de mesure »). Pour chaque échantillon, la mesure était réalisée en triplicat. L'activité NAGase était mesurée à l'aide d'un spectromètre TECAN® Infinite 2000, à une longueur de 410 nm, et exprimée comme une quantité de nitrophénol produit par minute, selon l'équation suivante :

$$\text{Activité NAGase (nmol.min}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta A}{\epsilon.l} * V$$

$$\text{Où } \Delta A = \frac{\text{absorbance moyenne au temps 2} - \text{absorbance moyenne au temps 1}}{\text{temps 2} - \text{temps 1 (min)}}$$

avec ϵ étant le coefficient d'extinction molaire du nitrophénol (i.e. 18300 L.mol⁻¹.cm⁻¹), l la longueur du trajet du laser du spectromètre dans le milieu réactionnel, calculée comme étant 0,486 cm, et V le volume de milieu réactionnel.

2.3. Optimisation de la méthodologie de mesure

La phase d'optimisation de la mesure de la NAGase chez *Gammarus fossarum* s'est appuyée sur celle décrite chez *Palaemon serratus* (voir article 1, section 4.1.). Globalement, deux essais indépendants ont été réalisés, visant à connaître i) le volume d'extrait enzymatique adéquat à ajouter à la réaction et ii) l'optimum de substrat. Pour chacun de ces essais, les manipulations ont été réalisées à partir de pools d'extraits enzymatiques (n = 8 gammarus par pool) issus de gammarus broyés individuellement.

(i) Quatre volumes différents d'extrait enzymatique (i.e. 20, 30, 40 et 50 µL) provenant des homogénats préparés ont été testés. Pour chaque test, la réaction a été démarrée par ajout de tampon citrate phosphate et de substrat à une concentration de 750 µmol.L⁻¹, définie comme

la concentration optimale chez *P. serratus*, puis incubation du milieu réactionnel à 37 °C. Pour chaque volume, l'absorbance de la réaction a été suivie sur 12 pas de temps différents (*i.e.* 0, 1, 2, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35 et 40 min), permettant de définir également la zone de linéarité de la réaction.

(ii) Une gamme de 12 concentrations de substrats a été testée (*i.e.* 0, 50, 125, 250, 375, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500 et 5000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Pour cela, chaque concentration a été mélangée à du tampon citrate phosphate, le mélange ayant été ajouté à un volume d'extrait enzymatique de 30 μL . La réaction a été incubée à 37 °C, puis mesurée après arrêt de la réaction à 20 et 30 min.

2.4. Expérience 1 : variations de l'activité en fonction du genre et du stade de mue

Les stades de mue ont été déterminés par observations microscopiques des changements tégumentaires au niveau des dactylopodites des 3^{èmes} et 4^{èmes} paires de périopodes, tels que décrit par Xuereb (2009) et Geffard *et al.* (2010). Brièvement, le cycle de mue de *Gammarus fossarum* comprend six stades de mue : A et B appartenant à la postmue, C1 et C2 représentant l'intermue, D1 et D2 formant la prémue. Chez cet amphipode, le cycle de mue est synchronisé avec la maturation ovarienne des femelles (Blanchet-Tournier, 1980), permettant de définir également la transition de certains stades de mue. *In fine*, l'activité de la NAGase a été mesurée sur dix stades de mue (A ; B ; B/C1 ; C1 ; C1/C2 ; C2 ; C2/D1 ; D1 ; D1/D2 ; D2) chez des femelles *G. fossarum* (n = 10 mesures de NAGase individuelles par stade).

Le genre des organismes a été déterminé par la présence d'ovocytes ou d'embryons en position dorsale ou ventrale respectivement, ainsi que par l'observation des caractères sexuels (papilles génitales chez le mâle). L'activité de la NAGase a été mesurée chez des organismes mâles et femelles de *G. fossarum* aux stades A, C1, C2, D1, D2 (n = 10 mesures de NAGase individuelles par genre et stade), afin de comparer le patron d'activité de chaque genre au cours du cycle de mue.

2.5. Expérience 2 : mesure de l'activité de la NAGase sur des organismes exposés

Des spécimens femelles de *G. fossarum* ont été exposées *ex situ* à des effluents de STEP avant et après passage sur un système de traitement de micropolluants à base de charbon actif. La possibilité de déployer un laboratoire expérimental sur place a permis de tester un gradient de trois concentrations différentes d'effluents, obtenus en diluant l'effluent avec une eau

contrôle (*i.e.* eau de forage issu du laboratoire d'écotoxicologie INRAE Lyon) à l'aide de pompes péristaltiques. Au total, sept conditions d'exposition ont été testées : témoin, amont 11 %, 33 %, 100 % et aval 11 %, 33 %, 100 %. Afin de tester de potentiels effets sur la mue, des gammares femelles issues d'une population contrôle (*i.e.* $n = 15$ par condition) ont été placées dans des chambres individuelles durant 16 jours à 15 °C sous une photopériode de 16 : 8 lumière : obscurité. Le renouvellement du milieu est réalisé en continu à l'aide d'un système de surverse. Une fois l'expérimentation terminée, les gammares ont été rapportés au laboratoire, en vue d'être analysés. L'analyse des stades de mue a permis de rapporter l'occurrence de délais de mue chez les femelles exposées, calculée comme étant le ratio d'organismes n'ayant pas atteints le stade C2 (Geffard *et al.* 2010). Les gammares ont ensuite été préparés (voir la section « matériel biologique ») puis transférés au laboratoire SEBIO Le Havre en vue du dosage de l'activité de la NAGase. Lors de la réception, les échantillons ont été stockés à -80°C jusqu'à analyse. L'activité de la NAGase a été mesurée selon la méthodologie optimisée, préalablement établie via les résultats issus des manipulations décrites dans la section « Optimisation de la méthodologie de mesure ».

3. Résultats & Discussion

3.1. Optimisation de la mesure d'activité de la NAGase

L'activité de la NAGase de *Gammarus fossarum* en fonction de la concentration en substrat apportée à la réaction est présentée en Figure 1. De manière similaire à *P. serratus*, l'activité de la NAGase chez *Gammarus fossarum* a montré un profil en trois temps en fonction de la concentration en substrat. L'activité présente une cinétique michaelienne d'ordre 1 (*i.e.* augmentation d'activité proportionnelle à l'augmentation de concentration en substrat) jusqu'à atteindre un maximum d'activité ($1,56 \pm 0,01 \text{ nmol.min}^{-1}$) est atteint pour une concentration en substrat de $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Au-delà de cette concentration, plus celle-ci augmente et plus l'activité de la NAGase diminue.

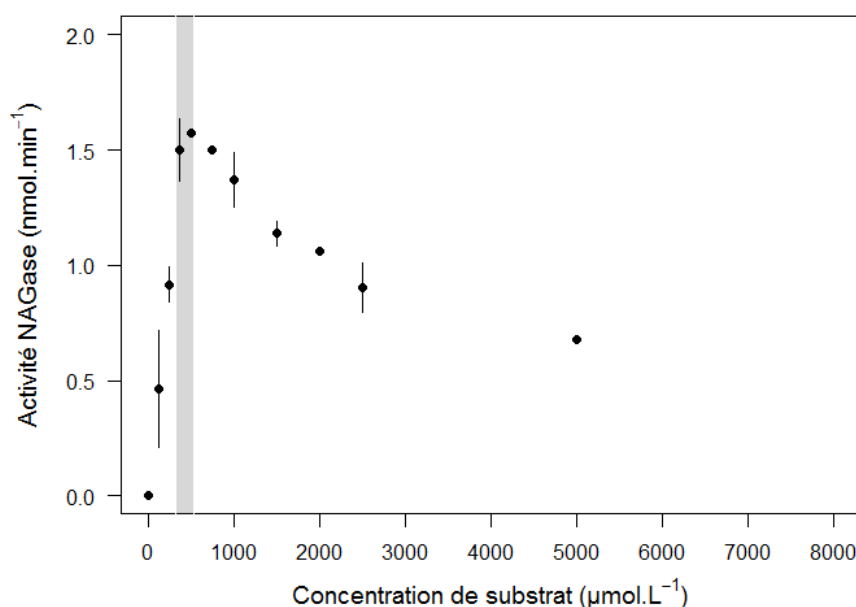


Figure 1 Modulations de l'activité de la NAGase chez *Gammarus fossarum* (exprimée en nmol.min⁻¹) en fonction de la concentration de substrat (exprimée en μmol.L⁻¹), mesurée sur les organismes sans tube digestif. Les segments correspondent aux écarts types positifs et négatifs. La zone grisée correspond à la gamme de concentration en substrat permettant d'obtenir une activité NAGase maximale.

Les cinétiques de la NAGase chez *G. fossarum* pour différents volumes d'extraits enzymatiques sont présentées dans la Figure 2. Les volumes d'extrait ont montré différents profils de NAGase, avec l'observation de trois phases principales : i) une phase d'accélération survenant avant 5 min de réaction, ii) une phase linéaire se déroulant majoritairement entre 5 et 30 min de réaction, et iii) une phase de plateau, causée par la limitation du substrat dans la réaction, étant observée au-delà de 30 min et survenant plus tôt pour les plus hauts volumes enzymatiques testés. Afin d'analyser l'activité individuelle de la NAGase chez *G. fossarum* la mesure sera poursuivie en utilisant un volume de 30 μL entre 5 et 10 min.

Les paramètres optimisés du protocole de mesure de l'activité de la NAGase chez *G. fossarum* sont rappelés dans la Table 1. Ce protocole a permis de mettre en place une mesure reproductible de la NAGase (coefficient de variabilité < 10 %). De plus, en comparant avec le protocole obtenu chez *P. serratus*, les paramètres définis apparaissent comme ayant des valeurs différentes, soulignant l'importance d'adapter la réaction et la méthode de mesure à chaque espèce de crustacé.

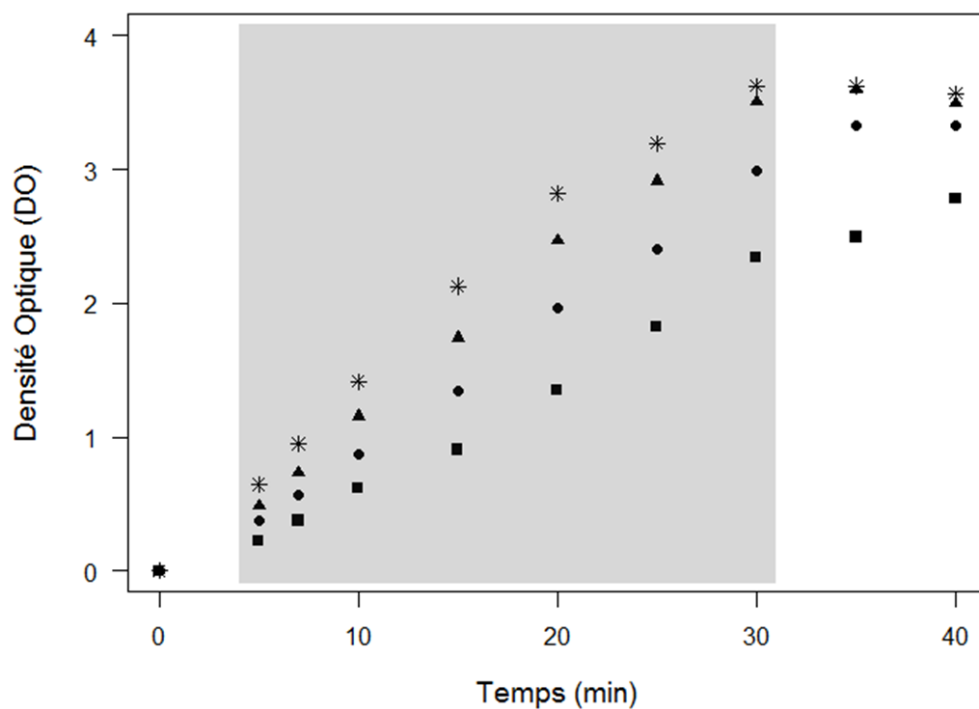


Figure 2 Cinétiques de densité optique issues de l'activité de la NAGase de *Gammarus fossarum* mesurée sur des organismes sans tube digestif. La variation de ces cinétiques a été fait par ajout de 20 µL (■), 30 µL (●), 40 µL (▲) et 50 µL (*) d'extrait enzymatique. La zone grisée correspond à la zone de linéarité de la réaction de la NAGase.

Tableau 1. Résumé du protocole optimisé obtenu sur les organismes *G. fossarum*, individuels ou analyses en homogénat.

	Gammare individuel	Gammare en homogénat (n=2-5)
Ratio de broyage	1 : 20	1 : 10
Nature du tampon	Tampon citrate phosphate 17,5 mmol.L ⁻¹	Tampon citrate phosphate 17,5 mmol.L ⁻¹
pH du tampon	5,15	5,15
Concentration de substrat (4-NAG)	500 µmol.L ⁻¹	500 µmol.L ⁻¹
Volume d'extrait enzymatique	30 µL	30 µL
Temps de réaction	5-10 min	5-10 min

3.2. Fluctuation de l'activité de la NAGase selon le cycle de mue et le genre

Les variations de l'activité de la NAGase chez *Gammarus fossarum* au cours du cycle de mue sont représentées en Figure 3. L'activité enzymatique mesurée varie significativement au cours du cycle de mue (ANOVA, p -value : $1,80.10^{-5}$). Ainsi, la NAGase présente l'activité la plus basse pour le stade B-C1 ($0,88 \pm 0,58 \text{ nmol.min}^{-1}$), et la plus forte au stade D1 ($3,66 \pm 1,83 \text{ nmol.min}^{-1}$). Durant la prémue (*i.e.* stades D1-D2), l'activité de la NAGase diminue progressivement jusqu'à atteindre sa valeur la plus basse mesurée en B-C1. En début d'intermue (*i.e.* stade C1), un pic d'activité a été observé, suivi d'une légère diminution au cours du reste de l'intermue. Le passage de l'intermue à la prémue traduisait une augmentation d'activité de la NAGase pour atteindre le deuxième pic d'activité observé (*i.e.* facteur d'induction d'activité entre C2 et D1 : 2,59). L'activité mesurée en fin de cycle de mue diminue après le pic mesuré en D1, mais reste élevée et constante (*i.e.* D1 = $3,66 \pm 1,83 \text{ nmol.min}^{-1}$; D1-D2 = $2,90 \pm 1,07 \text{ nmol.min}^{-1}$; D2 = $2,87 \pm 1,15 \text{ nmol.min}^{-1}$).

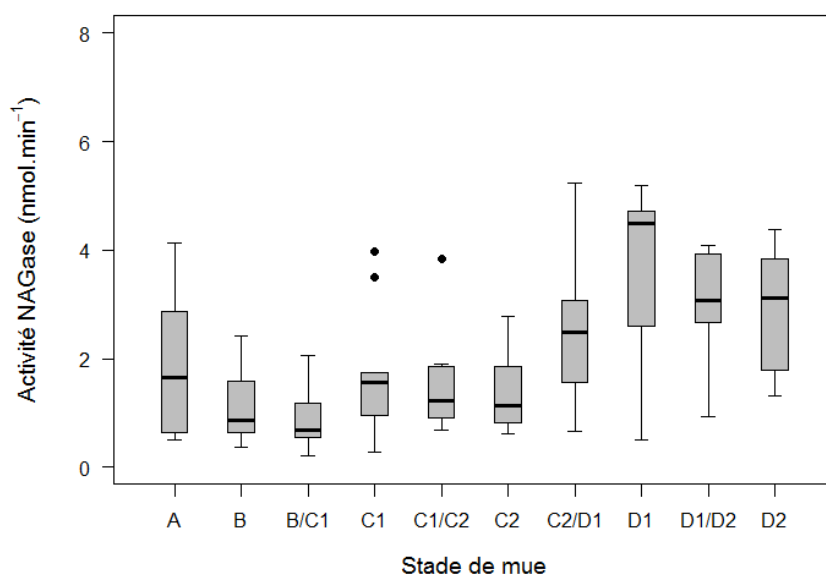


Figure 3 Variations de l'activité de la NAGase de *Gammarus fossarum* (exprimée en nmol.min^{-1}), mesurée sur des organismes femelles sans tube digestif ($n = 10$), au cours du cycle de mue. Les extrémités de chaque boîte représentent les premiers et troisièmes quartiles des données, la médiane étant représentée par un segment gras. Les points gras représentent les données extrêmes pour chaque distribution.

L'activité de la NAGase chez les spécimens mâles présente un profil légèrement différent de celui des femelles (Figure 4). Chez les mâles, l'activité de la NAGase semble rester

relativement constante entre les stades A et C1 (*i.e.* respectivement à $1,64 \pm 1,16$ et $1,51 \pm 1,22$ nmol.min⁻¹). Contrairement aux femelles, aucun pic d'activité n'est détecté au cours de l'intermue. En revanche, à partir du stade C2, l'activité de la NAGase augmente progressivement jusqu'à atteindre un maximum d'activité à la fin du cycle de mue. Ainsi, alors que le maximum d'activité chez les femelles est aperçu au cours du stade D1, suivi d'une diminution en fin de cycle, le pic d'activité chez les mâles est détecté durant le stade D2 (*i.e.* $4,56 \pm 1,57$ nmol.min⁻¹, soit une augmentation de 2,26 fois l'activité observée en C2). Ces variations de profils semblent coïncider avec les variations de niveau d'ecdystéroïdes observées chez les crustacés. Ces hormones participent majoritairement à la régulation des mécanismes hormonaux de la mue et contribuent à l'activation des enzymes chitinolytiques telles que la NAGase. Au cours du cycle de mue, le profil des ecdystéroïdes reste faible au cours de la postmue et l'intermue, puis augmente progressivement depuis le début de la prémue pour atteindre un niveau maximal en fin de prémue (Jegla *et al.* 1983 ; Chung, 2010 ; Chang & Mykles, 2011, Abidi *et al.* 2016). Ce profil semble similaire à l'expression de l'activité de la NAGase obtenue chez les gammarus mâles. Cependant, Blanchet *et al.* (1979) avaient observé chez des amphipodes femelles *Orchestia gammarellus* une dynamique légèrement différente au cours du cycle de mue. De manière similaire à l'activité de la NAGase dans la présente étude, un pic au cours de l'intermue a été remarqué. Cet auteur a spécifié que les organismes utilisés étaient en période de reproduction. Ce constat a été étayé par Soumoff & Skinner (1983), percevant des différences de profils d'ecdystéroïdes selon l'état de reproduction des femelles crabes *Callinectes sapidus*.

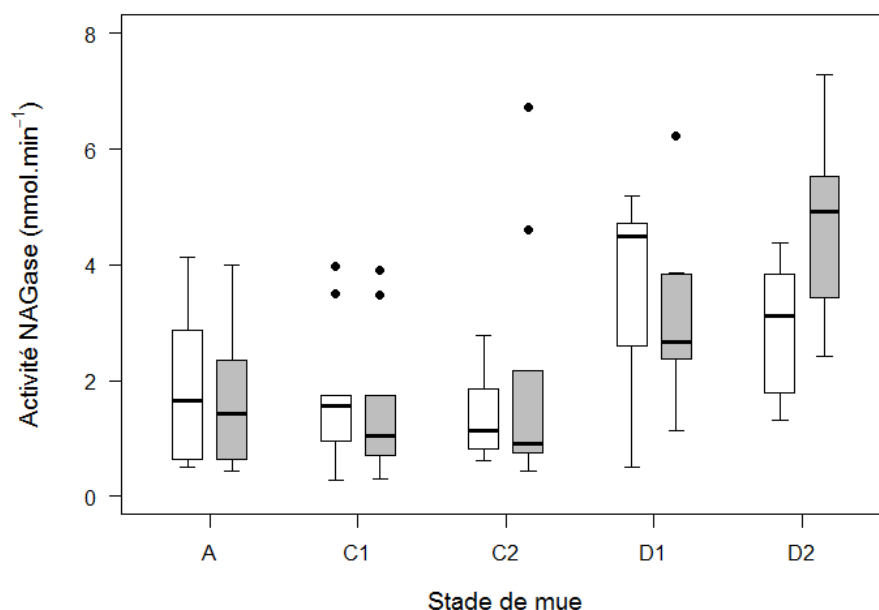


Figure 4 Variations de l'activité de la NAGase de *G. fossarum* (exprimée en nmol.min⁻¹), mesurée sur des organismes sans tube digestif, selon le genre des individus. Les boîtes blanches et grises représentent respectivement les spécimens femelles et mâles. Les extrémités de chaque boîte représentent les premiers et troisièmes quartiles des données, la médiane étant représentée par un segment gras. Les points gras représentent les données extrêmes pour chaque distribution.

3.3. Intégrité de la NAGase mesurée chez des gammares femelles exposées à des eaux usées traitées

Pour chaque condition, l'occurrence des femelles ayant un retard de mue (*i.e.* n'ayant pas atteint le stade C2 en fin d'expérience) est présentée en Figure 5. Lors de cette prospection, la condition « Amont 100 % » n'a pas pu être analysée en raison de la mortalité de l'ensemble des gammares exposés. Ainsi, pour l'ensemble des sites, en amont comme en aval du système de traitement des eaux, le pourcentage de retard de mue augmente avec la concentration d'eau usée testée. Ainsi, les eaux usées testées au cours de cette expérience induisent une perturbation de l'activité morphologique de la mue, c'est-à-dire un délai dans le décollement et la rétraction tissulaire de la matrice du dactylopodite (*i.e.* extrémités des périopodes) classiquement observés chez *G. fossarum* en C2 (Xuereb, 2009 ; Geffard *et al.* 2010).

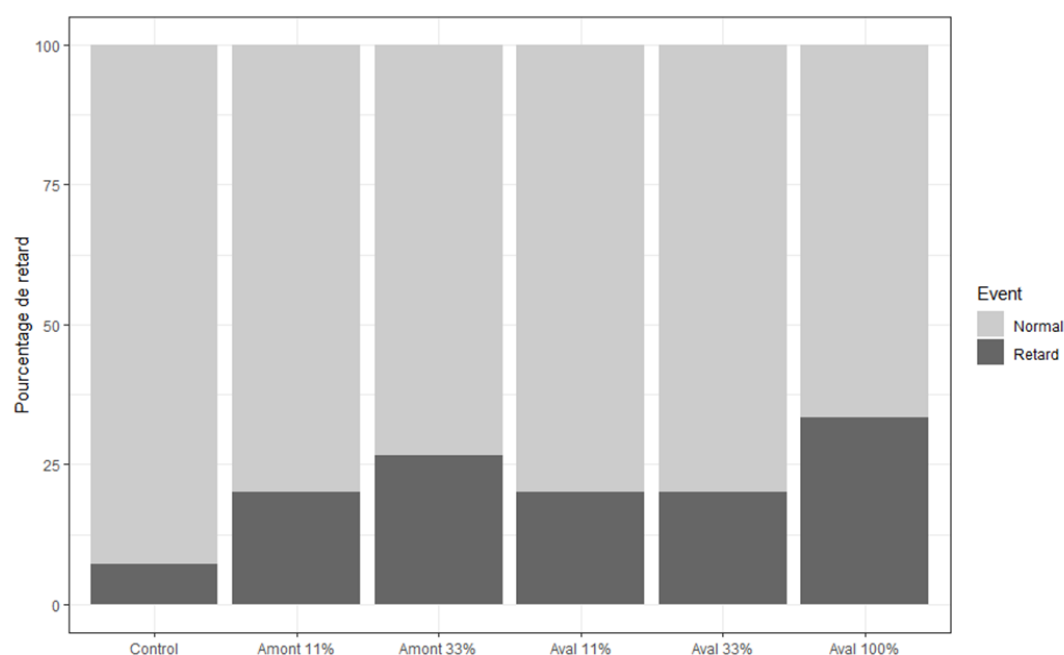


Figure 5 Occurrence de retards de mue observés chez les spécimens *Gammarus fossarum* femelles exposées à des eaux usées traitées. L'exposition a été réalisée sur 16 jours via 6 conditions d'exposition et un contrôle (n = 15 par condition). A la fin de l'expérimentation, la condition "amont 100%" ne comptait aucun survivant, l'analyse a, par conséquent, été réalisée sur les conditions restantes.

En partant de l'hypothèse que l'activité de la NAGase soit impliquée dans la perturbation menant aux retards de mue observés, cette dernière devrait présenter un niveau d'activité faible chez les organismes en retard (*i.e.* C1), et à l'inverse une hausse d'activité chez les organismes non retardés (*i.e.* C2/D1 et D1). La Figure 6 présente les niveaux d'activité de la NAGase mesurée sur les gammarus femelles présents dans chacune des conditions. Pour chaque site, les organismes ont été classés selon leur stade de mue : C1, C2/D1 et D1. En considérant les spécimens non retardés, les gammarus ayant un stade C2/D1 présentent une activité NAGase fortement variable, tandis que ceux retrouvés au stade D1 présentent une activité élevée, avec une variabilité plus faible. Ce résultat est en adéquation avec les mesures réalisées le long du cycle de mue chez les gammarus femelles (Figure 3), montrant le stade C2/D1 comme un état de transition vers le pic d'activité NAGase observé en D1. Concernant les individus présentant un retard morphologique de mue (*i.e.* stade C1), ces derniers montrent une activité NAGase haute, similaire aux individus en C2/D1 et D1 (Kruskal-Wallis, $p\text{-value} > 0,05$). Autrement dit, le délai dans l'accomplissement des événements tissulaire observé ici n'est pas expliqué par l'activité de la NAGase. Ainsi, d'un point de vue moléculaire, le déroulement du cycle de mue semble s'effectuer comme s'il n'y avait pas de délai morphologique. Ce constat va dans le sens des observations de Coulaud *et al.* 2015 qui, après

avoir observé des retards de mue chez des femelles gammarus, soumises à une contrainte alimentaire, n'ont pas décelé de différence dans la durée totale de l'accomplissement du cycle de mue (*i.e.* atteinte de l'exuviation) du lot d'organismes contraints par rapport au groupe témoin. En dépit des retards morphologiques observés, tout porte à croire que le processus de mue se déroulait normalement. Cette désynchronisation entre événements morphologiques et activité moléculaire soulève logiquement le questionnement de la pertinence de la délimitation des stades de mue définis chez *G. fossarum* - et classiquement pour l'ensemble des crustacés - par des critères tissulaires connus et observables au microscope (Drach, 1939 ; Drach & Tchernigovtzeff, 1967 ; Xuereb, 2009 ; Geffard *et al.* 2010). Toutefois, le retard de mue observé sur le décollement tissulaire n'apparaît pas systématiquement « compensé » en fin de cycle. A titre d'exemple, des spécimens *G. fossarum*, issue d'une population contrainte à un milieu oligo calcique, ayant été soumis à une déplétion de calcium dans leur milieu ainsi qu'à une faible qualité alimentaire ont montré des délais d'activité tissulaire au cours de leur cycle de mue, qui se sont poursuivis durant le deuxième cycle d'exposition (Felten, communication personnelle). Le suivi de la NAGase lors de telles observations permettrait de déterminer l'implication ou non de l'activité enzymatique régulant la mue dans l'altération constatée.



Figure 6 Mesure d'activité de la NAGase chez les spécimens *Gammarus fossarum* femelles exposées à des eaux usées traitées (*i.e.* 7 conditions, $n = 15$ par condition). A l'issue de l'exposition de 16 jours, la condition « amont 100% » ne disposait d'aucun gammarus survivant et n'a pas pu être analysée. Pour chaque condition, l'activité de la NAGase est distribuée selon les stades de mue retrouvés chez les organismes exposés : C1 (cercles noirs), C2/D1 (cercles rouges) et D1 (cercles verts). Les stades C2/D1 et D1 représentent les gammarus n'ayant pas de retards de mue, contrairement aux femelles retrouvées au stade C1.

Au cours de la présente étude, l'activité de la NAGase de spécimens *G. fossarum* exposés à des eaux usées traitées semble suivre un déroulement normal au cours de la mue, malgré l'observation de délais morphologiques de la mue. Si de telles altérations tissulaires ne semblent pas perturber le bon fonctionnement de la mue, celles-ci sont en mesure de provoquer des perturbations dans la reproduction des organismes. Ainsi, après avoir exposé des femelles *G. fossarum* à 0,01 ; 1 et 100 µg.L⁻¹ de méthyl-farnesoate durant 21 jours, Jubeaux *et al* (2012) ont observé une augmentation de femelles ayant un retard de mue. Chez ces organismes, il a été constaté un arrêt de la synthèse de vitellogénine ainsi que de la croissance ovocytaire. En d'autres termes, le retard de mue constaté à l'échelle tissulaire, bien que récupérable, traduit bien un coût important pour la femelle sous forme de délai dans la gamétogénèse en cours. Des arrêts totaux de gamétogénèse sont d'ailleurs régulièrement observés chez des spécimens *G. fossarum* femelles montrant un arrêt de mue au niveau tissulaire (Geffard, communication personnelle). Par comparaison, bien que la perturbation de la reproduction des organismes soit délétère, celle-ci semble constituer un compromis plus « acceptable » que l'altération du processus de mue, dont le bon déroulement est maintenu au possible.

4. Conclusion

Basé sur la méthodologie appliquée chez *Palaemon serratus*, un protocole de mesure de l'activité de la NAGase a été mis au point et optimisé chez l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*. Si la méthodologie permet également une mesure sensible et robuste (*i.e.* CV < 10 %), le protocole de mesure apparaît différent dans les optima de substrats et volumes enzymatiques utilisés, soulignant l'importance d'adapter la mesure à l'espèce utilisée.

L'analyse de la fluctuation des réponses mesurées selon les paramètres intrinsèques aux organismes a permis de mettre en évidence le cycle de mue comme important facteur d'influence de l'activité de la NAGase. De manière similaire aux autres crustacés, la NAGase de *G. fossarum* a montré une activité basale en intermue, ainsi qu'un pic d'activité au cours de la prémue (*i.e.* stade D1). L'augmentation d'activité au cours de la prémue s'est avérée être similaire à celui de *P. serratus*. En parallèle, de légères différences de cinétiques ont été observées entre spécimens mâles et femelles, pouvant potentiellement être originaires de variations métaboliques et hormonales constatées entre les genres.

Bien que l'exposition *ex situ* de gammares à un gradient d'eaux usées a occasionné des délais de mue croissants selon la concentration testée, ces retards n'ont pas pu être corrélés à

l'activité de la NAGase, exprimant un niveau similaire entre individus retardés ou non. Ceci souligne l'importance du déroulement du processus de mue pour les organismes, qui s'effectue en dépit de la présence d'altérations morphologiques. Afin de confirmer cela, la poursuite de l'exposition jusqu'en fin de cycle pourrait être réalisée, aboutissant *a priori* à des temps de cycles de mue similaires. En parallèle, une exposition similaire en arrêtant les organismes au même stade de mue permettrait d'obtenir des informations complémentaires sur le déroulement de l'activité de la NAGase au cours du cycle de mue des gammarus exposés.

L'utilisation de deux espèces telles que l'amphipode d'eau douce *G. fossarum* et la crevette marine *P. serratus*, bénéficiant d'une même méthodologie de mesure d'analyse, telle que pour la NAGase dans la présente étude, laisse envisager des études comparatives entre espèce d'eau douce et marine, particulièrement intéressantes pour appréhender le continuum d'un bassin versant, de la source à la mer.

Références bibliographiques

- Abidi, S., Abbaci, K.T., Geffard, O., Boumaiza, M., Dumet, A., Garric, J., Mondy, N., 2016. Impact of cadmium on the ecdysteroids production in *Gammarus fossarum*. *Ecotoxicology* 25, 880–887.
- Besse, J.-P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O., 2013. Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: towards the determination of threshold values. *Water research* 47, 650–660.
- Blanchet, M.F., Porcheron, P., Dray, F., 1979. Variations du taux des ecdystéroïdes au cours des cycles de mue et de vitellogenèse chez le Crustacé Amphipode, *Orchestia gammarellus*. *International Journal of Invertebrate Reproduction* 1, 133–139.
- Blanchet-Tournier, M.-F., 1980. Mue et vitellogenèse chez le crustacé amphipode *orchestia gammarellus* (pallas).: contrôles endocrines et interactions.
- Chang, E.S., Mykles, D.L., 2011. Regulation of crustacean molting: a review and our perspectives. *General and comparative endocrinology* 172, 323–330.
- Chaumot, A., Coulaud, R., Adam, O., Quéau, H., Lopes, C., Geffard, O., 2020. In situ reproductive bioassay with caged *Gammarus fossarum* (Crustacea): Part 1—Gauging the confounding influence of temperature and water hardness. *Environmental toxicology and chemistry* 39, 667–677.
- Chung, J.S., 2010. Hemolymph ecdysteroids during the last three molt cycles of the blue crab, *Callinectes sapidus*: quantitative and qualitative analyses and regulation. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America* 73, 1–13.

- Coulaud R., Geffard O., Vigneron A., Quéau H., François A., Chaumot A. Linkind feeding inhibition with reproductive impairment in *Gammarus* confirms the ecological relevance of feeding assays in environmental monitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry* 34, 1031-1038.
- Drach, P., 1939. Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes. *Ann. Inst. Oceanogr. Monaco* 19, 103–391.
- Drach, P., Tchernigovtzeff, C., 1967. Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. *Vie et milieu* 595–610.
- Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagianti, S., Noël, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., 2010. Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: application for reproductive toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 2249–2259.
- Gismondi, E., Thomé, J.-P., 2014. Effects of two PBDE congeners on the moulting enzymes of the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Environmental pollution* 191, 119–125.
- Gouveia, D., Chaumot, A., Charnot, A., Queau, H., Armengaud, J., Almunia, C., Salvador, A., Geffard, O., 2017. Assessing the relevance of a multiplexed methodology for proteomic biomarker measurement in the invertebrate species *Gammarus fossarum*: A physiological and ecotoxicological study. *Aquatic Toxicology* 190, 199–209.
- Jegla, T.C., Ruland, C., Kegel, G., Keller, R., 1983. The role of the Y-organ and cephalic gland in ecdysteroid production and the control of molting in the crayfish, *Orconectes limosus*. *Journal of comparative physiology* 152, 91–95.
- Jubeaux, G., Simon, R., Salvador, A., Quéau, H., Chaumot, A., Geffard, O., 2012. Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males. *Aquatic toxicology* 112, 72–82.
- Lacaze, E., Devaux, A., Jubeaux, G., Mons, R., Gardette, M., Bony, S., Garric, J., Geffard, O., 2011. DNA damage in *Gammarus fossarum* sperm as a biomarker of genotoxic pressure: intrinsic variability and reference level. *Science of the total environment* 409, 3230–3236.
- R Core Team, 2018. R: a language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, n.d.
- Rinderhagen, M., Ritterhoff, J., Zauke, G.-P., 2000. Crustaceans as bioindicators, in: *Biomonitoring of Polluted Water-Reviews on Actual Topics*. Trans Tech Publications-Scitech Publications, Environmental Research Forum. pp. 161–194.
- Soumoff, C., Skinner, D.M., 1983. Ecdysteroid titers during the molt cycle of the blue crab resemble those of other Crustacea. *The Biological Bulletin* 165, 321–329.
- von der Ohe, P.C., Liess, M., 2004. Relative sensitivity distribution of aquatic invertebrates to organic and metal compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 23, 150–156.

Xuereb, B., Chaumot, A., Mons, R., Garric, J., Geffard, O., 2009. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys. *Aquatic toxicology* 93, 225–233.

VIII. Synthèse et discussion

Le présent chapitre propose une analyse synthétique et transversale des principaux résultats acquis au cours des travaux détaillés dans les chapitres III à VII. Une première partie dresse un état des lieux du retour d'expérience sur l'utilisation de *Palaemon serratus* dans un contexte d'écotoxicologie, plus particulièrement en ce qui concerne l'évaluation de l'atteinte au processus de mue. La seconde partie établit une revue critique des méthodologies mises en place pour mesurer l'activité de la NAGase et les propriétés structurales de la cuticule. La troisième partie discute de la cohérence des réponses mesurées dans un contexte purement écophysiologique. Enfin, le périmètre d'applications de ces réponses en tant que marqueurs d'altération de mue, et les effets qui ont pu être observés, sont discutés au cours d'une quatrième et dernière partie.

L'évaluation des atteintes à la mue des crustacés pourrait être adressée comme une problématique sensible, du fait du rôle essentiel de ce processus dans le maintien et le développement chez ces organismes, ainsi que de l'accumulation de preuves rapportant son altération par l'action des contaminants. Pour cela, la mise en place de méthodologies permettant la mesure robuste de marqueurs associés à la mue s'établit comme une nécessité. Si des méthodologies permettent actuellement de suivre des réponses associées à la mue dans un contexte contrôlé de bioessais de laboratoire, très peu ont été proposées pour suivre l'état de santé de populations *in natura*. Ainsi, selon certains auteurs, en raison de ce vide méthodologique, l'altération de la mue chez les populations sauvages de crustacés demeure à ce jour une « perturbation invisible » (Zou, 2005).

Dans ce contexte, l'objectif de ces travaux de thèse visait à identifier et développer des marqueurs candidats, susceptibles de détecter des altérations de la mue chez les crustacés, mobilisables à la fois dans un contexte contrôlé de bioessais et/ou dans le cadre de suivis de populations *in natura*. Ces travaux ont été conduits chez une espèce littorale de crevette, le bouquet *Palaemon serratus*, modèle d'étude du laboratoire SEBIO depuis quelques années. Ils se sont focalisés sur deux réponses biologiques en lien avec la mue – *i.e.* la mesure de l'activité d'une enzyme chitinolytique, la NAGase, et la caractérisation des propriétés structurales de la cuticule par approches physico-chimiques. Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire d'écotoxicologie de l'INRAE de Lyon-Villeurbanne, la méthodologie de mesure de l'activité de la NAGase a secondairement fait l'objet d'un transfert chez une espèce de crustacé emblématique en écotoxicologie aquatique continentale, le gammare *Gammarus fossarum*.

Ce chapitre de synthèse jette un regard transversal sur les principaux résultats obtenus, articulant la réflexion autour des questionnements fondateurs qui ont guidés le cheminement expérimental de ce travail :

- Quel sont les avantages et les limites de l'utilisation des Palaemonidae dans un contexte d'évaluation de l'atteinte au processus de mue ?
- Quelles conditions doivent être respectées pour assurer une mesure robuste de l'activité NAGase chez *Palaemon serratus* ? Quels paramètres utilisés lors de la mise en place des approches physicochimiques permettent de caractériser de manière simple et répétable la structure cuticulaire de la crevette bouquet ?
- Les réponses mesurées sont-elles en cohérence avec l'écophysiologie de l'organisme, en particulier au regard du cycle de mue ? Comment cela peut-il influencer l'application et l'interprétation de ces réponses en tant que marqueurs ?

- Les réponses mesurées permettent-elles de discriminer des atteintes au processus de mue tant en conditions contrôlées que dans le cadre d'études de terrains ? Après un premier retour d'expérience, quels périmètres d'application et d'interprétation peuvent être envisagés pour ces marqueurs ?

8.1. Intérêt du modèle *Palaemon serratus*

Les crevettes bouquets ont été retenues comme modèles d'étude lors des présents travaux de thèse, d'après les connaissances préalablement établies. A l'instar des Palaemonidae, *Palaemon serratus* répond à de nombreux critères de sélection d'une espèce sentinelle (d'après Berthet *et al.* 2015, voir section 2.1). Ces critères et connaissances *a priori* ont conduit à l'introduction et l'utilisation depuis quelques années de *P. serratus* au laboratoire SEBIO Le Havre, dans une perspective de répondre à des questionnements d'écologie et d'écotoxicologie (*e.g.* thèse Alexandre Erraud, 2015-2018 ; thèse Jean Baptiste Baudet, 2020-2023). Ainsi, l'interaction régulière avec cette espèce au niveau de la baie de Seine permet de disposer d'un regard critique concernant son utilisation en laboratoire et sur le terrain.

P. serratus est une espèce qui peut être échantillonnée tout au long de l'année. Malgré tout, sa phénologie (détaillée dans la synthèse bibliographique, section 2.1.) influence sa répartition le long du transect de la côte au large. Ce simple fait conditionne sa disponibilité, les moyens de pêche à mobiliser pour son échantillonnage et, en définitive, le périmètre d'utilisation en fonction de la saison. En baie de Seine, *P. serratus* est très présente sur la zone intertidale de mai à novembre. Durant cette période, les spécimens sont facilement échantillonnables depuis le bord *via* des techniques de pêches à pied (voir section 2.1.2.). Cette période est propice à la multiplication des stations d'échantillonnage localisées le long d'un trait de côte, dans une approche de surveillance passive (*i.e.* évaluation de l'état de santé d'organismes autochtones). Cette méthode présente l'avantage de pouvoir accéder à des prélèvements homogènes, majoritairement composés de spécimens de classes d'âges 0 et 1 (selon les critères de Campillo, 1979). En revanche, elle est limitante pour l'accès aux classes d'âge supérieures et ne permet de capturer, la plupart du temps, que de petits effectifs d'individus calibrés (*i.e.* quelques dizaines). A titre d'exemple, lors des approches passives réalisées au cours des travaux de thèse, l'obtention d'une vingtaine d'individus mâles de taille homogène s'effectuait en un intervalle de temps compris entre 1h30 et 2h30, comptabilisé lors de l'arrivée sur site. A l'inverse, lors du retrait des individus vers les zones plus profondes, au large, de décembre à avril, le prélèvement des crevettes ne peut se réaliser que par des techniques nécessitant des moyens à la mer (*e.g.* mise en place de casiers). Cette période est donc moins favorable à la multiplication des stations d'études qui demanderait un déploiement logistique beaucoup plus lourd que celui cité précédemment. En revanche, les spécimens calibrés (*i.e.* classes d'âge 1-2) sont disponibles en abondance auprès des pêcheries professionnelles, permettant d'accéder aux effectifs nécessaires (*i.e.* jusqu'à plusieurs centaines

d'individus) pour la mise au point des méthodes et la réalisation de bioessais de laboratoire et/ou *in situ* (i.e. transplantations d'organismes dans des systèmes d'encagement).

Au cours de cette thèse, comme dans le cadre d'autres travaux menés au sein du laboratoire, les spécimens adultes de *P. serratus* ont été utilisés avec succès dans le cadre de bioessais chroniques (sur plusieurs semaines), tant en conditions contrôlées de laboratoire (Erraud *et al.* 2019a, b ; voir article 4 en section 6.1.), que dans le cadre de transplantation *in situ* dans des systèmes d'encagement (projets SASHIMI⁵ et BIOSURVEILLANCE⁶, actuellement en cours). Dans ces cadres, la taille modeste de la crevette permet de disposer d'un effectif permettant d'obtenir une puissance statistique élevée avec une logistique minime. Toutefois, des taux de mortalité non négligeables ont régulièrement été enregistrés, indépendamment des traitements appliqués. A titre illustratif, Erraud *et al.* (2019 a,b) observaient régulièrement des mortalités de 30 à 35% sur des durées de bioessais de 15 à 30 jours. Le même constat a été rapporté à l'issue d'expositions de 15 jours, *in situ* (Xuereb, communication personnelle). Au cours de ces travaux de thèse, une mortalité moyenne d'environ 30 % a été observée, indépendamment du traitement, lors du bioessai d'exposition *in vivo* de 21 jours (voir Article 4, section 6.1.). En parallèle, l'indice de condition a montré une décroissance homogène quel que soit le traitement, témoignant de conditions stressantes pour les crevettes et leur maintenance. Ce stress amplifie les actes d'agressivité entre spécimens, les mortalités ayant pu être, dans la quasi-totalité des cas, reliées à des actes de cannibalisme sur les spécimens venant de muer. A ce niveau, l'optimisation des conditions représente un véritable levier d'amélioration. Ainsi, les caractéristiques des enceintes de stabulation (e.g. nature du substrat, compartimentation), l'enrichissement du milieu en supports et refuges, l'amélioration des conditions et de la qualité du nourrissage constituent autant de pistes actuellement en cours d'étude.

Dans un contexte plus spécifique, certains éléments viennent appuyer l'intérêt du modèle *P. serratus* pour l'étude du processus de mue et de ses altérations. En effet, le modèle *P. serratus* dispose de connaissances *a priori* sur le mécanisme de régulation de la mue. Ainsi, à l'issue d'études basées sur la crevette bouquet ou des individus apparentés, des connaissances ont été acquises sur la concentration hémolymphatique d'ecdystéroïdes au cours de la mue (Baldaia *et al.* 1984 ; Okimura & Aida, 2000), l'expression et l'activité de la chitinase (Zhang

⁵ Projet SASHIMI : Surveillance active de l'impact de la pression chimique par des biomarqueurs. Financement de l'Office Français de la Biodiversité - 2018-2021. <https://www.seine-aval.fr/projet/sashimi/>

⁶ Projet BIOSURVEILLANCE : Proposition d'un pilote basé sur l'utilisation de biomarqueurs pour un appui à la surveillance de la qualité des masses d'eau du district Seine-Normandie. Financement Agence de l'Eau Seine-Normandie – 2019-2022. <https://www.seine-aval.fr/projet/biosurveillance/>

et al. 2014), ainsi que de la NAGase (Spindler-Barth *et al.* 1990). D'autre part, la description macroscopique du cycle de mue, de son temps de réalisation et des différents stades subdivisant ce cycle sont documentés (Drach & Tchernigovtzeff, 1967 ; Richard, 1978 ; Erraud *et al.* 2018a). Concernant le temps de mue de *P. serratus*, celui-ci a été établi comme étant d'environ 30 jours à 14°C, et environ 20 jours à 20°C, pour les organismes d'une longueur standard⁷ mesurée entre 4 et 5 cm (soit une longueur totale de 5-7 cm de selon si l'on compare nos mesures avec celles présentes en littérature : Richard, 1978). Ces résultats corroborent parfaitement ceux obtenus lors de l'exposition *in vivo* réalisée au cours de cette thèse (*i.e.* révolution de stade D1' au prochain stade D2 réalisée en $21,4 \pm 0,5$ jours à 20 °C, voir article 4 en section 6.1.), soulignant la robustesse et la régularité des temps d'intermue chez *P. serratus*. D'un point de vue logistique, ces délais d'intermue et leur régularité sont tout à fait compatibles avec la mise en place d'une méthodologie de bioessai standardisée, axée sur le suivi d'un ou plusieurs cycles de mue, telle que développée chez d'autres modèles crustacés tels que le gammaré *G. fossarum* (*e.g.* Geffard *et al.* 2010 ; Chaumot *et al.* 2020 ; Lopez *et al.* 2020). Par ailleurs, la description des stades de mue sur la base de la progression de la sétogénèse peut se faire *via* l'observation par transparence des soies de l'extrémité des uropodes chez les Palaemonidae. Cette caractéristique a permis de mettre une méthode non invasive de monitoring des stades de mue chez *P. serratus* (voir Figure III-5 et section 3.1.2.). Cette approche ne nécessite pas de sacrifices d'organismes, ni de vivisection d'organes occasionnant un stress notoire chez les individus, contrairement à d'autres crustacés utilisés dans le cadre de bioessais (*e.g.* Gammaridae, Daphnidae, Brachyours). Cette méthodologie de suivi apporte un réel avantage lors d'observations d'organismes mise en stabulation/exposition puisque *i)* elle permet le suivi de la progression et de la durée des stades au fil de l'eau chez un même organisme et *ii)* offre la possibilité de définir l'arrêt des manipulations selon la synchronisation des individus à un même stade de mue. Une autre caractéristique intéressante de *P. serratus* réside dans la taille des spécimens, suffisante pour permettre l'analyse de différents marqueurs de mue, sur différentes régions anatomiques et compartiments fluidiques. Cette caractéristique a notamment permis d'investiguer différents organes dans le cadre de l'optimisation du protocole de la mesure de l'activité NAGase (voir article 1 en section 4.1.), ou tout simplement de pouvoir considérer les propriétés structurales de la cuticule individualisée (voir article 3 en section 5.1.), voire de pièces cuticulaires spécifiques (au contraire de petits crustacés des Gammaridae : Hilton *et al.* 1984). Enfin, la dernière caractéristique, qui n'a pas été exploitée

⁷ Pour Pierre Richard (1978), la longueur standard équivaut à la longueur entre le pédoncule oculaire et l'extrémité du telson.

dans le cadre de ce travail de thèse, consiste en la possibilité de sectionner les pédoncules oculaires des organismes. Ce processus, propre aux décapodes, permettrait de priver l'individu du contrôle neuroendocrinien de la mue en ôtant le complexe glande du sinus/organe X, sécréteur de la MIH et de la CHH. La levée du frein neuroendocrinien permettrait alors d'induire un pic d'activité d'ecdystéroïdes et d'enzymes chitinolytiques. Cette manipulation, associée à l'exposition des spécimens en conditions contrôlées de laboratoire, a été proposée pour étudier le potentiel de certains contaminants à inhiber le processus de mue (Moreno *et al.* 2003 ; Zou, 2005 ; Luo *et al.* 2015 ; Zou, 2020)

L'ensemble de ces caractéristiques font de la crevette *P. serratus* un modèle d'intérêt en écotoxicologie des milieux marins particulièrement intéressants lors de l'étude d'altération de la mue, et un potentiel binôme d'étude au modèle d'eau douce *Gammarus fossarum* - fortement utilisé en écotoxicologie – permettant une approche des problématiques de qualité des masses d'eaux le long du continuum terre – mer.

8.2. Méthodologies de mesures des marqueurs de mue

La phase de développement et d'optimisation est un prérequis essentiel avant toute mise en situation d'une méthodologie de mesure. Cette phase vise à i) affiner les protocoles de mesure, et ii) caractériser les métriques étudiées au regard de critères tels que leur robustesse, leur répétabilité ou leur sensibilité, avec pour objectif ultime de définir le périmètre d'interprétation en garantissant un minimum de biais. Dans le cadre de ces travaux, les considérations méthodologiques ont été abordées de façons différentes en fonction des réponses biologiques. Ainsi, un grand et minutieux effort d'optimisation a été produit autour de la mesure de l'activité NAGase, dont l'utilisation en tant que biomarqueur avait déjà été rapportée dans la littérature. Concernant l'étude de la structure cuticulaire par approches physico-chimiques, l'objectif était davantage de produire une preuve de concept autour de l'application de ces approches, en tant que marqueurs, et de caractériser les métriques les plus intéressantes.

8.2.1. Optimisation de la mesure de l'activité de la NAGase

L'activité de la N-acétyl- β -D-Glucosaminidase (NAGase ou chitobiase) a été l'une des réponses moléculaires les plus utilisées comme marqueurs de suivi de la qualité de mue des crustacés. En dépit de ce constat, peu d'études se sont focalisées sur le développement de protocoles de mesure de la NAGase par optimisation de la réaction catalysée par cette enzyme. A notre connaissance, nous pouvons mentionner sept publications rapportant des efforts d'optimisation de la mesure d'activité de la NAGase chez les Arthropodes (insectes : *Drosophila hydei* : Spindler, 1976 ; *Locusta migratoria* : Zielkowski & Spindler, 1978 ; crustacés : *Euphausia superba* : Spindler & Buchholz, 1988 ; *Meganyctiphanes norvegica* : Buchholz & Vetter, 1993 ; *Daphnia magna* : Espie & Roff, 1995 ; *Uca pugilator* : Zou & Fingerman, 1999a ; *Litopenaeus vannamei* : Xie *et al.* 2004), contre plusieurs dizaines d'autres publications utilisant l'activité de la NAGase comme marqueurs de la qualité de mue. A titre d'exemple, les anciens travaux faits chez *P. serratus*, visant à déterminer la cinétique d'activité de la NAGase au cours du cycle de mue, ont été réalisés par l'utilisation d'un protocole adapté à l'hexapode *Drosophila hydei*, questionnant sur la justesse des résultats obtenus (Spindler-Barth *et al.* 1990). De plus, la comparaison de ces travaux d'optimisation ne révèle aucun réel consensus tant sur les paramètres qui ont été optimisés que sur la méthodologie de mesure à appliquer, soulignant la nécessité de repenser des questions de méthodes spécifiques au modèle étudié.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, le protocole de mesure de l'activité NAGase a finalement fait l'objet d'un travail d'optimisation chez deux espèces, la crevette *P. serratus* (voir Article 1, section 4.1.) et le gammare *G. fossarum* (voir note 2, section 7.1.). Le premier élément méthodologique qui pouvait être questionné était l'organe à utiliser pour extraire l'enzyme NAGase. Au regard des dimensions des gammarès, la question a été tranchée assez rapidement ; l'extraction a été pratiquée sur le corps entier après retrait du tube digestif et de l'hépatopancréas pour une mesure exclusive des NAGase épidermiques. Chez la crevette, quatre organes ont été testés – *i.e.* le dernier segment abdominal, telson, uropodes et périopodes. Ces derniers ont été sélectionnés en raison de leur facilité de collecte en comparaison de l'épiderme, classiquement utilisé pour cette mesure (*e.g.* Spindler, 1976 ; Buchholz, 1989). *In fine*, la réalisation d'un protocole de mesure adapté à chaque organe a permis d'obtenir des niveaux de réponse similaires à ceux de l'épiderme. De plus, les profils d'activité NAGase observés le long du cycle de mue ainsi que lors d'expositions à des contaminants étaient comparables entre les organes testés. A l'issue de ces essais, le dernier segment abdominal et les uropodes montraient de hauts niveaux d'activité tout en ayant les plus faibles variabilités inter individuelles. En conséquence, ces deux organes sont devenus d'intéressantes alternatives pour remplacer l'épiderme dans l'analyse de l'activité de la NAGase chez *P. serratus*, particulièrement lors de manipulations impliquant un grand nombre d'individus. Parallèlement, plusieurs paramètres réactionnels ont également été testés selon la même procédure chez la crevette et le gammare, incluant *i)* la nature et le pH du tampon de réaction, *ii)* la concentration en substrat spécifique, *iii)* le volume d'extrait enzymatique à ajouter au milieu réactionnel et *iv)* les temps d'arrêt en phase linéaire de la réaction. Les résultats ont mis en évidence des différences de préférendums des NAGases de chaque espèce, notamment en concentration de substrat. Ainsi, l'optimum de concentration de substrat était obtenu à 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pour le gammare et 750-1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pour l'épiderme et le dernier segment de la crevette. Au regard de la littérature, le préférendum de concentration en substrat semble varier selon le crustacé considéré : celui-ci a été estimé à 1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ chez *D. hydeii* (Spindler, 1976), 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ chez *D. magna* (Espie & Roff, 1995), 300-500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ chez *E. superba* (Spindler & Buchholz, 1988) et 300 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ chez *M. norvegica* (Buchholz & Vetter, 1993). Ce constat accentue encore un peu plus l'importance d'adapter le protocole de mesure de la NAGase à l'espèce considérée. En parallèle, la réaction catalysée par les NAGases des deux espèces utilisées au cours de la thèse (*i.e.* le gammare et la crevette bouquet) ont indiqué des similarités dans leur cinétique, avec la présence d'une zone de linéarité établie, selon les conditions de préparations des échantillons, jusqu'à 40 min. Ce paramètre reste important à déterminer car la

prise en compte des valeurs d'absorbance en dehors de la zone de linéarité conduirait automatiquement vers une sous-estimation de l'activité et de l'interprétation. Malgré l'aspect primordial de définir ce paramètre, celui-ci n'a été que très peu estimé chez les Arthropodes. A titre d'exemple, Spindler (1976) a estimé la zone de linéarité de la NAGase à 60 min chez la drosophile *D. hydei*, tandis qu'Espie & Roff (1995) ont mesuré une réaction linéaire sur 10 min chez la daphnie *D. magna*. Au regard de ces exemples, la linéarité de la réaction induite par la NAGase semble fortement varier selon la préparation de l'échantillon, le protocole de mesure et/ou l'espèce considérée. De plus, le retour sur expériences, notamment réalisées chez le gammare, indique que la zone de linéarité est influencée par les variations de niveaux d'activités NAGase induits au cours du cycle de mue. La définition de la zone de linéarité de la NAGase, utilisée en tant que marqueur de mue, est par conséquent à définir au regard des zones d'activités les plus fortes (*i.e.* fin de prémue).

La sensibilité de l'activité de la NAGase de *P. serratus* à l'encontre de divers composés chimiques a été évaluée dans le cadre d'essais d'exposition *in vitro* (article 2, section 4.2.). L'objectif ici était de vérifier si de potentiels contaminants avaient la capacité d'altérer l'activité de cette enzyme par action directe et spécifique, ou si leur action de perturbation devaient nécessairement porter atteinte aux cascades de régulations, en amont. Pour cela, un protocole de screening *in vitro* sur extraits non-purifiés a été développés. Ainsi, sur 19 composés testés, sept ont été démontrés pour induire une altération de l'activité de la NAGase de *P. serratus*, parmi lesquels figuraient des métaux lourds (cadmium, zinc), des pesticides (RH5849, dithiocarbamate), des agonistes de l'hormone juvénile (fenoxycarbe), des solvants organiques (DMSO), ainsi que des substances médicamenteuses (pentoxifylline). Il est ainsi intéressant de noter que la pentoxifylline, connue pour inhiber fortement l'activité des enzymes chitinolytiques chez les bactéries et champignons (*e.g.* Rao, 2005 ; Cohen, 2010 ; Tsirilakis *et al.* 2011), a également induit cet effet sur la NAGase de *P. serratus*. *In fine*, ce composé pourra être utilisé en tant que témoin positif lors de la réalisation de screening *in vitro* de composés sur l'activité de la NAGase chez la crevette bouquet. De plus, parmi l'ensemble des composés induisant un effet sur ce marqueur, trois d'entre eux, le cadmium, le zinc et le DMSO, ont déjà montré les mêmes effets lors d'expositions *in vitro* des NAGases d'autres crustacés (Xie *et al.* 2004 ; Lin *et al.* 2005 ; Pan *et al.* 2006 ; Yang *et al.* 2006 ; Pan *et al.* 2007 ; Zhang *et al.* 2010). En parallèle, le cadmium et la pentoxifylline ont induit des inhibitions de l'activité NAGase dans le cadre d'expositions *in vivo* d'Arthropodes (cadmium : Luo *et al.* 2015 ; Mesquita *et al.* 2015 ; pentoxifylline : Husen *et al.* 2015). Au regard de ces données, l'activité de la NAGase

n'apparaît pas exclusivement comme un marqueur d'intégration des perturbations survenant sur les mécanismes régulatoires en amont, mais constitue également une cible directe pour les contaminants. L'analyse approfondie du screening *in vitro*, intégrant davantage de molécules connues ou suspectées pour altérer le processus de mue affinerait notre regard sur la capacité de la NAGase à être directement altérable.

En parallèle, l'acquisition des data relatives aux activités NAGase mesurées à travers la réalisation de plusieurs manipulations a permis de mettre en lumière la bonne reproductibilité de la mesure (**Tableau VIII-1**). Ainsi, en prenant les individus de stade D2, l'activité NAGase des derniers segments montrait un coefficient de variabilité de 19.6 % tandis que celui des uropodes était de 16.2 % (N = 20 + 19 homogénats et 20 respectivement). Ces coefficients apparaissent d'autant plus faibles en tenant compte de la variabilité des niveaux de NAGase induit par le pic d'activité surgissant en fin de prémue. De plus, ces valeurs sont approximativement similaires en comparaison avec les coefficients de variabilités relatifs aux différentes manipulations. En conséquence, les méthodologies mises en place au cours de ces travaux de thèse permettent de mesurer l'activité NAGase sur des crevettes bouquet, avec la possibilité de réaliser différentes sessions de mesure sans altérer la qualité de la mesure. De plus, la simplicité de mesure et l'utilisation de tissus faciles à extraire permettent de mesurer l'activité NAGase sur un grand nombre d'individus en peu de temps, faisant de ce marqueur un candidat intéressant à la biosurveillance de la qualité de la mue chez les populations de *P. serratus* présentes en baie de Seine.

Tableau VIII-1 Variabilité des mesures des activités NAGase réalisées sur le dernier segment abdominal et les uropodes de *Palaemon serratus*, déterminée selon les différentes manipulations réalisées au cours des travaux de thèse. La variabilité des mesures est exprimée selon le coefficient de variabilité calculé pour chacune des manipulations réalisées au cours de cette thèse, plus particulièrement les individus en D2 sélectionnés pour l'optimisation méthodologique (n = 10), utilisés en contrôle lors de l'exposition *in vitro* (n = 19 homogénats pour le dernier segment) et en tant que témoin lors du bioessai *in vivo* (n = 10).

Tissu	Manipulation	Stade	Individus	Coefficient de variabilité (%)
Segment	Optimisation méthodologique	D2	10	31.0
	Exposition <i>in vitro</i>	D2	19 homogénats (8 crevettes / homogénat)	11.3
	Bioessai <i>in vivo</i>	D2	10	19.5
	Tout individu	D2	-	19.5
Uropodes	Optimisation méthodologique	D2	10	18.3
	Bioessai <i>in vivo</i>	D2	10	14.7
	Tout individu	D2	20	16.2

8.2.2. Caractérisation des propriétés physicochimiques de la cuticule

Plusieurs outils ont été sollicités pour caractériser les propriétés inhérentes à la structure de la cuticule de *P. serratus*. Des analyses thermiques par calorimétrie et thermogravimétrie ont ainsi été mobilisées pour déterminer la composition et l'arrangement du réseau du biocomposite. La composition chimique des surfaces internes et externes a été étudiée par spectrométrie infrarouge. Enfin, la composition de la fraction minérale a été décrite par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (en prestation auprès du laboratoire La Drôme). Si de telles analyses avaient déjà été utilisées pour caractériser la cuticule chez quelques espèces de crustacés (Hilton *et al.* 1984 ; Becker *et al.* 2005 ; Bosselmann *et al.* 2007 ; Romano *et al.* 2007 ; Zhou *et al.* 2010 ; Wang *et al.* 2013), cela l'a plus rarement été sur le biocomposite brut en comparaison du matériau purifié, et toujours dans une approche descriptive ponctuelle. La première phase du travail a alors consisté à identifier les approches et/ou les métriques les plus intéressantes pour une application dans un contexte d'étude dynamique d'écophysiologie et/ou d'écotoxicologie, autorisant la comparaison de plusieurs conditions. Les conditions de mesure utilisées au cours de cette thèse ont été obtenues après plusieurs aller-retours entre les méthodes utilisées dans la littérature et les résultats constatés par l'application de ces méthodes sur la cuticule de *P. serratus*. Le coté non exhaustif de la

démarche suscite plusieurs leviers d'amélioration qui feront l'objet d'études ultérieures à la présente thèse.

Ainsi, plusieurs choix méthodologiques ont été réalisés à l'issue de différents essais d'analyses des propriétés thermiques de la cuticule de *P. serratus*. Concernant l'étude calorimétrique (*i.e.* DSC), la réalisation de manipulations exploratoires visant à détecter les différents événements caractérisant la cuticule a mené à tester divers programmes de chauffage et de refroidissement. Parmi ceux-ci, un programme de « chauffe-refroidissement-chauffe » a été testé, comme mis en œuvre par Wang *et al* (2013), afin de détecter des événements de cristallisation et reformation de l'arrangement du réseau, sans succès. De plus, contrairement à la caractérisation des matériaux polymères, aucune transition vitreuse n'a été détectée au cours des différentes manipulations. Après avoir préalablement identifié 2 événements (voir **Figure III-11**), le programme retenu a été un chauffage progressif entre 4 et 500°C. Les 2 événements ainsi détectés sont retranscrits sous forme de dégradations des matériaux en raison de *i)* l'évaporation de l'eau liée *-i.e.* eau restante après lyophilisation des échantillons- et *ii)* la dégradation des macromolécules légères, telles que les protéines hydrophiles, présentes dans le réseau cuticulaire. L'observation de ces 2 événements était corroborée par d'autres études en lien avec la caractérisation des matériaux constituant la cuticule des crustacés (Kittur *et al.* 2002 ; Zhou *et al.* 2010 ; Wang *et al.* 2013 ; Juarez-De la Rosa *et al.* 2015). De plus, à l'exception de l'amplitude des pics, les paramètres sélectionnés pour caractériser les événements observés par DSC étaient répétables au cours des différentes manipulations (analyse sur cuticules en D2 utilisées lors de deux manipulations : coefficient de variation < 20 %, **Tableau VIII-2**), faisant de la DSC une technique prometteuse pour la description et le suivi cuticulaire chez *P. serratus*. Malgré cet aspect encourageant, des leviers d'améliorations restent à déployer dans la praticité à analyser des échantillons bruts de cuticules. Parmi eux figure l'adaptation des coupelles à la pression générée par la dégradation des matériaux : lors des programmes de chauffe, la pression issue de l'évaporation de l'eau et de la dégradation des protéines était si importante qu'elle entraînait dans de nombreux cas la fuite des coupelles. De ce phénomène résultait l'apparition d'artéfacts de mesure sur les thermogrammes mais aussi l'encrassement des fours par les organiques volatils produits par la réaction. A titre d'exemples, il a été pensé d'utiliser des coupelles résistantes à de hautes pressions provoquées par la dégradation de la cuticule, ainsi qu'à utiliser une quantité plus faible d'échantillons lors des programmes de chauffe. De telles propositions seront mises à l'épreuve à la suite de ces travaux

de thèse dans le cadre de tests visant à adapter la méthode de DSC à l'étude de la cuticule de *P. serratus*.

Tableau VIII-2 Variabilité des métriques mesurées relatives aux deux événements détectés par analyse DSC sur la cuticule de *Palaemon serratus*. La variabilité des mesures est exprimée selon le coefficient de variabilité calculé pour chacune des manipulations réalisées au cours de cette thèse, plus particulièrement les individus en D2 sélectionnés pour l'optimisation méthodologique (n = 10) et en tant que témoin lors du bioessai *in vivo* (n = 10).

Tissu	Manipulation	Optimisation méthodologique	Bioessai <i>in vivo</i>	Tout individu
Premier événement Evaporation de l'eau liée	Température de début	15,3	15,6	18,0
	Température au pic	9,6	12,2	11,3
	Température de fin	8,2	13,8	11,7
	Enthalpie	98,0	114,5	119,7
Deuxième événement Dégradation des protéines	Température de début	9,3	0,1	7,0
	Température au pic	8,1	3,6	6,6
	Température de fin	9,0	5,2	7,1
	Enthalpie	52,3	19,8	59,5

Concernant l'analyse thermogravimétrique (ATG), très peu d'optimisation méthodologique a été réalisée. L'idée principale était de soumettre la cuticule à une gamme de chauffe étendue, retenue comme étant de 20 à 900°C. De cette manière, l'ATG a permis d'identifier la composition et l'organisation des matériaux constituant la cuticule de *P. serratus* (voir **Figure III-12**), mais aussi de récupérer la fraction minérale restant après analyse, en vue de l'étudier par analyses complémentaires (*e.g.* évaluation de la proportion des métaux par technique d'ICP). A l'issue de l'analyse par ATG, quatre événements majeurs (*i.e.* pertes de masse) ont été identifiés, correspondant à *i*) l'évaporation de l'eau liée, *ii*) la dégradation des protéines légères, *iii*) la fin de décomposition des macromolécules organiques, associée à la dégradation de la chitine, et *iv*) l'oxydation et la volatilisation de la fraction inorganique labile. Cette composition, associée à l'organisation de ces matériaux dans la cuticule, a été montrée comme étant proche de celle caractérisée chez des spécimens d'Astacidae (Hilton *et al.* 1984 ; Bosselmann *et al.* 2007 ; Romano *et al.* 2007) de Penaeidae (Al Sagheer *et al.* 2009) et d'autres crevettes dont l'affiliation taxonomique n'a pas été précisée (Huang *et al.* 2018 ; Zhao *et al.* 2019). Par ailleurs, la variabilité exprimée par les différents paramètres mesurés pour chaque

événement a été montrée comme étant relativement faible entre les différentes manipulations entreprises. Ainsi, en se basant sur l'analyse des cuticules de spécimens en stade D2 (*i.e.* stade majoritairement utilisé à travers les différentes expérimentations d'optimisation méthodologique et d'exposition *in vivo* à des composés chimiques), l'ensemble des paramètres mesurés lors des analyses ATG exprimait un coefficient de variation global inférieur à 21 % (calculé sur l'ensemble des données, N = 10 ; **Tableau VIII-3**). Parmi les différents paramètres, les températures d'occurrence du maximum de perte de masse attribuée à la dégradation des protéines, de la chitine et des sels inorganiques apparaissent comme étant fortement reproductible, avec des coefficients de variation globaux à 1,0 % ; 2,0 % et 0,9 % respectivement. De manière générale, les paramètres associés à la dégradation des protéines, de la chitine et des sels inorganiques semblent plus appropriés pour suivre la cuticule dans un contexte dynamique. En effet, ces paramètres ont détecté la modification structurale de la cuticule en fonction du cycle de mue ([voir article 3 section 5.1.](#)), lors d'un stress acide ([voir article 3, section 5.1.](#)) ainsi qu'en fonction de la qualité chimique de l'eau dans laquelle résidaient les crevettes ([voir note 2, section 6.2.](#)).

Tableau VIII-3 Variabilité des métriques mesurées relatives aux quatre événements détectés par analyse ATG sur la cuticule de *Palaemon serratus*. La variabilité des mesures est exprimée selon le coefficient de variabilité calculé pour chacune des manipulations réalisées au cours de cette thèse, plus particulièrement les individus en D2 sélectionnés pour l'optimisation méthodologique (n = 5) et en tant que témoin lors du bioessai *in vivo* (n = 5).

Tissu	Manipulation	Optimisation méthodologique	Bioessai <i>in vivo</i>	Tout individu
Premier événement Evaporation de l'eau liée	Température d'événement	14,3	14,0	14,1
	Perte de masse	12,1	22,2	18,3
Deuxième événement Dégradation des protéines	Température d'événement	0,9	0,8	0,9
	Perte de masse	13,6	17,8	18,1
Troisième événement Dégradation de la chitine	Température d'événement	1,9	2,1	2,0
	Perte de masse	13,9	21,9	20,8
Quatrième événement Volatilisation de la fraction inorganique labile	Température d'événement	0,6	1,0	0,9
	Perte de masse	11,6	14,3	17,4
Fraction minérale restante	Masse relative	6,9	16,9	13,9

Utilisée de manière plus descriptive, l'approche chimique de la caractérisation cuticulaire n'a fait l'objet que de très peu d'optimisation méthodologique. Ainsi, le dosage des éléments métalliques présents dans la fraction minérale restant après analyse d'ATG a permis d'obtenir une donnée qualitative sur la composition cuticulaire chez *P. serratus*. Cette opération, ayant été réalisée par le laboratoire La Drôme (La Drôme Laboratoire, Valence, France), n'a suscité aucune optimisation méthodologique de notre part. Ainsi, ces données se sont avérées informatives notamment en détectant des modifications de proportions de métaux présents dans la cuticule selon l'avancée dans le cycle de mue ([voir article 3, section 5.1.](#)), ainsi que lors de modifications de la qualité chimique du milieu, à la fois en laboratoire ([voir article 4, section 6.1.](#)) mais aussi *in natura* ([voir note 1, section 6.2.](#)). Ces données pourraient être complétées par le dosage des éléments métalliques sur l'intégralité de la cuticule de *P. serratus*, paramètre davantage comparable entre les différents crustacés (*e.g.* Pratoomchat *et al.* 2002b ; Calhoun & Zou, 2016). En ce qui concerne l'analyse par IRTF, la volonté était de caractériser la composition de surface de la cuticule de *P. serratus* par la réalisation d'un spectre d'émission entre 650 cm⁻¹ et 4000 cm⁻¹. Cette manipulation étant réalisée sur le matériau dans sa forme originelle, il a également été possible de comparer la composition des faces internes et externes de chaque cuticule analysée. A défaut de pouvoir comparer la face interne en raison du manque d'information dans la littérature, la face externe de la cuticule de *P. serratus* présente une composition similaire à celle d'autres spécimens de Gonodactylidae (Stankiewicz *et al.* 1998) mais aussi de crabes et de crevettes indéterminés (Gbenebor *et al.* 2016). Le spectre ainsi obtenu a révélé des régions spécifiques à la présence de chitine, de protéines et de sels minéraux, notamment des formes calciques amorphes, complétant les données mises en avant par les analyses thermiques. Par ailleurs, l'utilisation des analyses IRTF a permis de détecter des modifications de structures surfaciques lors de l'application *in vitro* d'acide formique sur la cuticule de *P. serratus* ([voir article 3, section 5.1.](#)), mais aussi et plus intéressant lors du suivi de l'état de santé des populations de crevettes dans la baie de Seine ([voir note 1, section 6.2.](#)), faisant de ce paramètre un potentiel marqueur de mue à approfondir.

8.2.3. Périmètres de déploiement des marqueurs

Les méthodologies développées dans le cadre de cette thèse ont principalement l'objet d'approche en laboratoire. Toutefois, le retour sur expériences permet déjà d'imaginer le périmètre de déploiement de ces marqueurs dans un contexte de suivi environnemental, sur l'unique base de considérations méthodologiques. En effet, l'activité de la NAGase est un outil

facilement déployable. La collecte de tissus d'intérêt (*i.e.* uropodes et/ou dernier segment abdominal) et le dosage enzymatique par colorimétrie sont aisément réalisables, autorisant l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. De manière concrète, il est possible de collecter les tissus d'intérêt et d'analyser l'activité NAGase d'une cinquantaine d'individus en l'espace d'une demi-journée. Ce marqueur apparaît adapté pour un déploiement terrain à large échelle, autorisant des approches sans *a priori*, impliquant des collectes régulières sur un grand nombre de stations d'études. A l'inverse, les méthodes de caractérisation de la structure cuticulaire, bien que très pertinentes, sont beaucoup plus longues à mettre en œuvre. A titre d'exemple, le passage d'un échantillon en ATG nécessite 1 h 48 min pour le programme de chauffe, puis 1 h pour le refroidissement de la machine, sans compter le temps de nettoyage de la nacelle. Par conséquent, le déploiement de ces approches devrait être réservé à la comparaison de stations contrastées nécessitant de moins gros volumes d'échantillons à analyser, comme dans le cadre d'un contrôle d'enquêtes suite à l'observation d'anomalies au sein des populations (*e.g.* perte de rigidité des cuticules), ou de l'étude d'impact d'un rejet ou d'une pollution accidentelle.

8.3. Ecophysiologie des réponses mesurées

8.3.1. Evolution des propriétés structurales de la cuticule et de l'activité de la NAGase au cours cycle de mue

Le cycle de mue chez *P. serratus* a été décrit comme ayant huit stades distincts, dont deux formant la postmue (*i.e.* stades A et B), un représentant l'intermue (*i.e.* stade C) et cinq composant la prémue (*i.e.* stades D0, D1', D1'', D1''' et D2). Ce cycle est régi par une succession d'événements macroscopiques, sous-tendus par des mécanismes de régulations à l'échelle moléculaire. En conséquence, il apparaissait logique *a priori* que les marqueurs de mue analysés au cours de ces travaux de thèse aient une réponse fluctuante au cours des différents stades de mue (**Figure VIII-1**). Ainsi, selon les résultats obtenus par analyse des propriétés thermiques de la cuticule, deux phénomènes particuliers ont été observés : l'augmentation de perte de masse des sels inorganiques totaux, et *a contrario* la diminution de perte de masse associée au réseau protéine-chitine. Ces changements drastiques jusqu'à l'intermue ont également été constatés au niveau de la température d'occurrence du maximum de dégradation des matériaux, associée à leur organisation. Ces observations s'expliquent par deux événements cuticulaires majeurs participant à la complexification de structure en début de cycle.

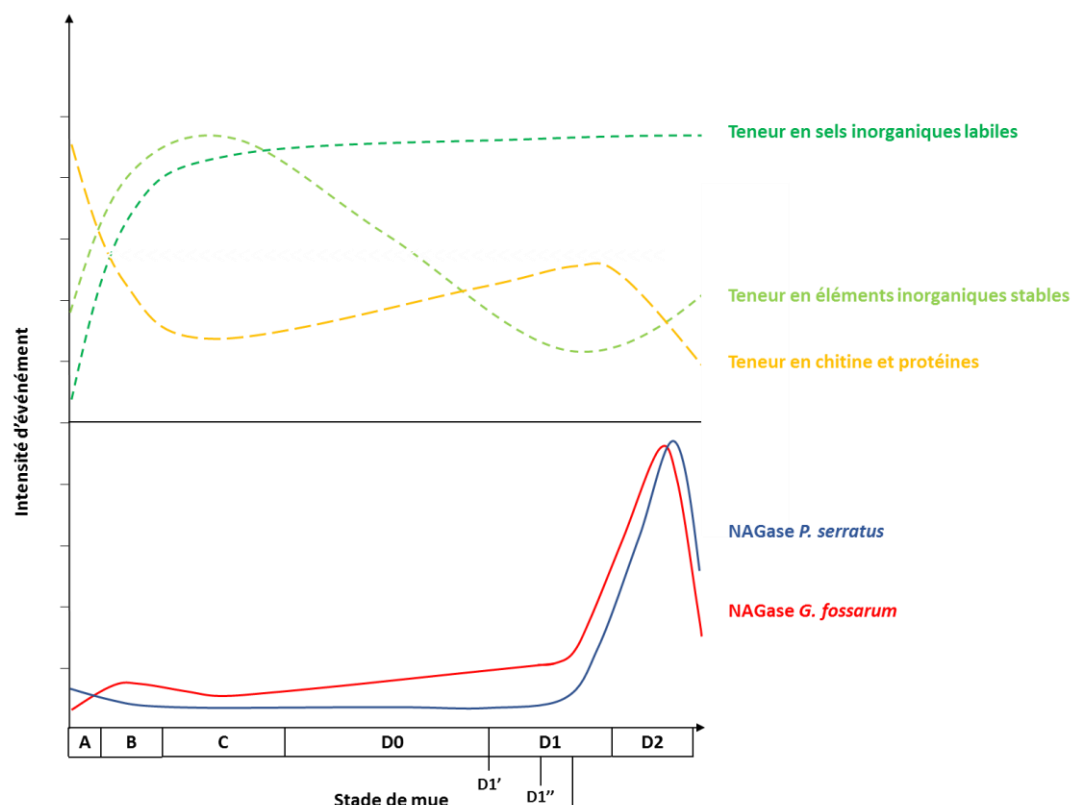


Figure VIII-1 Evolution du signal des marqueurs de mue développés chez *P. serratus* au cours du cycle de mue (crédit : M.Rollin)

En premier lieu survient la minéralisation de la cuticule. Lors de l'exuvie, la libération de l'organisme aquatique conduit à changement de cinétique moléculaire favorisant l'absorption d'eau environnante, permettant également la réalisation de la croissance. Cette internalisation d'eau s'accompagne également d'une absorption d'éléments métalliques présents dans le milieu. Concernant les crustacés terrestres ou en milieu faiblement minéralisés, l'absorption des métaux s'opère majoritairement grâce à l'ingestion de l'ancienne cuticule, couplée à la mise en place d'organes de stockage des métaux (au minimum du calcium) permettant de réabsorber les éléments de la cuticule avant son exuvie (Luquet, 2012). Les éléments ainsi absorbés sont répartis au sein des différents compartiments biologiques, dont la cuticule en cours de formation⁸. Ainsi, différents métaux tels que le calcium augmentent progressivement en quantité au sein de la cuticule au cours de la postmue (Pratoomchat *et al.* 2002b ; Wang *et al.* 2003 ; Wilder *et al.* 2009 ; Calhoun & Zou, 2016). Ces métaux sont connus pour être acheminés au sein des canaux poreux afin de renforcer les différentes couches de la cuticule, réalisant ainsi sa sclérotisation (Modla, 2006). Ce phénomène, bien que longtemps imaginé comme impliquant des formes minérales cristallisées, se réalise bien souvent à l'aide de formes amorphes de calcium et de magnésium, corroborant nos observations de l'augmentation de pertes de masse des sels inorganiques volatils (**Figure VIII-1 courbe vert foncé**). Toutefois, une augmentation de la teneur en éléments inorganiques non labiles s'observait également au cours de la postmue (**Figure VIII-1, courbe vert clair**). En parallèle survient le tannage des chaînes de chitine et de protéine. Ce deuxième phénomène survient par l'acheminement de protéines et d'agents tannants au sein de la cuticule (Travis, 1957 ; Vacca & Fingerman, 1975). Le tannage ainsi effectué consiste à renforcer le réseau chitine-protéine se formant, le rendant plus complexe à dégrader. Chez la crevette bouquet, ce phénomène a été mis en avant par l'augmentation générale de la température de dégradation et de la diminution des pertes de masses associées aux protéines, chitine et sels inorganiques ([article 3, section 5.1.](#) ; **Figure VIII-1, courbe jaune**). Cette dynamique cuticulaire se stabilise lorsque l'intermue est atteinte. La prémue est marquée par le décollement de l'épiderme par rapport à la cuticule, commençant dès le stade D0. D'après les résultats obtenus, ce début de prémue n'a pas suscité de changements majeurs au niveau de la composition cuticulaire. Mentionnons toutefois une diminution de teneur en fraction minérale pouvant s'expliquer par la possible dégradation de l'ancienne cuticule et de la dissolution des métaux en vue d'être stockés (Skinner *et al.* 1992). La prémue voit également se réaliser de manière simultanée la sécrétion de la

⁸ En début de postmue, seule la cuticule pré exuviale (épicuticule et endocuticule) est synthétisée. Les couches post-exuviales se forment au cours du stade B (Skinner *et al.* 1992)

nouvelle cuticule ainsi que la dégradation de l'ancienne. Cette dégradation est issue du contrôle hormonal de la mue, s'aboutissant par une élévation du niveau d'ecdystéroïdes dans l'hémolymph des crustacés (Chang & Mykles, 2011). Chez *P. serratus*, le pic d'ecdystéroïdes a été observé en fin de prémue, au cours du stade D2 (Baldaia *et al.* 1984). Des observations similaires ont été obtenues chez *G. fossarum* (Blanchet *et al.* 1979 ; Abidi *et al.* 2016). Ce pic d'ecdystéroïdes met en place l'activation des récepteurs à ecdysone, parmi lesquels figurent les précurseurs des enzymes chitinolytiques (Meng & Zou, 2009). Ainsi, de manière concomitante aux ecdystéroïdes, l'activité de la NAGase connaît un pic en fin de prémue, comme observée chez *P. serratus* (voir article 1, section 4.1.) et *G. fossarum* (voir note 2, section 7.1.). En réponse à cette hausse d'activité, le réseau protéine-chitine de la cuticule se fragilise par dégradation de ses composants, représentés par la plus faible dégradation du complexe au cours du stade D2. La diminution de la proportion de la chitine et des protéines favorise alors celle des sels inorganiques, ce qui se traduit par une augmentation de la fraction minérale observée en fin de prémue. Ainsi, à travers la dynamique du cycle de mue, les marqueurs d'activité NAGase et de structure cuticulaire répondent de manière cohérente aux événements mis en place au cours du cycle, et de manière variée le long de celui-ci. Il apparaît donc que le cycle de mue est un facteur prépondérant à maîtriser lors de l'analyse d'un des marqueurs associés de près ou de loin à la mue (*e.g.* hormone hyperglycémiant, activité NAGase, synthèse d'ecdystéroïdes). Par extension, lors de manipulations impliquant un grand nombre d'individus, l'analyse de chaque marqueur nécessite au préalable la définition d'une fenêtre d'observation uniforme et adéquate. Ainsi, afin d'étudier l'activité de la NAGase en tant que marqueur de qualité de mue chez des spécimens *P. serratus* exposés à un contaminant, il sera intéressant de focaliser l'analyse sur le stade D2, qui présente une activité forte et *in fine* sensible vis-à-vis de l'action potentiellement altérante du xénobiotique. De manière similaire, l'étude de la composition cuticulaire par ATG des crevettes sera préférentiellement focalisée sur le stade C, qui présente des niveaux de chitine, protéines et minéraux stables. Dans le cadre d'approches passives, ou d'expérimentations proposant un faible échantillonnage de crevettes, cette fenêtre d'observation peut s'étendre du stade C au stade D1', période au cours de laquelle l'activité NAGase et les propriétés thermiques de la cuticule de *P. serratus* restent similaires (article 3, section 5.1.)

8.3.2. Activité N-acétyl-B-D-Glucosaminidase en fonction du sexe des organismes

Contrairement aux travaux de Gismondi & Thomé (2014), aucune différence globale entre spécimens mâles et femelles n'a été observée sur l'activité de la NAGase au cours de ces

travaux de thèse, quelle que soit l'espèce utilisée (*P. serratus* : [article 1, section 4.1.](#) ; *G. fossarum* : [note 2, section 7.1.](#)). Ce constat est possiblement lié à l'absence de prise en compte des stades de mue lors de l'étude réalisée par ces auteurs, pouvant altérer l'interprétation des résultats comme observée à travers la [section précédente](#). Pour nuancer les propos, de légères variations de profils ont été constatées entre les spécimens mâles et femelles de gammares. Ces variations peuvent tirer leurs origines de variations d'activité au niveau des ecdystéroïdes, elles-mêmes supposées apparaître selon l'état de reproduction des organismes ([voir note 2, section 7.1.](#) ; Blanchet *et al.* 1979). En ce sens, ainsi qu'en l'absence de preuves supplémentaires venant confirmer ou infirmer ces hypothèses, il est recommandé d'étudier les marqueurs de mue déployés en se focalisant uniquement sur un ensemble d'individus du même sexe, dont le profil de réponse aura été préalablement analysé au cours du cycle de mue. Dans le cadre de la thèse, un effort tout particulier a été réalisé pour travailler au maximum avec des spécimens crevettes mâles, supposés être moins influencés par leur état de reproduction. *A contrario*, les gammares femelles étaient privilégiés en raison d'une connaissance affinée du déroulement du cycle de mue, notamment grâce à la synchronisation entre la mue et la reproduction des organismes.

8.3.3. Propriétés structurales de la cuticule et écologie des organismes

Au cours de la caractérisation de la cuticule de *P. serratus*, celle-ci s'est avérée être composée de 14 % d'eau liée, 27 % de protéines, 17 % de chitine, 12 % d'éléments inorganiques volatils et de 30 % de fraction minérale stable. La comparaison avec d'autres cuticules de crustacés précédemment caractérisées a permis de déterminer que la crevette bouquet dispose d'une cuticule similaire à celle de crevettes non spécifiées (Huang *et al.* 2018 ; Zhao *et al.* 2019), d'écrevisses et de homards Astacidae (Hilton *et al.* 1984 ; Bosselmann *et al.* 2007 ; Romano *et al.* 2007 : [voir Table 1, section 5.1.](#)). Ces crustacés ont en commun deux caractéristiques majeures : ils résident au sein de milieux aquatiques (de différentes salinités), et disposent d'une homologie morphologique. Plus spécifiquement, ces espèces sont formées d'un long abdomen segmenté, composé de muscles puissants, leur servant à se déplacer en partie par la nage (*i.e.* stratégie utilisée pour fuir un danger ou chasser une proie). D'un point de vue fonctionnel, la performance d'un tel abdomen réside dans sa capacité à se plier et *in fine* à résister aux déformations locales induites par le déplacement. Pour cela, le composant surfacique, à savoir la cuticule, doit aussi être en mesure de résister à de telles déformations mécaniques, notamment par l'adaptation de la teneur et l'organisation des différents matériaux la composant. Cette hypothèse a été soutenue par Neues *et al.* (2007) qui argumentaient en

faveur d'une corrélation entre la composition cuticulaire et les stratégies écologiques (regroupant le mode de vie et les patrons comportementaux) développées par une espèce. Cet argument a été proposé à la suite de l'étude de compositions cuticulaires d'isopodes terrestres. Ces auteurs ont constaté une différence de patron de composition cuticulaire entre les espèces « coureuses » et les espèces « rouleuses » (*i.e.* caractérise les espèces qui lors d'un danger fuient par la course ou se roulent en boule face au prédateur). De manière concrète, chez les Palaemonidae et les Astacidae, l'utilisation avancée d'un long abdomen pour la nage nécessite une cuticule ayant une haute proportion en matrice organique et en sels inorganiques amorphes, et *a contrario* une faible teneur en minéraux cristallins, davantage susceptibles de se briser lors de déformations. A l'inverse, en considérant des espèces marcheuses au fond des milieux aquatiques telles que celles de l'ordre des Brachyura, la cuticule de ces espèces nécessite d'être dense et de résister aux chocs, privilégiant ainsi une plus forte abondance en minéraux cristallins au détriment des fractions organiques et amorphes. Ce constat nécessite cependant une nuance selon la prise d'essai de la cuticule analysée. En effet, la composition de la cuticule est sujette à variation selon la fonction de l'organe considéré (voir **Table 1**, section 5.1.). A titre d'exemple, chez un crabe, un périopode soumis à déformation par articulation aura une cuticule plus riche en fraction amorphe qu'une pince destinée à broyer les coquilles de proies (Fabritius *et al.* 2016 ; Katsikini *et al.* 2020). Il devient alors important de définir une pièce similaire entre différentes espèces afin de réaliser des comparaisons inter cuticulaires. En plus des patrons comportementaux, les stratégies d'adaptation de l'espèce à son écosystème semblent induire des variations dans la composition cuticulaire des crustacés (Fabritius *et al.* 2016). A ce titre, Neues *et al.* (2007) a également comparé la cuticule d'isopodes marins au regard des espèces terrestres, trouvant une plus grande diversité au niveau de la cuticule des organismes aquatiques. Ce constat a été expliqué par la diversité d'habitats rencontrés en milieu marin en comparaison des écosystèmes terrestres, nécessitant une forte stratégie d'adaptation de la physiologie des espèces y résidant. De plus, de telles variations peuvent être également observables au niveau de l'organisation structurale en couche de la cuticule des crustacés, pouvant varier selon le mode de vie des espèces (Pütz & Buchholz, 1991 ; Skinner *et al.* 1992 ; Fabritius *et al.* 2016). Ainsi, l'analyse de la cuticule et de ses propriétés physicochimiques apparaît comme un outil très intéressant dans la recherche basée sur l'évolution des crustacés et leur adaptation à la quasi-totalité des écosystèmes présents sur Terre.

8.4. Application des outils développés en tant que marqueurs d'altération de mue

Au cours de la thèse, trois manipulations différentes ont permis de mettre en application l'activité de la NAGase et l'analyse des propriétés cuticulaires en tant que potentiels outils permettant de détecter des altérations de la mue. Chacune des manipulations a permis de nous questionner sur le périmètre d'application de ces marqueurs dans un tel contexte.

8.4.1. Application des outils en écotoxicologie : de futurs marqueurs d'altération de la mue ?

Les outils développés ont été déployés en premier lieu lors d'une exposition *in vivo* de crevettes mâles *P. serratus* à deux molécules d'intérêt : le cadmium (Cd) et la pentoxifylline (Px) (voir article 4, section 6.1.). Ces deux composés avaient été retenus pour leur capacité à altérer l'activité de la NAGase (Husen *et al.* 2015 ; Luo *et al.* 2015 ; Mesquita *et al.* 2015), mais aussi, concernant le cadmium, à agir comme un compétiteur du calcium, composant inorganique principal de la cuticule. Brièvement, les organismes ont été synchronisés sur la plage de stade de mue D1'-D1'' puis mis à exposer jusqu'au stade D2, par arrêt en stades synchronisés, après un temps de révolution du cycle de mue. Ainsi, après $21,4 \pm 0.5$ jours d'exposition, aucun délai de mue n'a été observé, mais a contrario ce temps a été montré comme cohérent avec les travaux de Richard (1978) qui a étudié le temps de mue en fonction de la température du milieu. De même que pour le temps d'intermue, l'activité NAGase des individus n'a été altérée ni par Cd, ni par Px. A l'inverse, de légers effets ont été observés sur la structure cuticulaire des crevettes exposées au cadmium, principalement sur l'organisation protéique et la teneur en éléments métalliques. L'absence d'effets de Px sur les marqueurs de mue, de même que sur l'ensemble des marqueurs analysés, a été justifiée par l'absence d'accumulation de ce composé dans les tissus de crevettes. Face à ce résultat, il est alors questionnable d'exposer les organismes à ce composé par simple stabulation. Ce constat est amplifié par le contraste de résultats en comparaison des travaux de Husen *et al.* (2015), qui avaient mis en évidence une altération de la NAGase de termites *Reticulitermes flavipes* par ingestion de cellulose imprégnée de Px. Concernant Cd, nos résultats apparaissent contradictoires avec la littérature, où ce contaminant a été montré comme induisant une altération de la NAGase (Luo *et al.* 2015 ; Mesquita *et al.* 2015). Cependant, ces études ont utilisé de plus fortes concentrations et/ou des organismes épédonculés - *i.e.* dénués de système de contrôle de la mue ainsi que d'hormone hyperglycémiant, intervenant dans les mécanismes de défense de l'organisme - favorisant

l'action du contaminant. Ainsi, afin d'observer de tels effets, l'augmentation de la concentration d'exposition ou l'allongement de l'expérimentation, intégrant plusieurs cycles de mue, pourrait être un bon compromis.

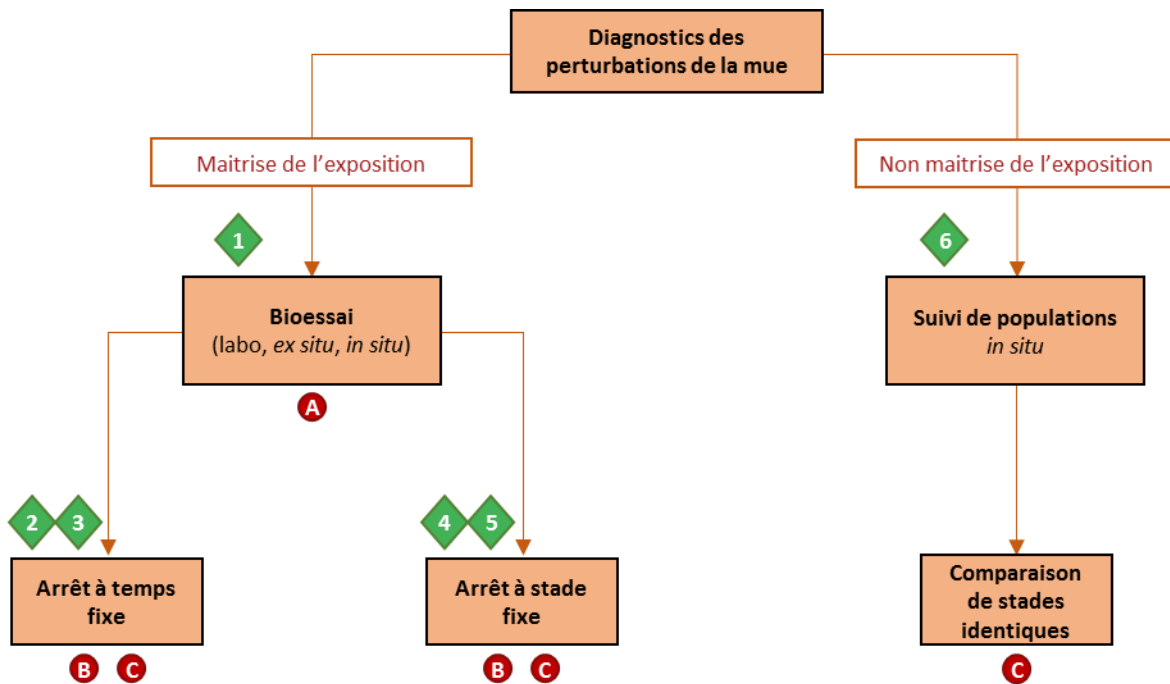
En parallèle, le transfert de la méthodologie d'analyse d'activité de la NAGase chez l'amphipode *Gammarus fossarum* a permis de réaliser une exposition *ex situ* à des eaux usées traitées grâce à un système de charbon actif. L'utilisation du gammarus a également permis d'opter pour une expérimentation à temps fixe, comme couramment réalisée par le laboratoire d'écotoxicologie INRAE de Lyon (Xuereb *et al.* 2009 ; Geffard *et al.* 2010 ; Lacaze *et al.* 2011 ; Coulaud *et al.* 2015). Ainsi, le stade de mue a été initialement synchronisé chez des femelles gammarus mises en exposition durant 16 jours par des systèmes de dérivation d'effluents d'eaux usées, permettant de diluer plus ou moins fortement ces milieux (note 2, section 7.1.). A la fin de l'exposition, des retards de mue ont été observés par rapport au stade estimé *a priori*, notamment au niveau des gammarus exposés aux fortes concentrations d'eaux usées. L'étude de l'activité de la NAGase chez ces gammarus a montré une désynchronisation entre activité tissulaire -i.e. décollement tissulaire et formation de la nouvelle cuticule – et activité enzymatique. Ainsi, si des retards de mue ont été constatés chez certains organismes, l'activité NAGase semblait se comporter comme lors d'un déroulement normal du cycle de mue. Au regard des travaux de Jubeaux *et al.* (2012) qui observaient un arrêt de la gamétogenèse lors de retards de mue survenant à la suite d'exposition de 21 jours de gammarus à du méthyl-farnesoate, il est intéressant de s'interroger sur la nécessité pour l'organisme d'effectuer la mue, au détriment de sa reproduction.

Le déploiement des outils sur des spécimens *P. serratus* collectés en baie de Seine sur plusieurs sites connus pour avoir des niveaux de contamination contrastés a permis de confronter l'activité de la NAGase et l'analyse des propriétés cuticulaires à une éventuelle utilisation dans un contexte de biosurveillance (voir note 1, section 6.2.). Par synchronisation des stades de mue entre C et D1' -i.e. période de stabilité des réponses observées pour les deux marqueurs – des différences de réponses ont été constatées pour chacun des marqueurs. En ce qui concerne l'activité NAGase, les niveaux observés sur le dernier segment comme les uropodes ont été en adéquation avec les indices de contamination connus en baie de Seine, notamment via l'indice génotoxique développé au laboratoire SEBIO (Erraud *et al.* 2019b). Brièvement, les sites épargnés par le panache sédimentaire issu de l'estuaire de Seine, soit au sud de la baie ou au nord de la digue d'Antifer, ont présenté des niveaux élevés d'activité, comparables à ceux retrouvés chez les crevettes « référence » utilisées pour déterminer

l'influence du cycle de mue sur l'activité de l'enzyme. *A contrario*, les sites sous l'influence du panache sédimentaire ont présenté de plus faibles niveaux d'activité de NAGase. De la même manière, l'analyse de la composition de surface des cuticules a montré un contraste intéressant, avec des bandes plus intenses au niveau des longueurs d'ondes symbolisant la chitine et le calcium amorphe pour les crevettes des sites en dehors de la zone d'influence du panache sédimentaire. Cette différence d'intensité des matériaux présents à la surface pourrait également s'observer dans l'organisation générale de la cuticule, se traduisant hypothétiquement par des changements de dureté cuticulaires. Ainsi, les crevettes présentes en régions influencées par le panache sédimentaire pourraient présenter un ramollissement cuticulaire contrasté par rapport au stade de mue présenté, comme observé historiquement au niveau de certains sites de la baie de Seine. En revanche, si l'analyse de la composition et organisation cuticulaire par ATG a montré des différences entre les crevettes des différents sites prospectés, ces différences n'étaient pas cohérentes avec les indices de contamination connus, suscitant l'intérêt de renforcer méthodologiquement ce marqueur en conditions contrôlées afin de mieux appréhender ses variations de réponse.

8.4.2. *Périmètre d'utilisation des marqueurs de mue en écotoxicologie*

L'ensemble de ces résultats permet d'estimer, dans un contexte théorique, le périmètre d'utilisation de chacun des marqueurs de mue développés au cours des travaux de cette thèse, dans le cadre de diagnostics de perturbations du processus de mue chez *P. serratus*. Ce vaste périmètre englobe différents cas de figure pour lesquels des prérequis ainsi que des questionnements sont importants à prendre en compte afin d'utiliser les marqueurs de mue de manière judicieuse (**Figure VIII-2**).



Prérequis :

- 1 Synchronisation des stades de mue de départ
- 2 Durée de cycle de mue connue et régulière
- 3 Possibilité de déterminer le stade de mue en fin d'exposition
- 4 Caractérisation des stades de mue de manière non invasive
- 5 Durée de cycle de mue si possible connue et régulière
- 6 Détermination des stades afin de disposer d'un repère chronologique



Questionnements :

- A A quel stade de mue faut-il commencer l'exposition ?
- B Quelle est la durée d'exposition ?
- C A quel stade de mue/temps faut-il arrêter l'exposition ?

Figure VIII-2 Périmètres et choix d'application des marqueurs de mue en tant qu'outils de diagnostic de perturbations du processus de mue chez les crustacés (crédit : M. Rollin).

Ainsi, de tels marqueurs peuvent être utilisés dans un contexte de bioessais afin d'estimer la qualité de la mue chez un crustacé considéré. Ce cadre particulier offre la possibilité de maîtriser les connaissances sur les organismes (*e.g.* provenance, stade de vie) et les conditions de leur exposition (*e.g.* température, durée d'exposition, milieu de stabulation). Cette maîtrise varie selon le type et la pertinence écologique des bioessais, allant d'un niveau de maîtrise quasi-total lors de manipulations en conditions contrôlées de laboratoire (*e.g.* expositions d'organismes *in vivo*), une maîtrise intermédiaire lors d'essais *ex situ* (*e.g.* canaux de dérivation, mésocosmes), vers l'absence de maîtrise des variables physicochimiques du milieu (au-delà d'une prise en compte au sein de modèles mathématiques) lors de mises en place d'approches actives par encagements *in natura*. Quel que soit le type de bioessai entrepris,

l'application d'un marqueur de mue dans un tel contexte nécessite *a minima* la synchronisation des stades de mue (et donc la capacité à déterminer ces stades sur l'espèce considérée) des individus sélectionnés avant leur exposition. Cette étape est d'autant plus nécessaire en raison de l'importance de ce mécanisme physiologique en tant que facteur confondant (voir section 8.3. de la partie « discussion »). De ce prérequis de manipulation découle le questionnement suivant : à quel stade synchroniser les organismes ? La pertinence de ce questionnement est renforcée par les travaux de Moreno *et al.* (2003) relatant des variations de sensibilité aux contaminants selon l'avancée du cycle de mue. En effet, après avoir exposé des spécimens de Brachyours *C. granulata*, synchronisés selon différents stades de mue originaux, à 0,5 mg.L⁻¹ de cadmium, ces auteurs ont constaté l'apparition de retard de mue uniquement chez les spécimens exposés en amont de l'apparition du pic d'ecdystéroïdes survenant lors de la prémue. Toutefois, la variation de la sensibilité des marqueurs de mue selon l'avancée du cycle reste à ce jour peu documentée. Pour pallier ce manque d'informations, la réalisation d'expositions d'organismes sur au moins une révolution complète d'un cycle de mue s'avère être une potentielle alternative intéressante dans l'estimation des impacts des contaminants sur le processus de mue. Concernant la durée d'exposition, plus particulièrement la mise en place des arrêts, deux modalités différentes peuvent être effectuées lors de bioessais utilisant les crustacés : l'arrêt des organismes selon un temps fixe ou selon un stade de mue particulier. Ces modalités d'arrêt ont été testées au cours de ces travaux de thèse et nécessitent tout deux des conditions distinctes pour être mises en place de manière optimale. Néanmoins, celles-ci apportent des informations complémentaires sur le déroulement du cycle de mue et l'altération potentielle de ses mécanismes sous-jacents.

Ainsi, l'arrêt de l'exposition selon une durée fixe permet de mettre en évidence de manière simple la présence ou non de perturbation de la mue au niveau tissulaire (*i.e.* délais de mue). Utilisée de manière classique dans la littérature, cette technique a également permis de mettre en évidence l'action altérante de contaminants au niveau de marqueurs moléculaires associés à la mue (*e.g.* Scott-Fordsmand & Depledge, 1993 ; Zou & Fingerman, 1999b,c ; Mesquita *et al.* 2015). Toutefois, il convient d'appliquer cette modalité chez les crustacés connus pour réaliser leur cycle de mue selon un temps connu et régulier. En présence d'organismes effectuant leur cycle de mue selon une durée trop variable, les délais naturellement occasionnés apparaîtraient comme un facteur confondant pouvant être interprété à tort comme une perturbation tissulaire de la mue. En conséquence, un grand travail en amont sur la connaissance des temps de mue des espèces utilisées, ainsi que sur la variabilité du cycle

selon les paramètres abiotiques (*e.g.* température, salinité) et biotiques (*e.g.* stade de développement, sexe) est recommandé pour appliquer un arrêt à temps fixe lors de bioessais ayant pour but de diagnostiquer l'impact de contaminants sur le processus de mue. A ce titre, certaines espèces telles que *Gammarus fossarum* sont propices à la mise en place de ce type d'exposition en raison des connaissances établies sur le déroulement de leur cycle de mue (Xuereb *et al.* 2009 ; Geffard *et al.* 2010 ; Coulaud *et al.* 2015). Chez cette espèce, il est alors possible de cibler un temps d'exposition pour lequel un stade de mue majoritaire est attendu. Cette information supplémentaire permet alors d'adapter le temps de manipulation pour exposer et/ou arrêter les organismes à un stade propice selon le marqueur de mue analysé (*e.g.* stade D2 pour l'activité NAGase, stade C pour l'analyse des propriétés structurales : voir section 8.3.). En outre, l'arrêt à temps fixe nécessite également la possibilité de caractériser les stades de mue des organismes à la fin de l'exposition, paramètre nécessaire à l'interprétation ultérieure des marqueurs de mue observés. Pour les crustacés dont la durée du cycle de mue est variable ou insuffisamment décrite, une alternative consiste à stopper l'exposition selon un stade de mue déterminé. Cette modalité est propice à l'étude des mécanismes moléculaires, notamment en ciblant une zone d'intérêt au cours du cycle de mue selon le marqueur considéré. Toutefois, cette méthode nécessite un contrôle régulier de l'avancement du cycle de mue des organismes exposés, pour s'assurer de stopper l'exposition au bon moment, au cas par cas. Ainsi, il est important de déterminer régulièrement le stade de mue des organismes au cours de la manipulation et ce, par des méthodes non invasives afin de ne pas induire de stress autres que l'exposition aux contaminants choisis. Si cette détermination est possible chez la crevette *P. serratus* comme tout autre crustacé dont la détermination des stades de mue pourrait s'effectuer par observations *in toto* (*e.g.* analyse des changements tissulaires par observation par transparence), elle n'est pas réalisable sur l'ensemble des espèces, notamment chez certains spécimens trop petits ou nécessitant l'extraction d'un membre afin de caractériser l'état du cycle de mue. Pour chacun des deux modalités, l'utilisation d'un bioessai dans le diagnostic de la qualité de la mue chez les crustacés permet alors d'estimer le pouvoir altérant d'un contaminant en conditions contrôlées. Les marqueurs moléculaires et tissulaires utilisés au cours de ces manipulations pourraient être complétés par des réponses individuelles en observant le succès d'exuviation d'une partie des individus exposés au cours de leur fin de cycle de mue. De manière générale, l'arrêt d'un bioessai doit être régit selon la pertinence du choix de la durée d'exposition et/ou du stade de mue ciblé auquel il est intéressant d'arrêter les organismes. Ce choix se base en grande partie sur le choix des marqueurs de mue analysés et leur réponse au cours du cycle de mue (voir section 8.3.). Une fois encore, dans un contexte de diagnostic et

avant toute utilisation d'un marqueur en lien avec la mue, il convient de connaître ses niveaux de réponse selon la physiologie propre à l'espèce considérée.

En parallèle du contexte de bioessais, les marqueurs de mue peuvent être employés au cours de suivi de populations réalisés *in natura* par le biais d'approches passives. Cette approche, basée sur la collecte d'individus autochtones présents sur des sites d'intérêt, repose sur aucun niveau de maîtrise de l'exposition. Afin d'appliquer les marqueurs de mue souhaités dans ce contexte, il convient d'harmoniser les individus selon un stade de mue ciblé afin de permettre la comparaison des réponses entre les différentes conditions. Pour cela, il est nécessaire de connaître les critères de détermination des différents stades de mue de l'espèce utilisée. Ainsi, à défaut de pouvoir obtenir des délais de mue, l'analyse des marqueurs moléculaires peut permettre de mettre en évidence des désynchronisations de réponses en comparaison avec le stade de mue choisi pour étudier les organismes. En plus de l'altération des marqueurs de mue disponibles, il est intéressant de se questionner sur l'impact de telles altérations sur le processus de mue en lui-même, et par extension sur les paramètres individuels de croissance, de reproduction et de survie des organismes impactés, dépendant de ce processus physiologique.

IX. Conclusion et perspectives

Le dernier chapitre de cette thèse se propose de dresser un bilan quant au développement et à l'utilisation de l'activité NAGase et des propriétés cuticulaires en tant que marqueurs de mue. Ce bilan permet également de prendre du recul sur l'attente et les voies de perfectionnement de ces outils, la compréhension de leur réponse et l'adaptation de leur utilisation en tant que marqueurs de qualité de mue *in natura*.

L'objectif général de cette thèse était d'étudier des mécanismes survenant au cours du processus de mue de la crevette *Palaemon serratus*, afin de mettre au point des marqueurs candidats permettant de renseigner de la qualité de la mue en tout temps, mais également de détecter d'éventuelles altérations du processus physiologiques, à la fois en conditions contrôlées de laboratoire et sur le terrain. Ces travaux se sont focalisés sur deux mécanismes faisant la jonction entre le système régulateur hormonale de la mue et la réalisation macroscopique de celle-ci : l'activité de l'enzyme chitino lytique N-acétyl- β -D-Glucosaminidase (NAGase), permettant le déroulement de l'exuviation en fin de cycle de mue, et la mesure des propriétés physicochimiques liées à la structure de la cuticule.

Au préalable, une première réflexion s'est portée sur l'intérêt et la pertinence des Palaemonidae, plus particulièrement *P. serratus*, en tant que modèle dans un tel contexte de suivi d'altération de la mue. Ces organismes, répondant à certains critères d'évaluation d'espèces sentinelles, ont été utilisées à de nombreuses reprises dans la mise en place de bioessais en écotoxicologie. Outre les connaissances établies sur leur sensibilité aux contaminants, les crevettes *P. serratus* disposent d'un cycle de mue bien défini et connu. En plus de la subdivision du cycle en stade, certains mécanismes moléculaires tels que l'activité de la NAGase ont été étudiés *a priori*. De plus, la taille modeste des individus, leur densité en baie de Seine et la possibilité de déterminer le stade de mue de manière non invasive ont permis de disposer d'une abondance d'échantillons indispensables à la mise en place de mesures fiables.

D'un point de vue méthodologique, l'optimisation de la réaction induite par la NAGase au niveau de quatre organes (*i.e.* périopodes, dernier segment abdominal, uropodes, telson) différents a permis d'aboutir à l'obtention de protocoles de mesures robustes (*i.e.* coefficient de variation < 20 %) et adaptés à chaque tissu. Parmi ces tissus, le dernier segment abdominal et les uropodes, ayant montré des niveaux d'activité NAGase répétables et similaires à l'épiderme – *i.e.* tissu classiquement utilisé dans la mesure de l'activité de la NAGase - se sont révélés être de bonnes alternatives lors du suivi enzymatique chez la crevette, facilitant également la mesure lors d'études incluant un grand nombre d'individus. Par ailleurs, l'adaptation de la mesure chez l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum* a conduit à l'obtention de protocoles différemment optimisés, suscitant l'importance d'une optimisation de mesure selon l'espèce de crustacé utilisée.

Parallèlement, l'utilisation d'une batterie d'approches physicochimiques a permis de caractériser pour la première fois la composition et l'organisation de la cuticule de *P. serratus*.

Les analyses thermiques réalisées par ATG et DSC ont mis en évidence des événements remarquables associés à la présence d'eau, de protéines, de molécules de chitines et de composés minéraux plus ou moins labiles. Ces analyses, complétées par une étude de la fraction minérale (ICP-MS) et la composition de surface de la cuticule (IRTF), concluaient sur la similarité de structure cuticulaire avec d'autres espèces de crustacés.

Une fois les outils optimisés, le pouvoir discriminant des marqueurs face aux contaminants a été déterminé par la réalisation de bioessais *in vitro*. En ce qui concerne l'activité de la NAGase, neuf composés des 19 initialement testés (*e.g.* métaux lourds, pesticides, agonistes d'ecdystéroïdes) ont entraîné une alternation du signal du marqueur, mettant en évidence le caractère sensible de cette cible moléculaire. En parallèle, l'exposition de la cuticule de *P. serratus* à de l'acide formique a conduit en des changements importants dans la structure du matériau. Parmi les métriques suivies, les réponses en lien avec la teneur et l'organisation des protéines, molécules de chitine et sels inorganiques différaient significativement par rapport aux cuticules « témoin », et semblaient par conséquent pertinentes pour suivre de telles modifications structurales. En revanche, la technique de DSC, bien qu'informatrice, semblait moins appropriée, au regard de la variabilité des réponses, que l'analyse ATG au suivi des propriétés structurales d'un matériau brut tel que la cuticule de *P. serratus*.

Au cours d'une seconde partie, la fluctuation naturelle des réponses des marqueurs a été analysée au cours du cycle de mue et selon le genre des individus. Si aucune différence majeure n'a été aperçue entre les spécimens mâles et femelles, le cycle de mue a montré d'importantes fluctuations des signaux mesurés, différentes selon les espèces, marqueurs et métriques considérés. Durant ces travaux, si l'activité de la NAGase augmentait drastiquement en fin de prémue, la composition et l'organisation cuticulaire subissaient des changements majeurs au cours de la postmue, en lien avec la rigidification et la synthèse de la nouvelle cuticule. Ces variations sont à considérer dans le suivi des marqueurs de mue, notamment par la définition d'une plage de mesure stable et intéressante, propre à chaque marqueur. En considérant l'activité NAGase, le stade D2 semblait propice à l'étude de suivi de marqueur afin de comparer les niveaux d'activité censés être les plus élevés. En ce qui concerne le suivi des propriétés structurales, la plage de stade entre C et D1' permettait d'obtenir une zone de stabilité pour toutes les métriques renseignant de la composition et organisation cuticulaire.

D'un point de vue toxicologique, la réalisation d'une exposition *in vivo* de crevettes durant 30 jours à de fortes concentrations de cadmium et de pentoxifylline, deux contaminants

connus pour leurs effets sur le processus de mue, n'a pas permis de détecter de perturbations majeures dans le déroulement de ce processus. Malgré l'accumulation du cadmium et l'atteinte des réserves énergétiques, l'activité NAGase n'a pas été impactée au cours de cette manipulation. Le changement de teneur en éléments métalliques dans la cuticule et d'organisation des protéines ont été les seuls paramètres structuraux variant au cours de cette manipulation. Parallèlement, l'exposition *ex situ* de spécimens *G. fossarum* à des concentrations d'effluents de STEP n'a pas impactée l'activité NAGase de ces derniers, malgré l'apparition de retards de mue. De manière contrastée, le déploiement des marqueurs de mue sur des crevettes résidant le long du littoral de la baie de Seine a mis en évidence la présence de sites dont la qualité de mue différait. Au niveau de l'activité NAGase et de la composition cuticulaire de surface, les différences observées étaient en adéquation avec les connaissances *a priori* sur le degré de contamination des sites prospectés. En revanche, bien que la composition et l'organisation cuticulaire déterminées par analyse ATG aient également suggéré des différences intersites, celles-ci n'étaient pas cohérentes avec l'historique de contamination, suggérant la présence d'un biais de mesure.

En définitive, même si les essais toxicologiques ne semblaient pas concluants, l'activité NAGase et l'analyse des propriétés structurales de la cuticule de *P. serratus* ont montré, étant donné leur sensibilité à une contamination directe ainsi que leur mesure robuste, un fort potentiel à être utilisés dans le suivi de la qualité de la mue. De plus, ces deux marqueurs sont complémentaires dans la possibilité de les déployer : l'activité NAGase pouvant être utilisée en routine car facilement et rapidement déployable, tandis que les propriétés structurales, plus lentes mais tout aussi informatives, seraient plus à même d'être déployées lors d'études complémentaires ou ponctuelles.

Toutefois, l'utilisation de tels outils en tant que marqueurs de mue nécessiterait au préalable des phases d'optimisations supplémentaires. Entre autres, l'optimisation méthodologique des analyses en DSC sera à parfaire au cours des prochaines expérimentations, notamment sur l'adaptation de la technique à la dégradation thermique du matériau. Cette étape passe par l'utilisation de coupelles résistantes à de fortes pressions induites par la dégradation, mais aussi par l'amélioration des connaissances du matériau (*e.g.* détermination de la transition vitreuse) permettant de mieux appréhender les comportements de celui-ci. Par extension, la caractérisation de la cuticule de *P. serratus* pourrait être approfondie aux moyens d'approches mécaniques et d'observations microscopiques de la structure en couche.

Dans le but de mieux appréhender les réponses obtenues, l'étude de la fluctuation des signaux devra être approfondie notamment à travers l'évaluation de la variabilité imputable à des facteurs intrinsèques aux organismes (*e.g.* âge de l'individu ; état de reproduction), ainsi que les facteurs environnementaux (*e.g.* photopériode ; température ; parasitisme). Ces nouvelles données pourraient être susceptibles de fournir un nouveau regard sur les réponses obtenues, notamment concernant l'ATG dont le déploiement *in situ* a abouti à l'obtention de réponses en contradiction avec l'historique de contamination des sites de prélèvements.

Au regard de la sensibilité des marqueurs, si une vingtaine de contaminants ont été utilisés, majoritairement lors de manipulations *in vitro*, l'augmentation de ce nombre permettra de définir les limites discriminantes des outils développés. Cette bancarisation de données toxicologiques passe également par la pertinence écologique des manipulations entreprises, nécessaire afin d'appréhender la complexité des données terrains. A ce titre, l'utilisation d'une batterie de marqueurs comprenant à la fois des observations individuelles, des mesures du système régulateur hormonal et des marqueurs présents en aval de ces cascades de régulation permettrait d'améliorer la compréhension des mécanismes d'effets de perturbateurs de la mue sur l'ensemble du processus, et d'observer les conséquences macroscopiques d'une perturbation d'un marqueur de mue moléculaire. De plus, l'extension des manipulations sur plusieurs cycles de mue permettrait d'observer les conséquences d'une exposition à long terme, tant en termes d'altérations de mue que de conséquences de ces altérations sur la fitness des individus (*i.e.* croissance, reproduction). De même que pour les données toxicologiques, la bancarisation des données obtenues sur le terrain devrait être maintenue, afin d'améliorer la vision de l'état de santé des crustacés présents en baie de Seine. Ainsi, l'accroissement spatiale et temporelle de points de mesure en baie de Seine contribuerait à confronter les protocoles de mesure développés à des contextes environnementaux et chimiques différents. Par ailleurs, le suivi d'autres populations présentes sur la façade Atlantique et en Méditerranée offrirait la possibilité de définir des valeurs de référence à large échelle concernant la qualité de la mue. En parallèle, la définition d'une population référence pourrait contribuer à la mise en place d'encagements sur des sites contrastés afin de déterminer l'état de santé d'individus confrontés à un degré de contamination réaliste et contrasté. L'approche de biomonitoring active (*e.g.* encagements de populations « référence », échange de populations encagées issues de sites contrastés) couplé à des essais en laboratoire, apporterait également un regard intéressant sur la différence de sensibilité et l'adaptation des individus et de leur processus de mue, en présence de contaminants ou non.

Enfin, les manipulations au cours de cette thèse ont montré le potentiel de transférabilité des méthodes de mesure de marqueurs de mue au niveau d'autres espèces d'intérêt tels que les crustacés dulçaquicoles. Se faisant, il serait alors possible d'imaginer la réalisation de différents points de mesure le long du continuum terre-mer afin de disposer de plus d'informations concernant la qualité des eaux au regard de la qualité de la mue des différents organismes, compte tenu de leur sensibilité aux différents contaminants. Cette approche se ferait via le développement de marqueurs de mue, réalisé à la fois pour des espèces marines et d'eau douce, selon une méthodologie de mesure consensuelle. Une telle étape permettrait alors d'estimer les différents niveaux de sensibilité des espèces par rapport aux contaminants d'intérêt. Sur le terrain, une bonne façon d'appréhender cette problématique serait de travailler sur des organismes encagés, de manière à maîtriser et harmoniser les expositions. Cet encagement d'espèce en tandem est déjà réalisé afin de mesurer d'autres marqueurs tels que l'indice de génotoxicité et d'immunotoxicité, et pourrait être une bonne occasion de déployer les marqueurs de mue développés. À terme, ces marqueurs de mue pourraient également être associés aux batteries de biomarqueurs permettant de réaliser le diagnostic de l'état de santé des écosystèmes dans un contexte de biosurveillance environnementale.

Références bibliographiques

- Aberle, B., Jemmali, R., Dirks, J.-H., 2017.** Effect of sample treatment on biomechanical properties of insect cuticle. *Arthropod structure & development* 46, 138–146.
- Abidi, S., Abbaci, K.T., Geffard, O., Boumaiza, M., Dumet, A., Garric, J., Mondy, N., 2016.** Impact of cadmium on the ecdysteroids production in *Gammarus fossarum*. *Ecotoxicology* 25, 880–887.
- Acosta, N., Jiménez, C., Borau, V., Heras, A., 1993.** Extraction and characterization of chitin from crustaceans. *Biomass and Bioenergy* 5, 145–153.
- Adeyeye, E.I., Adubiaro, H.O., 2004.** Chemical composition of shell and flesh of three prawn samples from Lagos lagoon. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84, 411–414.
- Adeyeye, E.I., Adubiaro, H.O., Awodola, O.J., 2008.** Comparability of chemical composition and functional properties of shell and flesh of *Penaeus notabilis*.
- AFNOR. Norme XP T90-722 (2020).** Qualité de l'eau - mesures moléculaires, physiologiques et comportementales chez le gamm, n.d.
- Aguirre, H., Hendrickx, M.E., 2005.** Abnormal rostrum and telson in two species of penaeid shrimp (Decapoda, Dendrobranchiata, Penaeidae) from the Pacific coast of Mexico. *Crustaceana* 113–119.
- Ahearn, G.A., Mandal, P.K., Mandal, A., 2004.** Calcium regulation in crustaceans during the molt cycle: a review and update. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 137, 247–257.
- Ahsanullah, M., Negilski, D.S., Mobley, M.C., 1981.** Toxicity of zinc, cadmium and copper to the shrimp *Callinassa australiensis*. I. Effects of individual metals. *Marine biology* 64, 299–304.
- Ahyong, S.T., Lowry, J.K., Alonso, M., Bamber, R.N., Boxshall, G.A., Castro, P., Gerken, S., Karaman, G.S., Goy, J.W., Jones, D.S., 2011.** Subphylum Crustacea Brünnich, 1772. In: Zhang, Z.-Q.(Ed.) *Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*. *Zootaxa* 3148, 165–191.
- Aiken, D.E., 1980.** Molting and growth. *The biology and management of lobsters* 1, 91–163.
- Aiken, D.E., 1973.** Proecdysis, setal development, and molt prediction in the American lobster (*Homarus americanus*). *Journal of the Fisheries Board of Canada* 30, 1337–1344.

Aiken, D.E., 1969. Ovarian maturation and egg laying in the crayfish *Orconectes virilis*: influence of temperature and photoperiod. Canadian Journal of Zoology 47, 931–935.

Aizenberg, J., Lambert, G., Weiner, S., Addadi, L., 2002. Factors involved in the formation of amorphous and crystalline calcium carbonate: a study of an ascidian skeleton. Journal of the American Chemical Society 124, 32–39.

Al Sagheer, F.A., Al-Sughayer, M.A., Muslim, S., Elsabee, M.Z., 2009. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. Carbohydrate polymers 77, 410–419.

Allan, I.J., Vrana, B., Greenwood, R., Mills, G.A., Roig, B., Gonzalez, C., 2006. A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union’s Water Framework Directive. Talanta 69, 302–322.

Al-Sawalmih, A., Li, C., Siegel, S., Fratzl, P., Paris, O., 2009. On the stability of amorphous minerals in lobster cuticle. Advanced materials 21, 4011–4015.

Amiard J.C., Amiard-Triquet C., 2008. Les biomarqueurs dans l’évaluation de l’état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier.

Anderson, G.S., 1985. Species profiles: Life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Gulf of Mexico): Grass shrimp. The Service.

Anderson, S.C., Mills Flemming, J., Watson, R., Lotze, H.K., 2011. Rapid global expansion of invertebrate fisheries: trends, drivers, and ecosystem effects. PLOS one 6, e14735.

Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., Heras, Á., 2009. Functional characterization of chitin and chitosan. Current chemical biology 3, 203–230.

Araneda, M., Pérez, E.P., Gasca-Leyva, E., 2008. White shrimp *Penaeus vannamei* culture in freshwater at three densities: condition state based on length and weight. Aquaculture 283, 13–18.

Araújo, C.V., Pereira, K.C., Blasco, J., 2018. Avoidance response by shrimps to a copper gradient: Does high population density prevent avoidance of contamination? Environmental toxicology and chemistry 37, 3095–3101.

Araújo, C.V., Gómez, L., Silva, D.C., Pintado-Herrera, M.G., Lara-Martín, P.A., Hampel, M., Blasco, J., 2019. Risk of triclosan based on avoidance by the shrimp *Palaemon varians* in a heterogeneous contamination scenario: How sensitive is this approach? *Chemosphere* 235, 126–135.

Araújo, C.V., Rodríguez-Romero, A., Fernández, M., Sparaventi, E., Medina, M.M., Tovar-Sánchez, A., 2020. Repellency and mortality effects of sunscreens on the shrimp *Palaemon varians*: Toxicity dependent on exposure method. *Chemosphere* 257, 127190.

Arlot-Bonnemains, Y., Van-Wormhoudt, A., Favrel, P., Fouchereau-Peron, M., Milhaud, G., Moukhtar, M.S., 1986. Calcitonin-like peptide in the shrimp *Palaemon serratus* (Crustacea, Decapoda) during the intermolt cycle. *Experientia* 42, 419–420.

Arnold, K.E., Wells, C., Spicer, J.I., 2009. Effect of an insect juvenile hormone analogue, Fenoxycarb® on development and oxygen uptake by larval lobsters *Homarus gammarus* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149, 393–396.

Ashelby, C.W., Page, T.J., De Grave, S., Hughes, J.M., Johnson, M.L., 2012. Regional scale speciation reveals multiple invasions of freshwater in Palaemoninae (Decapoda). *Zoologica Scripta* 41, 293–306.

Atkinson, A., Siegel, V., Pakhomov, E.A., Jessopp, M.J., Loeb, V., 2009. A re-appraisal of the total biomass and annual production of Antarctic krill. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 56, 727–740.

Aurousseau, J.-M., 1984. Eléments d'écologie de la crevette blanche, *Palaemon longirostris* (H. Milne Edwards, 1837), dans l'estuaire de la Gironde: dynamique de la population et production.

Avila, T.R., de Souza Machado, A.A., Bianchini, A., 2012. Estimation of zooplankton secondary production in estuarine waters: comparison between the enzymatic (chitobiase) method and mathematical models using crustaceans. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 416, 144–152.

Bachra, B.N., Trautz, O.R., Simon, S.L., 1963. Precipitation of calcium carbonates and phosphates. I. Spontaneous precipitation of calcium carbonates and phosphates under physiological conditions. *Archives of biochemistry and biophysics* 103, 124–138.

- Baden, S., Hagerman, L., 1981.** Ventilatory responses of the shrimp *Palaemon adspersus* to sublethal concentrations of crude oil extract. *Marine Biology* 63, 129–133.
- Baden, S.P., 1982.** Impaired osmoregulation in the shrimp *Palaemon adspersus* exposed to crude oil extract. *Marine Pollution Bulletin* 13, 208–210.
- Baer, K.N., Owens, K.D., 1999.** Evaluation of selected endocrine disrupting compounds on sex determination in *Daphnia magna* using reduced photoperiod and different feeding rates. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 62, 214–221.
- Baldaia, L., Porcheron, P., Coimbra, J., Cassier, P., 1984.** Ecdysteroids in the shrimp *Palaemon serratus*: relations with molt cycle. *General and comparative endocrinology* 55, 437–443.
- Baldwin, W.S., Milam, D.L., Leblanc, G.A., 1995.** Physiological and biochemical perturbations in *Daphnia magna* following exposure to the model environmental estrogen diethylstilbestrol. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 14, 945–952.
- Baldwin, W.S., Bailey, R., Long, K.E., Klaine, S., 2001.** Incomplete ecdysis is an indicator of ecdysteroid exposure in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 20, 1564–1569.
- Barbieri, E., 2007.** Use of oxygen consumption and ammonium excretion to evaluate the sublethal toxicity of cadmium and zinc on *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936, Crustacea). *Water environment research* 79, 641–646.
- Barbieri, E., 2009.** Effects of zinc and cadmium on oxygen consumption and ammonium excretion in pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*, Pérez-Farfante, 1967, Crustacea). *Ecotoxicology* 18, 312–318.
- Barbieri, E., Moreira, P., Luchini, L.A., Ruiz Hidalgo, K., Munoz, A., 2016.** Assessment of acute toxicity of carbofuran in *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) at different temperature levels. *Toxicology and Industrial Health* 32, 7–14.
- Bauer, R.T., 2004.** Remarkable shrimps: adaptations and natural history of the carideans. University of Oklahoma Press.
- Baxter, S.-M.E., DeLorenzo, M.E., Key, P.B., Chung, K.W., Pisarski, E., Beckingham, B., Fulton, M.H., 2018.** Toxicity comparison of the shoreline cleaners Accell Clean® and PES-

51® in two life stages of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. Environmental Science and Pollution Research 25, 10926–10936.

Becker, A., Ziegler, A., Epple, M., 2005. The mineral phase in the cuticles of two species of Crustacea consists of magnesium calcite, amorphous calcium carbonate, and amorphous calcium phosphate. Dalton Transactions 1814–1820.

Beeby, A., 2001. What do sentinels stand for? Environmental pollution 112, 285–298.

Béguer, M., Pasquaud, S., Noël, P., Girardin, M., Boët, P., 2008. First description of heavy skeletal deformations in *Palaemon* shrimp populations of European estuaries: the case of the Gironde (France). Hydrobiologia 607, 225–229.

Béguer, M., Feuillassier, L., Elie, P., Boët, P., Girardin, M., 2010. Exoskeletal deformities in Palaemonidae: are they a threat to survival? Marine Environmental Research 69, 109–117.

Beltrame, M.O., De Marco, S.G., Marcovecchio, J.E., 2010. Effects of zinc on molting and body weight of the estuarine crab *Neohelice granulata* (Brachyura: Varunidae). Science of the total environment 408, 531–536.

Benradia, H., Berghiche, H., Soltani, N., 2016. Measure of environmental stress biomarkers in the shrimp *Palaemon adspersus* from the Mellah lagoon (Algeria): spatial and temporal variations. Fresenius Environ. Bull 25, 2563–2566.

Bentov, S., Abehsera, S., Sagi, A., 2016. The mineralized exoskeletons of crustaceans. Extracellular composite matrices in Arthropods 137–163.

Berthet, B., 2012. Sentinel species. Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects 155.

Berthet, B., 2015. Reference Species, in: Aquatic Ecotoxicology. Elsevier, pp. 205–227.

Bertrand, L., Monferrán, M.V., Métais, I., Mouneyrac, C., Amé, M.V., 2015. MTs in *Palaemonetes argentinus* as potential biomarkers of zinc contamination in freshwaters. Ecological indicators 48, 533–541.

Besse, J.-P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O., 2013. Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: towards the determination of threshold values. Water research 47, 650–660.

Betancourt-Lozano, M., Baird, D.J., Sangha, R.S., González-Farias, F., 2006. Induction of morphological deformities and moulting alterations in *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles exposed to the triazole-derivative fungicide tilt. *Archives of environmental contamination and toxicology* 51, 69–78.

Bilgin, S., Ozen, O., Ates, A.S., 2008. Spatial and temporal variation of *Palaemon adspersus*, *Palaemon elegans*, and *Crangon crangon* (Decapoda: Caridea) in the southern Black Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 79, 671–678.

Bizot-Espiard, A., 1980. Croissance et reproduction de la crevette *Penaeus japonicus* (Bate) en élevage : effets de l'épédonculation-histologie de l'appareil génital mâle. Université de Bretagne Occidentale.

Blanchet, M.F., Porcheron, P., Dray, F., 1979. Variations du taux des ecdystéroïdes au cours des cycles de mue et de vitellogenèse chez le Crustacé Amphipode, *Orchestia gammarellus*. *International Journal of Invertebrate Reproduction* 1, 133–139.

Blanchet-Tournier, M.-F., 1980. Mue et vitellogenèse chez le crustacé amphipode *Orchestia gammarellus* (pallas) : contrôles endocrines et interactions.

Bocquené, G., Galgani, F., 1991. Acetylcholinesterase activity in the common prawn (*Palaemon serratus*) contaminated by carbaryl and phosalone: Choice of a method for detection of effects. *Ecotoxicology and environmental safety* 22, 337–344.

Bolton-Warberg, M., Coen, L.D., Weinstein, J.E., 2007. Acute toxicity and acetylcholinesterase inhibition in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) and oysters (*Crassostrea virginica*) exposed to the organophosphate dichlorvos: laboratory and field studies. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52, 207–216.

Boßelmann, F., Romano, P., Fabritius, H., Raabe, D., Epple, M., 2007. The composition of the exoskeleton of two crustacea: The American lobster *Homarus americanus* and the edible crab *Cancer pagurus*. *Thermochimica Acta* 463, 65–68.

Boudet, L.C., Mendieta, J., Romero, M.B., Carricavur, A.D., Polizzi, P., Marcovecchio, J.E., Gerpe, M., 2019. Strategies for cadmium detoxification in the white shrimp *Palaemon argentinus* from clean and polluted field locations. *Chemosphere* 236, 124224.

Boudreau, S.A., Worm, B., 2012. Ecological role of large benthic decapods in marine ecosystems: a review. *Marine Ecology Progress Series* 469, 195–213.

Bouligand, Y., 1972. Twisted fibrous arrangements in biological materials and cholesteric mesophases. *Tissue and Cell* 4, 189–217.

Bownik, A., 2017. *Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: a review. *Science of the total environment* 601, 194–205.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248–254.

Brannon, A.C., Rao, K.R., 1979. Barium, strontium and calcium levels in the exoskeleton, hepatopancreas and abdominal muscle of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*: Relation to molting and exposure to barite. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 63, 261–274.

Bresciani, J., Jespersen, Å., 1985. The ultrastructure of the integument of *Ulophysema oeresundense* Brattstrom, 1936 (Crustacea, Ascothoracica). *Journal of crustacean biology* 5, 146–159.

Brouwer, M., Brown-Peterson, N.J., Larkin, P., Patel, V., Denslow, N., Manning, S., Brouwer, T.H., 2007. Molecular and whole animal responses of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, exposed to chronic hypoxia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 341, 16–31.

Brown, M.D., Thomas, D., Watson, K., Greenwood, J.G., Kay, B.H., 1996. Acute toxicity of selected pesticides to the estuarine shrimp *Leander tenuicornis* (Decapoda: Palaemonidae). *Journal of the American Mosquito Control Association* 12, 721–724.

Brown, M.D., Thomas, D., Mason, P., Greenwood, J.G., Kay, B.H., 1999. Laboratory and field evaluation of the efficacy of four insecticides for *Aedes vigilax* (Diptera: Culicidae) and toxicity to the nontarget shrimp *Leander tenuicornis* (Decapoda: Palaemonidae). *Journal of economic entomology* 92, 1045–1051.

Brown-Peterson, N.J., Manning, C.S., Patel, V., Denslow, N.D., Brouwer, M., 2008. Effects of cyclic hypoxia on gene expression and reproduction in a grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *The Biological Bulletin* 214, 6–16.

- Buchholz, F., 1989.** Moults cycle and seasonal activities of chitinolytic enzymes in the integument and digestive tract of the Antarctic krill, *Euphausia superba*. Polar Biology 9, 311–317.
- Buchholz, C., Buchholz, F., 1989.** Ultrastructure of the integument of a pelagic Crustacean: moults cycle related studies on the Antarctic krill, *Euphausia superba*. Marine Biology 101, 355–365.
- Buchholz, F., Vetter, R.A.H., 1993.** Enzyme kinetics in cold water: characteristics of N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in the Antarctic krill, *Euphausia superba*, compared with other crustacean species. Journal of Comparative Physiology B 163, 28–37.
- Byun, S.M., No, H.K., Hong, J.-H., Lee, S.I., Prinyawiwatkul, W., 2013.** Comparison of physicochemical, binding, antioxidant and antibacterial properties of chitosans prepared from ground and entire crab leg shells. International journal of food science & technology 48, 136–142.
- Cairns, A., Yan, N., 2009.** A review of the influence of low ambient calcium concentrations on freshwater daphniids, gammarids, and crayfish. Environmental Reviews 17, 67–79.
- Calhoun, S., Zou, E., 2016.** Epidermal carbonic anhydrase activity and exoskeletal metal content during the molting cycle of the blue crab, *Callinectes sapidus*. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology 325, 200–208.
- Campillo, A., 1975.** Contribution à l'étude de l'élevage de la crevette rose *Palaemon serratus* (Pennant) en captivité. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes 39, 381–393.
- Campillo, A., 1979.** Contribution à l'étude de la crevette rose *Palaemon serratus* (Pennant): Exploitation, Biologie, Elevage, Epidémiologie. Université des sciences et techniques du Languedoc.
- Cannaby, H., Hüsrevoğlu, Y.S., 2009.** The influence of low-frequency variability and long-term trends in North Atlantic sea surface temperature on Irish waters. ICES Journal of Marine Science 66, 1480–1489.
- Cantelmo, A.G., Lazell, R.J., Mantel, L.M., 1981.** effects of benzene on molting and limb regeneration in juvenile *Callinectes sapidus* rathbun. Marine biology letters.
- Cantelmo, A., Mantel, L., Lazell, R., Hospod, F., Flynn, E., Goldberg, S., Katz, M., 1982.** The effects of benzene and dimethylnaphthalene on physiological processes in juveniles of the

blue crab, *Callinectes sapidus*, in: Physiological Mechanisms of Marine Pollutant Toxicity. Elsevier, pp. 349–389.

Chan, S.-M., Rankin, S.M., Keeley, L.L., 1988. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose. The Biological Bulletin 175, 185–192.

Chandran, R., Williams, L., Hung, A., Nowlin, K., LaJeunesse, D., 2016. SEM characterization of anatomical variation in chitin organization in insect and arthropod cuticles. Micron 82, 74–85.

Chang, E.S., Bruce, M.J., Tamone, S.L., 1993. Regulation of crustacean molting: a multi-hormonal system. American Zoologist 33, 324–329.

Chang, E.S., 1995. Physiological and biochemical changes during the molt cycle in decapod crustaceans: an overview. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 193, 1–14.

Chang, E.S., Mykles, D.L., 2011. Regulation of crustacean molting: a review and our perspectives. General and comparative endocrinology 172, 323–330.

Chapman, P.M., 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. Marine pollution bulletin 44, 7–15.

Charmantier, G., Soyeux, C., 1994. Effect of molt stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 178, 233–246.

Charniaux-Cotton, H., 1957. Croissance, régénération et déterminisme endocrinien des caractères sexuels d'*Orchestia gammarella* Pallas (Crustacé Amphipode). Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim. 19, 411–559.

Chaumot, A., Geffard, O., Armengaud, J., Maltby, L., 2015. Gammarids as reference species for freshwater monitoring, in: Aquatic Ecotoxicology. Elsevier, pp. 253–280.

Chaumot, A., Coulaud, R., Adam, O., Quéau, H., Lopes, C., Geffard, O., 2020. *In situ* reproductive bioassay with caged *Gammarus fossarum* (Crustacea): Part 1—Gauging the confounding influence of temperature and water hardness. Environmental toxicology and chemistry 39, 667–677.

- Chen, W.-L., Sung, H.-H., 2005.** The toxic effect of phthalate esters on immune responses of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) via oral treatment. *Aquatic toxicology* 74, 160–171.
- Chen, P.-Y., Lin, A.Y.-M., McKittrick, J., Meyers, M.A., 2008.** Structure and mechanical properties of crab exoskeletons. *Acta biomaterialia* 4, 587–596.
- Chen, H., Gu, X., Zeng, Q., Mao, Z., 2019a.** Acute and chronic toxicity of carbamazepine on the release of chitinase, molting, and reproduction in *Daphnia similis*. *International journal of environmental research and public health* 16, 209.
- Chen, H., Gu, X., Zeng, Q., Mao, Z., Liang, X., Martyniuk, C.J., 2019b.** Carbamazepine disrupts molting hormone signaling and inhibits molting and growth of *Eriocheir sinensis* at environmentally relevant concentrations. *Aquatic Toxicology* 208, 138–145.
- Chung, J.S., Webster, S.G., 2005.** Dynamics of in vivo release of molt-inhibiting hormone and crustacean hyperglycemic hormone in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Endocrinology* 146, 5545–5551.
- Chung, J.S., 2010.** Hemolymph ecdysteroids during the last three molt cycles of the blue crab, *Callinectes sapidus*: quantitative and qualitative analyses and regulation. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America* 73, 1–13.
- Cicik, B., Engin, K., 2005.** The effects of cadmium on levels of glucose in serum and glycogen reserves in the liver and muscle tissues of *Cyprinus carpio* (L., 1758). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 29, 113–117.
- Clare, A.S., Rittschof, D., Costlow Jr, J.D., 1992.** Effects of the nonsteroidal ecdysone mimic RH 5849 on larval crustaceans. *Journal of Experimental Zoology* 262, 436–440.
- Clark, J.R., Patrick, J.M., Moore, J.C., Lores, E.M., 1987.** Waterborne and sediment-source toxicities of six organic chemicals to grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) and amphioxus (*Branchiostoma caribaeum*). *Archives of environmental contamination and toxicology* 16, 401–407.
- Clark, J.S., 2003.** Uncertainty and variability in demography and population growth: a hierarchical approach. *Ecology* 84, 1370–1381.

- Cochran, R.E., Burnett, L.E., 1996.** Respiratory responses of the salt marsh animals, *Fundulus heteroclitus*, *Leiostomus xanthurus*, and *Palaemonetes pugio* to environmental hypoxia and hypercapnia and to the organophosphate pesticide, azinphosmethyl. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 195, 125–144.
- Cohen, E., 2010.** Chitin biochemistry: synthesis, hydrolysis and inhibition. *Advances in insect physiology* 38, 5–74.
- Cole, H.A., 1958.** Notes on the biology of the common prawn *Palaemon serratus* (Pennant). *Fish. Invest.* 1–22.
- Coler, R.A., Watanabe, T., Xavier, B.F., Paz, R.J., 1999.** A preliminary report on the application of *Macrobrachium amazonicum* Heller, 1862 (Decapoda: Palaemonidae) as a biomarker. *Hydrobiologia* 412, 119–121.
- Collins, P., Cappello, S., 2006.** Cypermethrin toxicity to aquatic life: bioassays for the freshwater prawn *Palaemonetes argentinus*. *Archives of environmental contamination and toxicology* 51, 79–85.
- Compère, P., Jaspard-Versali, M.-F., Goffinet, G., 2002.** Glycoproteins from the cuticle of the Atlantic shore crab *Carcinus maenas*: I. Electrophoresis and Western-blot analysis by use of lectins. *The Biological Bulletin* 202, 61–73.
- Conley, J.M., Schorr, M.S., Hanson, M.L., Symes, S.J., Richards, S.M., 2009.** Is ambient chitinase activity a monitoring tool for impacts on secondary production in lotic systems? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 66, 1274–1281.
- Costanza, R., d'Arge, R., De Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'Neill, R.V., Paruelo, J., 1997.** The value of the world's ecosystem services and natural capital. *nature* 387, 253–260.
- Costanza, R., De Groot, R., Sutton, P., Van der Ploeg, S., Anderson, S.J., Kubiszewski, I., Farber, S., Turner, R.K., 2014.** Changes in the global value of ecosystem services. *Global environmental change* 26, 152–158.
- Coulaud, R., Geffard, O., Xuereb, B., Lacaze, E., Quéau, H., Garric, J., Charles, S., Chaumot, A., 2011.** In situ feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *water research* 45, 6417–6429.

Coulaud, R., Geffard, O., Vigneron, A., Quéau, H., François, A., Chaumot, A., 2015. Linking feeding inhibition with reproductive impairment in *Gammarus* confirms the ecological relevance of feeding assays in environmental monitoring. *Environmental toxicology and chemistry* 34, 1031–1038.

Cresswell, T., Simpson, S.L., Mazumder, D., Callaghan, P.D., Nguyen, A., 2013. Where do the metals go? Investigating uptake, retention and spatial distribution of cadmium and zinc using radiotracers within a freshwater decapod crustacean.

Cuesta, J.A., Drake, P., Martinez-Rodriguez, G., Rodriguez, A., Schubart, C.D., 2012. Molecular phylogeny of the genera *Palaemon* and *Palaemonetes* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae) from a European perspective. *Crustaceana* 877–888.

Dabrunz, A., Duester, L., Prasse, C., Seitz, F., Rosenfeldt, R., Schilde, C., Schaumann, G.E., Schulz, R., 2011. Biological surface coating and molting inhibition as mechanisms of TiO₂ nanoparticle toxicity in *Daphnia magna*. *PloS one* 6, e20112.

Dai, X., Xiong, Z., Xie, J., Ding, F., 2014. Acute toxicity of organochlorine insecticide endosulfan to the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 32, 111–119.

Dalley, R., 1980. Effects of non-circadian light/dark cycles on the growth and moulting of *Palaemon elegans* reared in the laboratory. *Marine Biology* 56, 71–78.

Damásio, J., Tauler, R., Teixidó, E., Rieradevall, M., Prat, N., Riva, M.C., Soares, A.M., Barata, C., 2008. Combined use of *Daphnia magna in situ* bioassays, biomarkers and biological indices to diagnose and identify environmental pressures on invertebrate communities in two Mediterranean urbanized and industrialized rivers (NE Spain). *Aquatic Toxicology* 87, 310–320.

Dang, T.T., Jessen, F., Martens, H.J., Gringer, N., Olsen, K., Bøknæs, N., Orlie, V., 2019. Proteomic and microscopic approaches in understanding mechanisms of shell-loosening of shrimp (*Pandalus borealis*) induced by high pressure and protease. *Food chemistry* 289, 729–738.

Darnell, M.Z., Rittschof, C.C., Rittschof, J., Beach, C., Rittschof, D., 2018. Autotomy of the major claw stimulates molting and suppresses feeding in fiddler crabs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 509, 66–70.

- Das, S., Tseng, L.-C., Chou, C., Wang, L., Souissi, S., Hwang, J.-S., 2019.** Effects of cadmium exposure on antioxidant enzymes and histological changes in the mud shrimp *Austinopecten edulis* (Crustacea: Decapoda). *Environmental Science and Pollution Research* 26, 7752–7762.
- Davies, R., Zou, E., 2012.** Polybrominated diphenyl ethers disrupt molting in neonatal *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 21, 1371–1380.
- De Grave, S., Cai, Y., Anker, A., 2007.** Global diversity of shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea) in freshwater, in: *Freshwater Animal Diversity Assessment*. Springer, pp. 287–293.
- De Grave, S., Mentlak, T., 2008.** A record of an unusual rostrum in *Palaemon longirostris* H. Milne Edwards (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 81, 1403–1406.
- De Grave, S., Fransen, C., 2011.** *Carideorum catalogus*: the recent species of the dendrobranchiate, stenopodidean, procarididean and caridean shrimps (Crustacea: Decapoda). NCB Naturalis Leiden.
- de Melo, C.B., Côa, F., Alves, O.L., Martinez, D.S.T., Barbieri, E., 2019a.** Co-exposure of graphene oxide with trace elements: Effects on acute ecotoxicity and routine metabolism in *Palaemon pandaliformis* (shrimp). *Chemosphere* 223, 157–164.
- de Melo, M.S., Nazari, E.M., Joaquim-Justo, C., Muller, Y.M.R., Gismondi, E., 2019b.** Effects of low glyphosate-based herbicide concentrations on endocrine-related gene expression in the decapoda *Macrobrachium potiana*. *Environmental Science and Pollution Research* 26, 21535–21545.
- de Melo, M.S., Nazari, E.M., Müller, Y.M.R., Gismondi, E., 2020.** Roundup® disrupts chitinolytic enzyme activity and ecdysteroid concentration in *Macrobrachium potiana*. *Environmental Science and Pollution Research* 27, 43396–43402.
- DeLorenzo, M.E., De Leon, R.G., 2010.** Toxicity of the insecticide etofenprox to three life stages of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Archives of environmental contamination and toxicology* 58, 985–990.
- DeLorenzo, M.E., Key, P.B., Chung, K.W., Sapozhnikova, Y., Fulton, M.H., 2014.** Comparative toxicity of pyrethroid insecticides to two estuarine crustacean species, *Americamysis bahia* and *Palaemonetes pugio*. *Environmental toxicology* 29, 1099–1106.

- Dendinger, J.E., Alterman, A., 1983.** Mechanical properties in relation to chemical constituents of postmolt cuticle of the blue crab, *Callinectes sapidus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 75, 421–424.
- Dillaman, R., Hequembourg, S., Gay, M., 2005.** Early pattern of calcification in the dorsal carapace of the blue crab, *Callinectes sapidus*. Journal of Morphology 263, 356–374.
- Dillaman, R., Roer, R., Shafer, T., Modla, S., Watling, L., Thiel, M., 2013.** The crustacean integument: structure and function. The Natural History of Crustacea 1, 140–65.
- Dinan, L., Bourne, P., Whiting, P., Dhadialla, T.S., Hutchinson, T.H., 2001.** Screening of environmental contaminants for ecdysteroid agonist and antagonist activity using the *Drosophila melanogaster* BII cell *in vitro* assay. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal 20, 2038–2046.
- Dodd, J.R., 1967.** Magnesium and strontium in calcareous skeletons: a review. Journal of Paleontology 1313–1329.
- Dolnik, V.R., Gavrilov, V.M., 1980.** Photoperiodic control of the molt cycle in the Chaffinch (*Fringilla coelebs*). The Auk 97, 50–62.
- Drach, P., 1939.** Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes. Ann. Inst. Oceanogr. Monaco 19, 103–391.
- Drach, P., 1944.** Etude préliminaire sur le cycle d'intermue et son conditionnement hormonal chez *Leander serratus* (Pennant). Bulletins of Biology France et Belgian 78, 40–62.
- Drach, P., Tchernigovtzeff, C., 1967.** Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. Vie milieu 18, 595–610.
- Dutra, F.M., Forneck, S.C., Brazão, C.C., Freire, C.A., Ballester, E.L.C., 2016.** Acute toxicity of ammonia to various life stages of the Amazon River prawn, *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862. Aquaculture 453, 104–109.
- Ehiguese, F.O., Fernandez, M. del C.C., Lara-Martín, P.A., Martín-Díaz, M.L., Araújo, C.V., 2019.** Avoidance behaviour of the shrimp *Palaemon varians* regarding a contaminant gradient of galaxolide and tonalide in seawater. Chemosphere 232, 113–120.
- Eisler, R., Zaroogian, G.E., Hennekey, R.J., 1972.** Cadmium uptake by marine organisms. Journal of the Fisheries Board of Canada 29, 1367–1369.

Emblidge, J.P., DeLorenzo, M.E., 2006. Preliminary risk assessment of the lipid-regulating pharmaceutical clofibrilic acid, for three estuarine species. *Environmental Research* 100, 216–226.

Epifanio, C.E., 1971. Effects of dieldrin in seawater on the development of two species of crab larvae, *Leptodius floridanus* and *Panopeus herbstii*. *Marine Biology* 11, 356–362.

Erraud, A., Bonnard, M., Chaumot, A., Geffard, O., Duflot, A., Forget-Leray, J., Le Foll, F., Geffard, A., Xuereb, B., 2018a. Use of sperm DNA integrity as a marker for exposure to contamination in *Palaemon serratus* (Pennant 1777): Intrinsic variability, baseline level and in situ deployment. *Water research* 132, 124–134.

Erraud, A., Bonnard, M., Duflot, A., Geffard, A., Danger, J.-M., Forget-Leray, J., Xuereb, B., 2018b. Assessment of sperm quality in palaemonid prawns using Comet assay: methodological optimization. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 11226–11237.

Erraud, A., Bonnard, M., Geffard, O., Chaumot, A., Duflot, A., Geffard, A., Forget-Leray, J., Xuereb, B., 2019a. Assessment of sperm DNA integrity within the *Palaemon longirostris* (H.) population of the Seine estuary. *Environmental Pollution* 245, 485–493.

Erraud, A., Bonnard, M., Geffard, O., Coulaud, R., Poret, A., Duflot, A., Forget-Leray, J., Geffard, A., Xuereb, B., 2019b. Signification of DNA integrity in sperm of *Palaemon serratus* (Pennant 1777): Kinetic responses and reproduction impairment. *Marine environmental research* 144, 130–140.

Espie, P.J., Roff, J.C., 1995. Characterization of chitobiase from *Daphnia magna* and its relation to chitin flux. *Physiological zoology* 68, 727–748.

Fabritius, H.-O., Karsten, E.S., Balasundaram, K., Hild, S., Huemer, K., Raabe, D., 2012. Correlation of structure, composition and local mechanical properties in the dorsal carapace of the edible crab *Cancer pagurus*. *Zeitschrift für Kristallographie-Crystalline Materials* 227, 766–776.

Fabritius, H.-O., Ziegler, A., Friák, M., Nikolov, S., Huber, J., Seidl, B.H., Ruangchai, S., Alagboso, F.I., Karsten, S., Lu, J., 2016. Functional adaptation of crustacean exoskeletal elements through structural and compositional diversity: a combined experimental and theoretical study. *Bioinspiration & biomimetics* 11, 055006.

- Fatima, B., Billel, N., 2019.** Evaluation de la toxicité du thiaméthoxam à l'égard d'un crustacé *Palaemon adspersus* (Décapodes, Palaemonidae).
- Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J., Geffard, O., 2008.** Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology* 86, 413–425.
- Ferraris, R.P., Parado-Esteba, E.D., de Jesus, E.G., Ladja, J.M., 1987.** Osmotic and chloride regulation in the hemolymph of the tiger prawn *Penaeus monodon* during molting in various salinities. *Marine Biology* 95, 377–385.
- Feuillassier, L., Beguer, M., Pauliac, G., Boët, P., Girardin, M., Elie, P., 2012.** Morphological anomalies in estuarine shrimp larvae. *Crustaceana* 85, 11.
- Fieber, L.A., Lutz, P.L., 1985.** Magnesium and calcium metabolism during molting in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Canadian Journal of Zoology* 63, 1120–1124.
- Figueras, A.J., 1986.** Alimentación de *Palaemon adspersus* (Rathke, 1837) y *Palaemon serratus* (Pennant, 1777) (Decapoda Natantia) en la ría de Vigo (NO España). *Cahiers de Biologie Marine* 27, 77–99.
- Filiciotto, F., Vazzana, M., Celi, M., Maccarrone, V., Ceraulo, M., Buffa, G., Arizza, V., de Vincenzi, G., Grammatta, R., Mazzola, S., 2016.** Underwater noise from boats: Measurement of its influence on the behaviour and biochemistry of the common prawn (*Palaemon serratus*, Pennant 1777). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 478, 24–33.
- Fincham, A.A., 1983.** Larval development of British prawns and shrimps (Crustacea: Decapoda: Natantia) *Palaemon* (Palaemon) *serratus* (Pennant, 1777) and functional morphology of swimming.
- Fincham, A.A., Figueras, A.J., 1986.** Larval keys and diagnoses for the subfamily Palaemoninae (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) in the north-east Atlantic and aspects of functional morphology. *Journal of natural history* 20, 203–224.
- Fingerman, S.W., Fingerman, M., 1977.** Effects of a polychlorinated biphenyl and a polychlorinated dibenzofuran on molting of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 18, 138–142.

- Fingerman, M., 1997.** Crustacean endocrinology: a retrospective, prospective, and introspective analysis. *Physiological Zoology* 70, 257–269.
- Finley, D.B., Scott, G.I., Daugomah, J.W., Layman, S.L., Reed, L.A., Sanders, M., Sivertsen, S.K., Strozier, E.D., 1999.** An ecotoxicological assessment of urban and agricultural nonpoint source runoff effects on the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Ecological Risk Assessment for Wetlands* 243–273.
- Fisher, W.S., Foss, S.S., 1993.** A simple test for toxicity of number 2 fuel oil and oil dispersants to embryos of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Marine Pollution Bulletin* 26, 385–391.
- Fitzmayer, K.M., Geiger, J.G., Van Den Avyle, M.J., 1982.** Effects of chronic exposure to simazine on the cladoceran, *Daphnia pulex*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 11, 603–609.
- Forbes, V.E., Calow, P., 1999.** Is the per capita rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology? *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 18, 1544–1556.
- Forster, G.R., 1951.** The biology of the common prawn, *Leander serratus* Pennant. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 30, 333–360.
- Foster, C.A., Howse, H.D., 1978.** A morphological study on gills of the brown shrimp, *Penaeus aztecus*. *Tissue and cell* 10, 77–92.
- Frank, P.M., Robertson, P.B., 1979.** The influence of salinity on toxicity of cadmium and chromium to the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Bulletin of environmental Contamination and Toxicology* 21, 74–78.
- Frasco, M.F., Fournier, D., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2006.** Cholinesterase from the common prawn (*Palaemon serratus*) eyes: Catalytic properties and sensitivity to organophosphate and carbamate compounds. *Aquatic toxicology* 77, 412–421.
- Freeman, L., Fowler, I., 1953.** Toxicity of combinations of certain inorganic compounds to *Daphnia magna* Straus. *Sewage and Industrial Wastes* 1191–1195.
- Freeman, J.A., Bartell, C.K., 1975.** Characterization of the molt cycle and its hormonal control in *Palaemonetes pugio* (Decapoda, Caridea). *General and comparative endocrinology* 25, 517–528.

Freeman, J.A., Bartell, C.K., 1976. Some effects of the molt-inhibiting hormone and 20-hydroxyecdysone upon molting in the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. General and comparative endocrinology 28, 131–142.

Freeman, J.A., 1990. Molt increment, molt cycle duration, and tissue growth in *Palaemonetes pugio* Holthuis larvae. Journal of experimental marine biology and ecology 143, 47–61.

Fulton, M.H., Moore, D.W., Wirth, E.F., Chandler, G.T., Key, P.B., Daugomah, J.W., Strozier, E.D., Devane, J., Clark, J.R., Lewis, M.A., 1999. Assessment of risk reduction strategies for the management of agricultural nonpoint source pesticide runoff in estuarine ecosystems. Toxicology and Industrial Health 15, 201–214.

Gaertner, K., Chandler, G.T., Quattro, J., Ferguson, P.L., Sabo-Attwood, T., 2012. Identification and expression of the ecdysone receptor in the harpacticoid copepod, *Amphiascus tenuiremis*, in response to fipronil. Ecotoxicology and environmental safety 76, 39–45.

Gaisford, S., Kett, V., Haines, P., 2019. Principles of thermal analysis and calorimetry. Royal society of chemistry.

Galanti, L.N., Amé, M.V., Wunderlin, D.A., 2013. Accumulation and detoxification dynamic of cyanotoxins in the freshwater shrimp *Palaemonetes argentinus*. Harmful Algae 27, 88–97.

Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2004. Ecosystem management bioindicators: the ECOMAN project—a multi-biomarker approach to ecosystem management. Marine Environmental Research 58, 233–237.

García-Guerrero, M.U., Becerril-Morales, F., Vega-Villasante, F., Espinosa-Chaurand, L.D., 2013. Los langostinos del género *Macrobrachium* con importancia económica y pesquera en América Latina: conocimiento actual, rol ecológico y conservación. Latin american journal of aquatic research 41, 651–675.

Gaudy, R., Guerin, J.-P., Kerambrun, P., 1991. Sublethal effects of cadmium on respiratory metabolism, nutrition, excretion and hydrolase activity in *Leptomysis lingvura* (Crustacea: Mysidacea). Marine Biology 109, 493–501.

Gbenebor, O.P., Adeosun, S.O., Lawal, G.I., Jun, S., 2016. Role of CaCO₃ in the physicochemical properties of crustacean-sourced structural polysaccharides. Materials Chemistry and Physics 184, 203–209.

Gbenebor, O.P., Akpan, E.I., Adeosun, S.O., 2017. Thermal, structural and acetylation behavior of snail and periwinkle shells chitin. *Progress in biomaterials* 6, 97–111.

Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagianti, S., Noël, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., 2010. Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: application for reproductive toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 2249–2259.

Gerente, C., Lee, V.K.C., Cloirec, P.L., McKay, G., 2007. Application of chitosan for the removal of metals from wastewaters by adsorption—mechanisms and models review. *Critical reviews in environmental science and technology* 37, 41–127.

Gerhardt, A., De Bisthoven, L.J., Mo, Z., Wang, C., Yang, M., Wang, Z., 2002. Short-term responses of *Oryzias latipes* (Pisces: Adrianichthyidae) and *Macrobrachium nipponense* (Crustacea: Palaemonidae) to municipal and pharmaceutical waste water in Beijing, China: survival, behaviour, biochemical biomarkers. *Chemosphere* 47, 35–47.

Gharagozlou-van Ginneken, I.D., Bouligand, Y., 1975. Studies on the fine structure of the cuticle of Porcellidium, Crustacea Copepoda. *Cell and tissue research* 159, 399–412.

Ghekiere, A., Verslycke, T., Fockedey, N., Janssen, C.R., 2006. Non-target effects of the insecticide methoprene on molting in the estuarine crustacean *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea). *Journal of experimental marine biology and ecology* 332, 226–234.

Gibbs, P.E., Bryan, G.W., 1972. A study of strontium, magnesium, and calcium in the environment and exoskeleton of decapod crustaceans, with special reference to *Uca burgersi* on Barbuda, West Indies. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 9, 97–110.

Giraud-Guille, M.-M., Belamie, E., Mosser, G., 2004. Organic and mineral networks in carapaces, bones and biomimetic materials. *Comptes Rendus Palevol* 3, 503–513.

Giraud, M., Dubé, M., Lépine, M., Gagnon, P., Douville, M., Houde, M., 2017a. Multigenerational effects evaluation of the flame retardant tris (2-butoxyethyl) phosphate (TBOEP) using *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 190, 142–149.

Giraud, M., Douville, M., Cottin, G., Houde, M., 2017b. Transcriptomic, cellular and life-history responses of *Daphnia magna* chronically exposed to benzotriazoles: Endocrine-disrupting potential and molting effects. *PloS one* 12, e0171763.

Gismondi, E., Thomé, J.-P., 2014. Effects of two PBDE congeners on the moulting enzymes of the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Environmental pollution* 191, 119–125.

Goff, A.D., Saranjampour, P., Ryan, L.M., Hladik, M.L., Covi, J.A., Armbrust, K.L., Brander, S.M., 2017. The effects of fipronil and the photodegradation product fipronil desulfinyl on growth and gene expression in juvenile blue crabs, *Callinectes sapidus*, at different salinities. *Aquatic Toxicology* 186, 96–104.

Gong, J., Yu, K., Shu, L., Ye, H., Li, S., Zeng, C., 2015. Evaluating the effects of temperature, salinity, starvation and autotomy on molting success, molting interval and expression of ecdysone receptor in early juvenile mud crabs, *Scylla paramamosain*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 464, 11–17.

González-Castellano, I., 2020. Population genetic, phylogenetic and sex-related gene expression analyses in two "*Palaemon*" species.

González-Ortegón, E., Blasco, J., Le Vay, L., Giménez, L., 2013. A multiple stressor approach to study the toxicity and sub-lethal effects of pharmaceutical compounds on the larval development of a marine invertebrate. *Journal of hazardous materials* 263, 233–238.

González-Ortegón, E., Cuesta, J.A., 2006. An illustrated key to species of *Palaemon* and *Palaemonetes* (Crustacea: Decapoda: Caridea) from European waters, including the alien species *Palaemon macrodactylus*. *Marine Biological Association of the United Kingdom. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 86, 93.

González-Ortegón, E., Giménez, L., Blasco, J., Le Vay, L., 2015a. Effects of food limitation and pharmaceutical compounds on the larval development and morphology of *Palaemon serratus*. *Science of the total environment* 503, 171–178.

González-Ortegón, E., Blasco, J., Le Vay, L., Giménez, L., 2015b. Effects of pharmaceuticals on larvae and juveniles of *Palaemon varians* under daily variation of temperature.

González-Ortegón, E., Blasco, J., Nieto, E., Hampel, M., Le Vay, L., Giménez, L., 2016. Individual and mixture effects of selected pharmaceuticals on larval development of the estuarine shrimp *Palaemon longirostris*. *Science of the Total Environment* 540, 260–266.

Gooday, G.W., 1990. The ecology of chitin degradation. *Advances in microbial ecology* 387–430.

Gouveia, D., Chaumot, A., Charnot, A., Queau, H., Armengaud, J., Almunia, C., Salvador, A., Geffard, O., 2017. Assessing the relevance of a multiplexed methodology for proteomic biomarker measurement in the invertebrate species *Gammarus fossarum*: A physiological and ecotoxicological study. *Aquatic Toxicology* 190, 199–209.

Graf, F., Delbecque, J.P., 1987. Ecdysteroid titers during the molt cycle of *Orchestia cavimana* (Crustacea, Amphipoda). *General and comparative endocrinology* 65, 23–33.

Gravato, C., Almeida, J.R., Silva, C., Oliveira, C., Soares, A.M., 2014. Using a multibiomarker approach and behavioural responses to assess the effects of anthracene in *Palaemon serratus*. *Aquatic toxicology* 149, 94–102.

Gray, A.D., Weinstein, J.E., 2017. Size-and shape-dependent effects of microplastic particles on adult daggerblade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Environmental toxicology and chemistry* 36, 3074–3080.

Greenaway, P., 1983. Uptake of calcium at the postmoult stage by the marine crabs *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 75, 181–184.

Greenaway, P., 1985. Calcium balance and moulting in the Crustacea. *Biological Reviews* 60, 425–454.

Griffitt, R.J., Chandler, G.T., Greig, T.W., Quattro, J.M., 2006. Cathepsin B and glutathione peroxidase show differing transcriptional responses in the grass shrimp, *Palaemonetes pugio* following exposure to three xenobiotics. *Environmental science & technology* 40, 3640–3645.

Gross, M.Y., Maycock, D.S., Thorndyke, M.C., Morritt, D., Crane, M., 2001. Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) found below sewage treatment works. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 20, 1792–1797.

Guerao, G., Ribera, C., 1996. Locomotor activity patterns and feeding habits in the prawn *Palaemon serratus* (Pennant, 1777) (Decapoda, Palaemonidae) in the Alfacs Bay, Ebro Delta, Spain. *Crustaceana* 69, 101–112.

Guerao, G., Ribera, C., 2000. Population characteristics of the prawn *Palaemon serratus* (Decapoda, Palaemonidae) in a shallow Mediterranean Bay. *Crustaceana* 73, 459–468.

- Gundersen, D.T., Kristanto, S.W., Curtis, L.R., Al-Yakoob, S.N., Metwally, M.M., Al-Ajmi, D., 1996.** Subacute toxicity of the water-soluble fractions of Kuwait crude oil and partially combusted crude oil on *Menidia beryllina* and *Palaemonetes pugio*. Archives of environmental contamination and toxicology 31, 1–8.
- Hackman, R.H., Goldberg, M., 1965.** Studies on Chitin VI. The Nature of α - and β -Chitins. Australian journal of biological sciences 18, 935–946.
- Hagen, A., Zou, E., 2017.** Triclosan stimulates the activity of the molt-ing enzyme N-Acetyl-B-Glucosaminidase in the epidermis of the fiddler crab, *Uca pugilator*. Feb -Fresenius Environmental Bulletin 3764.
- Haig, J., Ryan, N.M., Williams, K.F., Kaiser, M.J., 2014.** A review of the *Palaemon serratus* fishery: biology, ecology and management. Fisheries and Conservation Report. Bangor: Bangor University.
- Haines, J.P., 2002.** Principle of Thermal Analysis and Calorimetry, Ed. RSo Chemistry.
- Hall Jr, L.W., Burton, D.T., Margrey, S.L., 1979.** Chlorine, temperature, and exposure duration effects of power plant effluents on juvenile blue crabs *Callinectes sapidus* and grass shrimp *Palaemonetes pugio*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues 5, 749–757.
- Hanson, M.L., Lagadic, L., 2005.** Chitobiase activity as an indicator of aquatic ecosystem health. Aquatic Ecosystem Health & Management 8, 441–450.
- Harper, H.E., Pennington, P.L., Hoguet, J., Fulton, M.H., 2008.** Lethal and sublethal effects of the pyrethroid, bifenthrin, on grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) and sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). Journal of Environmental Science and Health, Part B 43, 476–483.
- Hartnoll, R.G., 2001.** Growth in Crustacea—twenty years on. Advances in decapod Crustacean research 111–122.
- Hepburn, H.R., Joffe, I., Green, N., Nelson, K.J., 1975.** Mechanical properties of a crab shell. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 50, 551-IN13.
- Hepburn, H.R., Chandler, H.D., 1976.** Material properties of arthropod cuticles: the arthroal membranes. Journal of comparative physiology 109, 177–198.

Hepper, B.T., 1965. Pre-moult changes in the structure of the integument of the lobster, *Homarus vulgaris*. Rapport des Procès-Verbaux de la Réunion du Conseil International sur l'Exploration de la Mer 156, 1–14.

Hild, S., Marti, O., Ziegler, A., 2008. Spatial distribution of calcite and amorphous calcium carbonate in the cuticle of the terrestrial crustaceans *Porcellio scaber* and *Armadillidium vulgare*. Journal of structural biology 163, 100–108.

Hild, S., Neues, F., Žnidaršič, N., Štrus, J., Eppler, M., Marti, O., Ziegler, A., 2009. Ultrastructure and mineral distribution in the tergal cuticle of the terrestrial isopod *Titanethes albus*. Adaptations to a karst cave biotope. Journal of Structural Biology 168, 426–436.

Hilton, J., Sutcliffe, D.W., Carrick, T.R., Rigg, E., 1984. Major inorganic components in some freshwater crustaceans (Malacostraca), their exuviae and food items, and thermogravimetric-differential thermal analysis of organic and ash components. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 77, 13–22.

Hirano, M., Ishibashi, H., Kim, J.-W., Matsumura, N., Arizono, K., 2009. Effects of environmentally relevant concentrations of nonylphenol on growth and 20-hydroxyecdysone levels in mysid crustacean, *Americamysis bahia*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 149, 368–373.

Holthuis, L.B., 1952. A general revision of the Palaemonidae (crustacea Decapod Natantia) of the Americas. II. The subfamily Palaemonidae.

Holthuis, L.B., 1959. Results of the reexamination of the type specimens of some species belonging to the subfamilies Pontoniinae and Palaemoninae (Crustacea Decapoda Macrura). Zoologische Mededelingen 36, 193–200.

Hosamani, N., Reddy, S.B., Reddy, R.P., 2017. Crustacean molting: regulation and effects of environmental toxicants. J. Mar. Sci. Res. Dev 7.

Huang, W.-C., Zhao, D., Guo, N., Xue, C., Mao, X., 2018. Green and facile production of chitin from crustacean shells using a natural deep eutectic solvent. Journal of agricultural and food chemistry 66, 11897–11901.

Hubert, M., Payen, G.G., Chassard-Bouchaud, C., 1979. Anatomie comparée des racines des rhizocéphales *Sacculina carcini* Thompson et *Loxothylacus panopei* (Gissler) parasites

respectifs des brachyours *Carcinus maenas* (L.) et *Rhithropanopeus harrisii* (Gould) ; étude ultrastructurale des racines libres. Canadian Journal of Zoology 57, 1479–1486.

Huner, J.V., Könönen, H., Lindqvist, O.V., 1990. Variation in body composition and exoskeleton mineralization as functions of the molt and reproductive cycles of the noble crayfish, *Astacus astacus* L. (Decapoda, Astacidae), from a pond in central Finland. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 96, 235–240.

Husen, T.J., Kamble, S.T., 2013. Delayed toxicity of two chitinolytic enzyme inhibitors (psammaplin A and pentoxifylline) against eastern subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). Journal of economic entomology 106, 1788–1793.

Husen, T.J., Kamble, S.T., Stone, J.M., 2015. Effect of pentoxifylline on chitinolytic enzyme activity in the Eastern subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). Journal of Entomological Science 50, 295–310.

Huxley, R., 2011. Population structure and morphology of the prawn *Palaemon serratus* (Pennant, 1777) in Welsh coastal waters with a consideration of two options for regulating the fishery. Aberystwyth University.

Ibrahim, H.M., Salama, M.F., El-Banna, H.A., 1999. Shrimp's waste: Chemical composition, nutritional value and utilization. Food/Nahrung 43, 418–423.

International Standards Organisation. 1996. Water quality Determination of the Inhibition of the mobility of *Daphnia magna*, n.d.

ISO 10706, 2000. Water quality-determination of long-term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Cru, n.d.

Issartel, J., Boulo, V., Wallon, S., Geffard, O., Charmantier, G., 2010. Cellular and molecular osmoregulatory responses to cadmium exposure in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). Chemosphere 81, 701–710.

Jacobson, T., Sundelin, B., 2006. Reproductive effects of the endocrine disruptor fenarimol on a Baltic amphipod *Monoporeia affinis*. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal 25, 1126–1131.

Jayachandran, K.V., 2001. Palaemonid prawns: biodiversity, taxonomy, biology and management.

Jegla, T.C., 1965. Studies of eyestalks of cave crayfish, in American Zoologist. Amer soc zoologists 1041 New Hampshire St, Lawrence, Ks 66044, pp. 647.

Jegla, T.C., Ruland, C., Kegel, G., Keller, R., 1983. The role of the Y-organ and cephalic gland in ecdysteroid production and the control of molting in the crayfish, *Orconectes limosus*. Journal of comparative physiology 152, 91–95.

Jeuniaux, C., 1975. III. Chitine et complexes chitino-protéiques de la cuticule. Traité de zoologie: Insectes: Téguments, système nerveux, organes sensoriels. Tome VIII, fascicule III 31–44.

Jo, M., Lee, S., Yoon, S., Kim, W.-K., 2018. Developmental and reproductive effects of tamoxifen on *Daphnia magna*. Environmental monitoring and assessment 190, 1–7.

Joffe, I., Hepburn, H.R., Nelson, K.J., Green, N., 1975. Mechanical properties of a crustacean exoskeleton. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 50, 545–549.

Jose, D., Harikrishnan, M., 2019. Evolutionary history of genus *Macrobrachium* inferred from mitochondrial markers: a molecular clock approach. Mitochondrial Dna Part A 30, 92–100.

Juárez-De La Rosa, B.A., May-Crespo, J., Quintana-Owen, P., González-Gómez, W.S., Yañez-Limón, J.M., Alvarado-Gil, J.J., 2015. Thermal analysis and structural characterization of chitinous exoskeleton from two marine invertebrates. Thermochimica Acta 610, 16–22.

Jubeaux, G., Simon, R., Salvador, A., Quéau, H., Chaumot, A., Geffard, O., 2012. Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males. Aquatic toxicology 112, 72–82.

Kamaruding, N.A., Ismail, N., Ikhwanuddin, M., 2017. Characterization of molting stages in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* using setagenesis of pleopod. Songklanakarin J Sci Technol 40, 397–401.

Katsikini, M., Proiou, E., Vouroutzis, N., Pinakidou, F., Paloura, E.C., Smirnov, D., Brzhezinskaya, M., Ves, S., 2020. Crystalline and amorphous calcium carbonate as structural components of the *Calappa granulata* exoskeleton. Journal of Structural Biology 211, 107557.

- Kawada, H., KojiMA, I., Shinjo, G., 1989.** Laboratory evaluation of a new insect growth regulator pyriproxyfen, as a cockroach control agent. *Medical Entomology and Zoology* 40, 195–201.
- Kaya, M., Baran, T., Menten, A., Asaroglu, M., Sezen, G., Tozak, K.O., 2014.** Extraction and Characterization of α -Chitin and Chitosan from Six Different Aquatic Invertebrates. *Food Biophysics* 9, 145–157. <https://doi.org/10.1007/s11483-013-9327-y>
- Kelly, D.W., Dick, J.T.A., Montgomery, W.I., MacNeil, C., 2003.** Differences in composition of macroinvertebrate communities with invasive and native *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda). *Freshwater Biology* 48, 306–315.
- Kelly, E., Tully, O., Lehane, B., Breathnach, S., 2008.** The shrimp (*Palaemon serratus* P.) fishery: Analysis of the resource in 2003–2007. BIM Fisheries Resource Series 8.
- Kelly, E., Tully, O., Browne, R., 2012.** Effects of temperature and salinity on the survival and development of larval and juvenile *Palaemon serratus* (Decapoda: Palaemonidae) from Irish waters.
- Key, P.B., Fulton, M.H., Scott, G.I., Layman, S.L., Wirth, E.F., 1998.** Lethal and sublethal effects of malathion on three life stages of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Aquatic toxicology* 40, 311–322.
- Key, P.B., Chung, K.W., Opatkiewicz, A.D., Wirth, E.F., Fulton, M.H., 2003.** Toxicity of the insecticides fipronil and endosulfan to selected life stages of the grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 70, 0533–0540.
- Key, P.B., Wirth, E.F., Fulton, M.H., 2006.** A review of grass shrimp, *Palaemonetes* spp., as a bioindicator of anthropogenic impacts. *Environmental Bioindicators* 1, 115–128.
- Key, P., Chung, K., Siewicki, T., Fulton, M., 2007.** Toxicity of three pesticides individually and in mixture to larval grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68, 272–277.
- Key, P.B., Hoguet, J., Reed, L.A., Chung, K.W., Fulton, M.H., 2008.** Effects of the statin antihyperlipidemic agent simvastatin on grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Environmental Toxicology: An International Journal* 23, 153–160.

- Key, P.B., Hoguet, J., Chung, K.W., Venturella, J.J., Pennington, P.L., Fulton, M.H., 2009.** Lethal and sublethal effects of simvastatin, irgarol, and PBDE-47 on the estuarine fish, *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 44, 379–382.
- Key, P.B., West, J.B., Pennington, P.L., Daugomah, J.W., Fulton, M.H., 2011.** Effects of land use and physicochemical water quality on grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, and its parasitic isopod, *Probopyrus pandalicola*, in South Carolina, USA tidal creeks.
- Key, P.B., Chung, K.W., West, J.B., Pennington, P.L., DeLorenzo, M.E., 2020.** Developmental and reproductive effects in grass shrimp (*Palaemon pugio*) following acute larval exposure to a thin oil sheen and ultraviolet light. *Aquatic Toxicology* 228, 105651.
- Kharat, P.S., Ghoble, L.B., Shejule, K.B., Kale, R.S., Ghoble, B.C., 2009.** Impact of TBTCI on total protein content in fresh water prawn, *Macrobrachium kistnensis*. *Middle-East J. Sci. Res* 4, 180–184.
- Kirkpatrick, K., Jones, M.B., 1985.** Salinity tolerance and osmoregulation of a prawn, *Palaemon affinis* Milne Edwards (Caridea: Palaemonidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 93, 61–70.
- Kittur, F.S., Prashanth, K.H., Sankar, K.U., Tharanathan, R.N., 2002.** Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydrate polymers* 49, 185–193.
- Koga, D., Mai, M.S., Dziadik-Turner, C., Kramer, K.J., 1982.** Kinetics and mechanism of exochitinase and β -N-acetylhexosaminidase from the tobacco hornworm, *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae). *Insect Biochemistry* 12, 493–499.
- Kono, M., Wilder, M.N., Matsui, T., Furukawa, K., Koga, D., Aida, K., 1995.** Chitinolytic enzyme activities in the hepatopancreas, tail fan and hemolymph of kuruma prawn *Penaeus japonicus* during the molt cycle. *Fisheries science* 61, 727–728.
- Kumar, M.N.R., 2000.** A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers* 46, 1–27.
- Kumari, S., Annamareddy, S.H.K., Abanti, S., Rath, P.K., 2017.** Physicochemical properties and characterization of chitosan synthesized from fish scales, crab and shrimp shells. *International journal of biological macromolecules* 104, 1697–1705.

- Kurihara, H., Matsui, M., Furukawa, H., Hayashi, M., Ishimatsu, A., 2008.** Long-term effects of predicted future seawater CO₂ conditions on the survival and growth of the marine shrimp *Palaemon pacificus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 367, 41–46.
- Kurita, K., 2006.** Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine biotechnology* 8, 203–226.
- Kuzmick, D.M., Mitchelmore, C.L., Hopkins, W.A., Rowe, C.L., 2007.** Effects of coal combustion residues on survival, antioxidant potential, and genotoxicity resulting from full-lifecycle exposure of grass shrimp (*Palaemonetes pugio* Holthius). *Science of the Total Environment* 373, 420–430.
- Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A., Geffard, O., 2011.** DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: a tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environmental Pollution* 159, 1682–1691.
- Lachaise, F., Le Roux, A., Hubert, M., Lafont, R., 1993.** The molting gland of crustaceans: localization, activity, and endocrine control (a review). *Journal of Crustacean Biology* 13, 198–234.
- Lafontaine, A., Gismondi, E., Boulangé-Lecomte, C., Geraudie, P., Dodet, N., Caupos, F., Lemoine, S., Lagadic, L., Thomé, J.-P., Forget-Leray, J., 2016.** Effects of chlordecone on 20-hydroxyecdysone concentration and chitobiase activity in a decapod crustacean, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquatic toxicology* 176, 53–63.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., 1997.** Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux, Collection “Recherche en Biologie.” Masson, Ed Paris.
- Larras, F., Billoir, E., Baillard, V., Siberchicot, A., Scholz, S., Wubet, T., Tarkka, M., Schmitt-Jansen, M., Delignette-Muller, M.-L., 2018.** DRomics: a Turnkey Tool to support the use of the dose–response framework for omics data in ecological risk assessment. *Environmental science & technology* 52, 14461–14468.
- Larras, F., Billoir, E., Scholz, S., Tarkka, M., Wubet, T., Delignette-Muller, M.-L., Schmitt-Jansen, M., 2020.** A multi-omics concentration-response framework uncovers novel understanding of triclosan effects in the chlorophyte *Scenedesmus vacuolatus*. *Journal of hazardous materials* 397, 122727.

Lavarías, S., Heras, H., Pedrini, N., Tournier, H., Ansaldo, M., 2011. Antioxidant response and oxidative stress levels in *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemonidae) exposed to the water-soluble fraction of petroleum. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 153, 415–421.

Lavarías, S., García, C., Crespo, R., Pedrini, N., Heras, H., 2013. Study of biochemical biomarkers in freshwater prawn *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemonidae) exposed to organophosphate fenitrothion. *Ecotoxicology and environmental safety* 96, 10–16.

Lavarías, S., García, C.F., 2015. Acute toxicity of organophosphate fenitrothion on biomarkers in prawn *Palaemonetes argentinus* (Crustacea: Palaemonidae). *Environmental monitoring and assessment* 187, 1–11.

LeBlanc, G.A., 2007. Crustacean endocrine toxicology: a review. *Ecotoxicology* 16, 61–81.

Leight, A.K., Scott, G.I., Fulton, M.H., Daugomah, J.W., 2005. Long term monitoring of grass shrimp *Palaemonetes* spp. Population metrics at sites with agricultural runoff influences 1, 2. *Integrative and Comparative Biology* 45, 143–150.

Levesque, B., Cachot, J., Boët, P., Lepage, M., Mazella, N., Martin, C., Gourves, P.-Y., Legeay, A., 2018. Seasonal variations of contamination and exoskeletal malformations in the white shrimps *Palaemon longirostris* in the Gironde estuary, France. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 22689–22701.

Levi-Kalisman, Y., Raz, S., Weiner, S., Addadi, L., Sagi, I., 2002. Structural differences between biogenic amorphous calcium carbonate phases using X-ray absorption spectroscopy. *Advanced Functional Materials* 12, 43–48.

Lignot, J.-H., Spanings-Pierrot, C., Charmantier, G., 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture* 191, 209–245.

Lira, C., Bolivar, N., Oliveira, A., Bolanos, J., 2012. A case of leg malformation in the Atlantic ghost crab *Ocypode quadrata* (Decapoda, Brachyura, Ocypodidae). *Crustaceana* 85, 1787–1791.

Lopes, C., Chaumot, A., Xuereb, B., Coulaud, R., Jubeaux, G., Quéau, H., François, A., Geffard, O., 2020. *In situ* reproductive bioassay with caged *Gammarus fossarum* (Crustacea): Part 2—Evaluating the relevance of using a molt cycle temperature-dependent model as a

reference to assess toxicity in freshwater monitoring. *Environmental toxicology and chemistry* 39, 678–691.

Lorenzon, S., Francese, M., Ferrero, E.A., 2000. Heavy metal toxicity and differential effects on the hyperglycemic stress response in the shrimp *Palaemon elegans*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39, 167–176.

Lorenzon, S., Martinis, M., Ferrero, E.A., 2011. Ecological relevance of hemolymph total protein concentration in seven unrelated crustacean species from different habitats measured predictively by a density-salinity refractometer. *Journal of Marine Biology* 2011.

Luís, L.G., Guilhermino, L., 2012. Short-term toxic effects of naphthalene and pyrene on the common prawn (*Palaemon serratus*) assessed by a multi-parameter laboratorial approach: mechanisms of toxicity and impairment of individual fitness. *Biomarkers* 17, 275–285.

Luo, J., Pei, S., Jing, W., Zou, E., Wang, L., 2015. Cadmium inhibits molting of the freshwater crab *Sinopotamon henanense* by reducing the hemolymph ecdysteroid content and the activities of chitinase and N-acetyl- β -glucosaminidase in the epidermis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 169, 1–6.

Luquet, G., 2012. Biomineralizations: insights and prospects from crustaceans. *Zookeys* 103.

Lye, C.M., Bentley, M.G., Galloway, T., 2008. Effects of 4-nonylphenol on the endocrine system of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Environmental Toxicology: An International Journal* 23, 309–318.

Madeira, D., Mendonça, V., Dias, M., Roma, J., Costa, P.M., Larguinho, M., Vinagre, C., Diniz, M.S., 2015. Physiological, cellular and biochemical thermal stress response of intertidal shrimps with different vertical distributions: *Palaemon elegans* and *Palaemon serratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 183, 107–115.

Maltby, L., Clayton, S.A., Wood, R.M., McLoughlin, N., 2002. Evaluation of the *Gammarus pulex in situ* feeding assay as a biomonitor of water quality: Robustness, responsiveness, and relevance. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 21, 361–368.

Manyin, T., Rowe, C.L., 2008. Modeling effects of cadmium on population growth of *Palaemonetes pugio*: Results of a full life cycle exposure. *Aquatic toxicology* 88, 111–120.

- Manyin, T., Rowe, C.L., 2010.** Reproductive and life stage-specific effects of aqueous copper on the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Marine environmental research* 69, 152–157.
- Mary, R.F., Krishnan, G., 1974.** On the nature and role of protein constituents of the cuticle of crustaceans in relation to permeability of the cuticle. *Marine Biology* 25, 299–309.
- McCarthy, J.F., Skinner, D.M., 1977.** Proecdysial changes in serum ecdysone titers, gastrolith formation, and limb regeneration following molt induction by limb autotomy and/or eyestalk removal in the land crab, *Gecarcinus lateralis*. *General and comparative endocrinology* 33, 278–292.
- McCarty, L.S., Power, M., Munkittrick, K.R., 2002.** Bioindicators versus biomarkers in ecological risk assessment. *Human and Ecological risk assessment* 8, 159–164.
- McKenney Jr, C.L., 2005.** The influence of insect juvenile hormone agonists on metamorphosis and reproduction in estuarine crustaceans. *Integrative and Comparative Biology* 45, 97–105.
- McLachlan, J.A., 2001.** Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocrine reviews* 22, 319–341.
- Meng, Y., Zou, E., 2009.** Impacts of molt-inhibiting organochlorine compounds on epidermal ecdysteroid signaling in the fiddler crab, *Uca pugilator*, *in vitro*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 150, 436–441.
- Mergelsberg, S.T., Ulrich, R.N., Xiao, S., Dove, P.M., 2019.** Composition systematics in the exoskeleton of the American lobster, *Homarus americanus* and implications for Malacostraca. *Frontiers in Earth Science* 7, 69.
- Mesquita, S.R., Guilhermino, L., Guimarães, L., 2011.** Biochemical and locomotor responses of *Carcinus maenas* exposed to the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. *Chemosphere* 85, 967–976.
- Mesquita, S.R., Ergen, Ş.F., Rodrigues, A.P., Oliva-Teles, M.T., Delerue-Matos, C., Guimarães, L., 2015.** N-acetyl- β -d-glucosaminidase activity in feral *Carcinus maenas* exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology* 159, 225–232.
- Meyran, J.-C., 1998.** Ecophysiological diversity of alpine populations of *Gammarus lacustris* in relation to environmental calcium. *Freshwater Biology* 39, 41–47.

- Modla, S., 2006.** The effect of fixation on the morphology of the late premolt and early postmolt cuticle of the blue crab, *Callinectes sapidus*. University of North Carolina at Wilmington.
- Mohamed, M.A., Jaafar, J., Ismail, A.F., Othman, M.H.D., Rahman, M.A., 2017.** Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, in: Membrane Characterization. Elsevier, pp. 3–29.
- Mohti, A., Shuhaimi-Othman, M., Gerhardt, A., 2012.** Use of the Multispecies Freshwater Biomonitor to assess behavioral changes of *Poecilia reticulata* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) and *Macrobrachium lanchesteri* (Decapoda: Palaemonidae) in response to acid mine drainage: laboratory exposure. *Journal of Environmental Monitoring* 14, 2505–2511.
- Montagna, M.C., Collins, P.A., 2007.** Survival and growth of *Palaemonetes argentinus* (Decapoda; Caridea) exposed to insecticides with chlorpyrifos and endosulfan as active element. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53, 371–378.
- Montagna, M.C., 2011.** Effect of temperature on the survival and growth of freshwater prawns *Macrobrachium borellii* and *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Palaemonidae). *Iheringia. Série Zoologia* 101, 233–238.
- Montroni, D., Fermani, S., Morellato, K., Torri, G., Naggi, A., Cristofolini, L., Falini, G., 2019.** β -Chitin samples with similar microfibril arrangement change mechanical properties varying the degree of acetylation. *Carbohydrate polymers* 207, 26–33.
- Moreno, P.A.R., Medesani, D.A., Rodriguez, E.M., 2003.** Inhibition of molting by cadmium in the crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda Brachyura). *Aquatic toxicology* 64, 155–164.
- Mu, X., LeBlanc, G.A., 2002.** Developmental toxicity of testosterone in the crustacean *Daphnia magna* involves anti-ecdysteroidal activity. *General and Comparative Endocrinology* 129, 127–133.
- Murti, R., Shukla, G.S., 1984.** Toxicity of copper sulphate and zinc sulphate to *Macrobrachium lamarrei* (H. Milne Edwards) (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 168–173.
- Muzzarelli, R.A.A., Morganti, P., Morganti, G., Palombo, P., Palombo, M., Biagini, G., Mattioli Belmonte, M., Giantomassi, F., Orlandi, F., Muzzarelli, C., 2007.** Chitin nanofibrils/chitosan glycolate composites as wound medicaments. *Carbohydrate Polymers* 70, 274–284.

- Mykles, D.L., 2001.** Interactions between limb regeneration and molting in decapod crustaceans. *American Zoologist* 41, 399–406.
- Nagasawa, H., 2012.** The crustacean cuticle: structure, composition and mineralization. *Front Biosci* 4, 711–20.
- Nakatsuji, T., Lee, C.-Y., Watson, R.D., 2009.** Crustacean molt-inhibiting hormone: structure, function, and cellular mode of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 152, 139–148.
- Nanjo, F., Ishikawa, M., Katsumi, R., Sakai, K., 1990.** Purification, properties, and transglycosylation reaction of β -N-acetylhexosaminidase from *Nocardia orientalis*. *Agricultural and Biological Chemistry* 54, 899–906.
- Nanri, T., Fukushige, M., Ubaldo, J.P., Kang, B.-J., Masunari, N., Takada, Y., Hatakeyama, M., Saigusa, M., 2011.** Occurrence of abnormal sexual dimorphic structures in the gonochoristic crustacean, *Upogebia major* (Thalassinidea: Decapoda), inhabiting mud tidal flats in Japan. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 91, 1049–1057.
- Ndimiele, P.E., 2011.** Acute toxicity of Nigerian crude oil (Bonny Light) to *Desmocaris trispinosa* (Crustacea, Palaemonidae). *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation* 4, 606–610.
- Neues, F., Ziegler, A., Epple, M., 2007.** The composition of the mineralized cuticle in marine and terrestrial isopods: a comparative study. *CrystEngComm* 9, 1245–1251.
- Neufeld, D.S., Cameron, J.N., 1992.** Postmoult uptake of calcium by the blue crab (*Callinectes sapidus*) in water of low salinity. *Journal of Experimental Biology* 171, 283–299.
- Neville, A.C., Parry, D.A., Woodhead-Galloway, J., 1976.** The chitin crystallite in arthropod cuticle. *Journal of cell science* 21, 73–82.
- Neville, A.C., 2012.** Biology of the arthropod cuticle. Springer Science & Business Media.
- No, O.T., 2012. 211:** *Daphnia magna* reproduction test. OECD guidelines for the testing of chemicals, section 2.
- Nuñez-Nogueira, G., Rainbow, P.S., 2005.** Cadmium uptake and accumulation by the decapod crustacean *Penaeus indicus*. *Marine environmental research* 60, 339–354.

O'Halloran, M.J., O'Dor, R.K., 1988. Molt cycle of male snow crabs, *Chionoecetes opilio*, from observations of external features, setal changes, and feeding behavior. *Journal of Crustacean Biology* 8, 164–176.

Oberdörster, E., Brouwer, M., Hoexum-Brouwer, T., Manning, S., McLachlan, J.A., 2000. Long-term pyrene exposure of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, affects molting and reproduction of exposed males and offspring of exposed females. *Environmental Health Perspectives* 108, 641–646.

Okumura, T., Aida, K., 2000. Fluctuations in hemolymph ecdysteroid levels during the reproductive and nonreproductive molt cycles in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fisheries science* 66, 876–883.

Okumura, T., Aida, K., 2001. Effects of bilateral eyestalk ablation on molting and ovarian development in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fisheries science* 67, 1125–1135.

Olesen, J., 2013. The crustacean carapace—morphology, function, development, and phylogenetic history. *Functional morphology and diversity* 1, 103.

Oliveira, C., Almeida, J., Guilhermino, L., Soares, A.M., Gravato, C., 2012. Acute effects of deltamethrin on swimming velocity and biomarkers of the common prawn *Palaemon serratus*. *Aquatic toxicology* 124, 209–216.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.L., 2001. Low exposure concentration effects of methoprene on endocrine-regulated processes in the crustacean *Daphnia magna*. *Toxicological Sciences* 62, 268–273.

Olsvik, P.A., Lunestad, B.T., Agnalt, A.-L., Samuelsen, O.B., 2017. Impact of teflubenzuron on the rockpool shrimp (*Palaemon elegans*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 201, 35–43.

Olsvik, P.A., Aulin, M., Samuelsen, O.B., Hannisdal, R., Agnalt, A.-L., Lunestad, B.T., 2019. Whole-animal accumulation, oxidative stress, transcriptomic and metabolomic responses in the pink shrimp (*Pandalus montagui*) exposed to teflubenzuron. *Journal of Applied Toxicology* 39, 485–497.

Oosterhuis, S.S., Baars, M.A., Breteler, W.C.K., 2000. Release of the enzyme chitinase by the copepod *Temora longicornis*: characteristics and potential tool for estimating crustacean biomass production in the sea. Marine Ecology Progress Series 196, 195–206.

Organization for Economic Cooperation and Development, 1998. OECD Guidelines for Testing of Chemicals: *Daphnia magna* Rep, n.d.

Overturf, C.L., Wormington, A.M., Blythe, K.N., Gohad, N.V., Mount, A.S., Roberts, A.P., 2015. Toxicity of noradrenaline, a novel anti-biofouling component, to two non-target zooplankton species, *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 171, 49–54.

Palma, P., Palma, V.L., Matos, C., Fernandes, R.M., Bohn, A., Soares, A., Barbosa, I.R., 2009. Effects of atrazine and endosulfan sulphate on the ecdysteroid system of *Daphnia magna*. Chemosphere 74, 676–681.

Pandharipande, S., Bhagat, P.H., 2016. Synthesis of chitin from crab shells and its utilization in preparation of nanostructured film. Synthesis 5.

Pandourski, I., Evtimova, V., 2009. Morphological variability and teratology of lower crustaceans (Copepoda and Branchiopoda) from circumpolar regions. Acta Zoologica Bulgarica 61, 55–67.

Panikkar, N.K., 1941. Osmoregulation in some palaemonid prawns. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 25, 317–359.

Park, J.S., 1999. Ultrastructural Changes in the Cuticle of *Palaemon serrifer* (Palaemonidae, Crustacea) during the Intermolt Cycle. Fisheries and aquatic sciences 2, 78–84.

Park, K., Nikapitiya, C., Kwak, I.-S., 2016. Identification and expression of proteolysis-response genes for *Macrophthalmus japonicus* exposure to irgarol toxicity, in: Annales de Limnologie-International Journal of Limnology. EDP Sciences, pp. 65–74.

Park, K., Kim, W.-S., Kwak, I.-S., 2019. Characterization and transcriptional response of ecdysone receptor gene in the mud crab *Macrophthalmus japonicus*: Effects of osmotic stress and endocrine disrupting chemicals. Ocean Science Journal 54, 611–620.

Passano, L.M., 1960. Molting and its control. Metabolism and growth.

- Pates Jr, G.S., Quinitio, E.T., Quinitio, G.F., Parado-Esteba, F.D., 2017.** Morphological deformities in mud crab *Scylla serrata* juveniles exposed to antibiotics during the larval stage. *Aquaculture Research* 48, 2102–2112.
- Pavlidou, A., Anastasopoulou, E., Dassenakis, M., Hatzianestis, I., Paraskevopoulou, V., Simboura, N., Rousselaki, E., Drakopoulou, P., 2014.** Effects of olive oil wastes on river basins and an oligotrophic coastal marine ecosystem: a case study in Greece. *Science of the total environment* 497, 38–49.
- Peng, Y., Luo, Y., Nie, X.-P., Liao, W., Yang, Y.-F., Ying, G.-G., 2013.** Toxic effects of triclosan on the detoxification system and breeding of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 22, 1384–1394.
- Peng, Y., Ji, W., Zhang, D., Ji, H., Liu, S., 2019.** Composition and content analysis of fluoride in inorganic salts of the integument of Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Scientific reports* 9, 1–6.
- Pennington, P.L., DeLorenzo, M.E., Lawton, J.C., Strozier, E.D., Fulton, M.H., Scott, G.I., 2004.** Modular estuarine mesocosm validation: ecotoxicological assessment of direct effects with the model compound endosulfan. *Journal of experimental marine biology and ecology* 298, 369–387.
- Perina, A., Mari-Mena, N., Torrecilla, Z., Gonzalez-Tizon, A.M., Gonzalez-Castellano, I., Gonzalez-Ortegon, E., Martinez-Lage, A., 2019.** Assessment of genetic diversity and population structure of the common littoral shrimp *Palaemon serratus* (Pennant, 1777) by microsatellites: Towards a sustainable management.
- Perry, H., Trigg, C., Larsen, K., Freeman, J., Erickson, M., Henry, R., 2001.** Calcium concentration in seawater and exoskeletal calcification in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Aquaculture* 198, 197–208.
- Peschke, K., Geburzi, J., Ko, H.-R., Wurm, K., Triebkorn, R., 2014.** Invertebrates as indicators for chemical stress in sewage-influenced stream systems: toxic and endocrine effects in gammarids and reactions at the community level in two tributaries of Lake Constance, Schussen and Argen. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 106, 115–125.
- Peters, G., Saborowski, R., Buchholz, F., Mentlein, R., 1999.** Two distinct forms of the chitin-degrading enzyme N-acetyl- β -d-glucosaminidase in the Antarctic krill: specialists in digestion and moult. *Marine Biology* 134, 697–703.

- Pinto, M.R., Lucena, M.N., Faleiros, R.O., Almeida, E.A., McNamara, J.C., Leone, F.A., 2016.** Effects of ammonia stress in the Amazon river shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Aquatic Toxicology* 170, 13–23.
- Phillips, G., 1971.** Incubation of the English prawn *Palaemon serratus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 51, 43–48.
- Plaistow, S.J., Troussard, J.-P., Cézilly, F., 2001.** The effect of the acanthocephalan parasite *Pomphorhynchus laevis* on the lipid and glycogen content of its intermediate host *Gammarus pulex*. *International journal for parasitology* 31, 346–351.
- Poleck, T.P., Denys, C.J., 1982.** Effect of temperature on the molting, growth and maturation of the Antarctic krill *Euphausia superba* (Crustacea: Euphausiacea) under laboratory conditions. *Marine Biology* 70, 255–265.
- Politi, Y., Bar-On, B., Fabritius, H.-O., 2019.** Mechanics of arthropod cuticle-versatility by structural and compositional variation, *Architected Materials in Nature and Engineering*. Springer, pp. 287–327.
- Pratoomchat, B., Sawangwong, P., Guedes, R., Reis, M. de Iurdes, Machado, J., 2002a.** Cuticle ultrastructure changes in the crab *Scylla serrata* over the molt cycle. *Journal of Experimental Zoology* 293, 414–426.
- Pratoomchat, B., Sawangwong, P., Pakkong, P., Machado, J., 2002b.** Organic and inorganic compound variations in haemolymph, epidermal tissue and cuticle over the molt cycle in *Scylla serrata* (Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 131, 243–255.
- Primavera, J.H., Quinitio, E.T., 2000.** Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *Journal of Crustacean Biology* 20, 796–802.
- Promwikorn, W., Boonyoung, P., Kirirat, P., 2005.** Histological characterization of cuticular depositions throughout the molting cycle of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Songklanakarin J. Sci. Technol* 27, 765–772.
- Pütz, K., Buchholz, F., 1991.** Comparative ultrastructure of the cuticle of some pelagic, nekto-benthic and benthic malacostracan crustaceans. *Marine Biology* 110, 49–58.
- Qi, S., Wang, Chen, Chen, X., Qin, Z., Li, X., Wang, Chengju, 2013.** Toxicity assessments with *Daphnia magna* of Guadipyr, a new neonicotinoid insecticide and studies of its effect on

acetylcholinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and chitinase activities. *Ecotoxicology and environmental safety* 98, 339–344.

Qi, S., Liu, X., Zhu, L., Chen, X., Wang, C., 2018. Racemic, R-, and S-tebuconazole altered chitinase and chitinase activity of *Daphnia magna*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 53, 171–175.

R Core Team, 2018. R: a language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienne, n.d.

Raabe, D., Romano, P., Sachs, C., Al-Sawalmih, A., Brokmeier, H.-G., Yi, S.-B., Servos, G., Hartwig, H.G., 2005a. Discovery of a honeycomb structure in the twisted plywood patterns of fibrous biological nanocomposite tissue. *Journal of Crystal Growth* 283, 1–7.

Raabe, D., Sachs, C., Romano, P., 2005b. The crustacean exoskeleton as an example of a structurally and mechanically graded biological nanocomposite material. *Acta Materialia* 53, 4281–4292.

Rainbow, P.S., 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine pollution bulletin* 31, 183–192.

Rainbow, P.S., 1997. Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. *Estuarine, coastal and shelf science* 44, 169–176.

Rao, K.R., Doughtie, D.G., 1984. Histopathological changes in grass shrimp exposed to chromium, pentachlorophenol and dithiocarbamates. *Marine environmental research* 14, 371–395.

Rao, F.V., Andersen, O.A., Vora, K.A., DeMartino, J.A., Van Aalten, D.M., 2005. Methylxanthine drugs are chitinase inhibitors: investigation of inhibition and binding modes. *Chemistry & biology* 12, 973–980.

Rausina, G.A., Wong, D.C., Arnold, W.R., Mancini, E.R., Steen, A.E., 2002. Toxicity of methyl tert-butyl ether to marine organisms: ambient water quality criteria calculation. *Chemosphere* 47, 525–534.

Rayburn, J.R., Glas, P.S., Foss, S.S., Fisher, W.S., 1996. Characterization of grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) embryo toxicity tests using the water soluble fraction of number 2 fuel oil. *Marine pollution bulletin* 32, 860–866.

Rayburn, J.R., Fisher, W.S., 1999. Developmental toxicity of copper chloride, methylene chloride, and 6-aminonicotinamide to embryos of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 18, 950–957.

Rayburn, J.R., Aladdin, R.K., 2003. Developmental toxicity of copper, chromium, and aluminum using the shrimp embryo teratogenesis assay: palaemonid with artificial seawater. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 71, 0481–0488.

Raz, S., Testeniere, O., Hecker, A., Weiner, S., Luquet, G., 2002. Stable Amorphous Calcium Carbonate Is the Main Component of the Calcium Storage Structures of the Crustacean *Orchestia cavimana*. *The Biological Bulletin* 203, 269–274. <https://doi.org/10.2307/1543569>

Reaka, M.L., 1975. Molting in stomatopod crustaceans. I. Stages of the molt cycle, setagenesis, and morphology. *Journal of Morphology* 146, 55–80.

Reddy, M.M., 1977. Crystallization of calcium carbonate in the presence of trace concentrations of phosphorus-containing anions: I. Inhibition by phosphate and glycerophosphate ions at pH 8.8 and 25 C. *Journal of Crystal Growth* 41, 287–295.

Reddy, P.S., Bhagyalakshmi, A., 1994. Changes in oxidative metabolism in selected tissues of the crab (*Scylla serrata*) in response to cadmium toxicity. *Ecotoxicology and environmental safety* 29, 255–264.

Reddy, P.S., Devi, M., Sarojini, R., Nagabhushanam, R., Fingerman, M., 1994. Cadmium chloride induced hyperglycemia in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*: possible role of crustacean hyperglycemic hormone. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 107, 57–61.

Reeve, M.R., 1969. Growth, metamorphosis and energy conversion in the larvae of the prawn, *Palaemon serratus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 49, 77–96.

Reynolds, S.E., Samuels, R.I., 1996. Physiology and biochemistry of insect moulting fluid. *Advances in insect physiology* 26, 157–232.

Rhazi, M., Desbrieres, J., Tolaimate, A., Alagui, A., Vottero, P., 2000. Investigation of different natural sources of chitin: influence of the source and deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan. *Polymer International* 49, 337–344.

- Richard, P., 1978a.** Tolerance aux températures extrêmes de *Palaemon serratus* (Pennant): influence de la taille et de l'acclimatation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 35, 137–146.
- Richard, P., 1978b.** Influence de la température sur la croissance et la mue de *Palaemon serratus* en fonction de leur taille. *Aquaculture* 14, 13–22.
- Richards, A.G., 1951.** The Integument of Arthropods: The Chemical Components and Their Properties, the Anatomy and Development, and the Permeability. U of Minnesota Press.
- Richards, S.M., Kelly, S.E., Hanson, M.L., 2008.** Zooplankton chitobiase activity as an endpoint of pharmaceutical effect. *Archives of environmental contamination and toxicology* 54, 637–644.
- Rinaudo, M., 2006.** Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer science* 31, 603–632.
- Rinderhagen, M., Ritterhoff, J., Zauke, G.-P., 2000.** Crustaceans as bioindicators, in: *Biomonitoring of Polluted Water-Reviews on Actual Topics*. Trans Tech Publications-Scitech Publications, Environmental Research Forum. pp. 161–194.
- Roberts, W.K., Selitrennikoff, C.P., 1988.** Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Microbiology* 134, 169–176.
- Robertson, L., Bray, W., Leung-Trujillo, J., Lawrence, A., 1987.** Practical molt staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris*. *Journal of the World Aquaculture Society* 18, 180–185.
- Rødde, R.H., Einbu, A., Vårum, K.M., 2008.** A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). *Carbohydrate polymers* 71, 388–393.
- Rodríguez, E.M., Greco, L.S.L., Medesani, D.A., Laufer, H., Fingerman, M., 2002.** Effect of methyl farnesoate, alone and in combination with other hormones, on ovarian growth of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, during vitellogenesis. *General and Comparative Endocrinology* 125, 34–40.
- Roer, R., Dillaman, R., 1984.** The structure and calcification of the crustacean cuticle. *American Zoologist* 24, 893–909.

Rollin, M., Coulaud, R., Danger, M., Sohm, B., Flayac, J., Bec, A., Chaumot, A., Geffard, O., Felten, V., 2018. Additive effect of calcium depletion and low resource quality on *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda) life history traits. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 11264–11280.

Rollin, M., Coulaud, R., Rocher, B., Dufлот, A., Poret, A., Le Foll, F., Xuereb, B., 2021. N-acetyl- β -d-glucosaminidase activity in *Palaemon serratus*-Methodological optimisation and intrinsic variability. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 256, 110932.

Romano, P., Fabritius, H., Raabe, D., 2007. The exoskeleton of the lobster *Homarus americanus* as an example of a smart anisotropic biological material. *Acta Biomaterialia* 3, 301–309.

Rowe, C.L., 2002. Differences in maintenance energy expenditure by two estuarine shrimp (*Palaemonetes pugio* and *P. vulgaris*) that may permit partitioning of habitats by salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 132, 341–351.

Rukke, N.A., 2002. Effects of low calcium concentrations on two common freshwater crustaceans, *Gammarus lacustris* and *Astacus astacus*. *Functional Ecology* 16, 357–366.

Sachs, C., Fabritius, H., Raabe, D., 2006. Experimental investigation of the elastic–plastic deformation of mineralized lobster cuticle by digital image correlation. *Journal of structural biology* 155, 409–425.

Salma, U., Uddowla, M.H., Kim, M., Kim, J.M., Kim, B.K., Baek, H.-J., Park, H., Mykles, D.L., Kim, H.-W., 2012. Five hepatopancreatic and one epidermal chitinases from a pandalid shrimp (*Pandalopsis japonica*): cloning and effects of eyestalk ablation on gene expression. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 161, 197–207.

Samuelsen, O.B., Lunestad, B.T., Farestveit, E., Grefsrud, E.S., Hannisdal, R., Holmelid, B., Tjensvoll, T., Agnalt, A.-L., 2014. Mortality and deformities in European lobster (*Homarus gammarus*) juveniles exposed to the anti-parasitic drug teflubenzuron. *Aquatic Toxicology* 149, 8–15.

Samuelsen, O.B., Parsons, A.E., Agnalt, A.-L., Tjensvoll, T., Lunestad, B.T., Hannisdal, R., 2020. Mortality in the rockpool shrimp *Palaemon elegans* following long-term exposure to

low doses of the anti-parasitic drug teflubenzuron. *Aquaculture Environment Interactions* 12, 23–29.

Sancho, E., Banegas, S., Villarroel, M.J., Ferrando, D., 2018. Impaired reproduction and individual growth of the water flea *Daphnia magna* as consequence of exposure to the non-ester pyrethroid etofenprox. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 6209–6217.

Sastri, A.R., Juneau, P., Beisner, B.E., 2013. Evaluation of chitobiase-based estimates of biomass and production rates for developing freshwater crustacean zooplankton communities. *Journal of plankton research* 35, 407–420.

Sastri, A.R., Roff, J.C., 2000. Rate of chitobiase degradation as a measure of development rate in planktonic Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57, 1965–1968.

Satapornvanit, K., Baird, D.J., Little, D.C., 2009. Laboratory toxicity test and post-exposure feeding inhibition using the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Chemosphere* 74, 1209–1215.

Schaffmeister, B.E., Hiddink, J.G., Wolff, W.J., 2006. Habitat use of shrimps in the intertidal and shallow subtidal seagrass beds of the tropical Banc d’Arguin, Mauritania. *Journal of Sea Research* 55, 230–243.

Schimmel, S.C., Patrick, J.M., Wilson, A.J., 1977. Acute toxicity to and bioconcentration of endosulfan by estuarine animals, in: *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*. ASTM International.

Schram, F.R., 2013. Comments on crustacean biodiversity and disparity of body plans. *Functional Morphology and Diversity, The Natural History of Crustacea* 1, 1–33.

Schultz, T.W., Freeman, S.R., Dumont, J.N., 1980. Uptake, depuration, and distribution of selenium in *Daphnia* and its effects on survival and ultrastructure. *Archives of environmental contamination and toxicology* 9, 23–40.

Scott, G.I., Baughman, D.S., Trim, A.H., Dee, J.C., 1987. Lethal and sublethal effects of insecticides commonly found in nonpoint source agricultural runoff to estuarine fish and shellfish.

Scott-Fordsmand, J.J., Depledge, M.H., 1993. The influence of starvation and copper exposure on the composition of the dorsal carapace and distribution of trace metals in the shore

crab *Carcinus maenas* (L.). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology 106, 537–543.

Shahidi, F., Synowiecki, J., 1991. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. Journal of agricultural and food chemistry 39, 1527–1532.

Shealy, M.H., Sandifer, P.A., 1975. Effects of mercury on survival and development of the larval grass shrimp *Palaemonetes vulgaris*. Marine Biology 33, 7–16.

Shechter, A., Berman, A., Singer, A., Freiman, A., Grinstein, M., Erez, J., Aflalo, E.D., Sagi, A., 2008. Reciprocal Changes in Calcification of the Gastrolith and Cuticle During the Molt Cycle of the Red Claw Crayfish *Cherax quadricarinatus*. The Biological Bulletin 214, 122–134.

Shelton, P.M.J., Truby, P.R., Shelton, R.G.J., 1981. Naturally occurring abnormalities (Bruchdreifachbildungen) in the chelae of three species of Crustacea (Decapoda) and a possible explanation.

Shin, C.-S., Kim, D.-Y., Shin, W.-S., 2019. Characterization of chitosan extracted from Mealworm Beetle (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*) and Rhinoceros Beetle (*Allomyrina dichotoma*) and their antibacterial activities. International Journal of Biological Macromolecules 125, 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.242>

Shock, B.C., Foran, C.M., Stueckle, T.A., 2009. Effects of salinity stress on survival, metabolism, limb regeneration, and ecdysis in *Uca pugnax*. Journal of Crustacean Biology 29, 293–301.

Silhacek, D.L., Oberlander, H., Porcheron, P., 1990. Action of RH 5849, a non-steroidal ecdysteroid mimic, on *Plodia interpunctella* (Hübner) *in vivo* and *in vitro*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 15, 201–212.

Silva, C., Oliveira, C., Gravato, C., Almeida, J.R., 2013. Behaviour and biomarkers as tools to assess the acute toxicity of benzo (a) pyrene in the common prawn *Palaemon serratus*. Marine environmental research 90, 39–46.

Sire, A., Amouroux, I., 2016. Détermination de Valeurs Guides Environnementales (VGE) mollusques alternatives aux Normes de Qualité Environnementale (NQE) définies dans la DCE.

Skinner, D.M., 1962. The structure and metabolism of a crustacean integumentary tissue during a molt cycle. *The Biological Bulletin* 123, 635–647.

Skinner, D.M., 1985. Interacting factors in the control of the crustacean molt cycle. *American Zoologist* 25, 275–284.

Skinner, D.M., Kumari, S.S., O'brien, J.J., 1992. Proteins of the crustacean exoskeleton. *American Zoologist* 32, 470–484.

Smith, D.L., 1990. Patterns of limb loss in the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun, and the effects of autotomy on growth. *Bulletin of Marine Science* 46, 23–36.

Snyder, M.J., Mulder, E.P., 2001. Environmental endocrine disruption in decapod crustacean larvae: hormone titers, cytochrome P450, and stress protein responses to heptachlor exposure. *Aquatic toxicology* 55, 177–190.

Soegianto, A., Charmantier-Daures, M., Trilles, J.-P., Charmantier, G., 1999. Impact of cadmium on the structure of gills and epipodites of the shrimp *Penaeus japonicas* (Crustacea: Decapoda). *Aquatic Living Resources* 12, 57–70.

Soin, T., Verslycke, T., Janssen, C., Smagghe, G., 2009. Ecdysteroids and their importance in endocrine disruption research, in: *Ecdysone: Structures and Functions*. Springer, pp. 539–549.

Sollaud, E., 1912. Les métamorphoses du "Bouquet", *Leander serratus* Pennant. Gauthier-Villars.

Sollaud, E., 1916. Recherches sur la bionomie des "Palémonides" des côtes de France. Gauthier-Villars.

Song, Y., Villeneuve, D.L., Toyota, K., Iguchi, T., Tollefsen, K.E., 2017a. Ecdysone receptor agonism leading to lethal molting disruption in arthropods: review and adverse outcome pathway development. *Environmental science & technology* 51, 4142–4157.

Song, Y., Evenseth, L.M., Iguchi, T., Tollefsen, K.E., 2017b. Release of chitinase as an indicator of potential molting disruption in juvenile *Daphnia magna* exposed to the ecdysone receptor agonist 20-hydroxyecdysone. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 80, 954–962.

Soumoff, C., O'Connor, J.D., 1982. Repression of Y-organ secretory activity by molt inhibiting hormone in the crab *Pachygrapsus crassipes*. General and comparative endocrinology 48, 432–439.

Soumoff, C., Skinner, D.M., 1983. Ecdysteroid titers during the molt cycle of the blue crab resemble those of other Crustacea. The Biological Bulletin 165, 321–329.

Spindler, K.-D., 1976. Initial characterization of chitinase and chitobiase from the integument of *Drosophila hydei*. Insect Biochemistry 6, 663–667.

Spindler, K.-D., Van Wormhoudt, A., Sellos, D., Spindler-Barth, M., 1987. Ecdysteroid levels during embryogenesis in the shrimp, *Palaemon serratus* (Crustacea Decapoda): Quantitative and qualitative changes. General and comparative endocrinology 66, 116–122.

Spindler, K.-D., Buchholz, F., 1988. Partial characterization of chitin degrading enzymes from two euphausiids, *Euphausia superba* and *Meganyctiphanes norvegica*. Polar Biology 9, 115–122.

Spindler, K.-D., Funke-Höpfner, B., 1991. N-Acetyl- β -D-hexosaminidases of the Brine Shrimp *Artemia*: Partial Purification and Characterization. Zeitschrift für Naturforschung C 46, 781–788.

Spindler-Barth, M., Van Wormhoudt, A., Spindler, K.-D., 1990. Chitinolytic enzymes in the integument and midgut-gland of the shrimp *Palaemon serratus* during the moulting cycle. Marine Biology 106, 49–52.

Stalin, A., Suganthi, P., Mathivani, S., Broos, K.V., Gokula, V., HE, S.M., Singhal, R.K., Venu-Babu, P., 2019. Effect of cobalt-60 gamma radiation on reproductive disturbance in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). Toxicology Reports 6, 1143–1147.

Stankiewicz, B.A., Mastalerz, M., Hof, C.H., Bierstedt, A., Flannery, M.B., Briggs, D.E., Evershed, R.P., 1998. Biodegradation of the chitin-protein complex in crustacean cuticle. Organic Geochemistry 28, 67–76.

Stevenson, J.R., Bliss, D.E., Mantel, L.H., 1985. Dynamics of the integument. The biology of Crustacea 9, 1–42.

- Štrus, J., Compere, P., 1996.** Ultrastructural analysis of the integument during the moult cycle in *Ligia italica* (Crustacea, Isopoda). *Pflügers Arch.* 431, R251–R252. <https://doi.org/10.1007/BF02346363>
- Stuart, B.H., 2004.** Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. John Wiley & Sons.
- Subramoniam, T., 2016.** Sexual biology and reproduction in crustaceans. Academic Press.
- Sumiya, E., Ogino, Y., Toyota, K., Miyakawa, H., Miyagawa, S., Iguchi, T., 2016.** Neverland regulates embryonic moltings through the regulation of ecdysteroid synthesis in the water flea *Daphnia magna*, and may thus act as a target for chemical disruption of molting. *Journal of Applied Toxicology* 36, 1476–1485.
- Sunda, W.G., Engel, D.W., Thuotte, R.M., 1978.** Effect of chemical speciation on toxicity of cadmium to grass shrimp, *Palaemonetes pugio*: importance of free cadmium ion. *Environmental Science & Technology* 12, 409–413.
- Sung, H.-H., Kao, W.-Y., Su, Y.-J., 2003.** Effects and toxicity of phthalate esters to hemocytes of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquatic Toxicology* 64, 25–37.
- Sung, H.-H., Ye, Y.-Z., 2009.** Effect of nonylphenol on giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) via oral treatment: Toxicity and messenger RNA expression of hemocyte genes. *Aquatic toxicology* 91, 270–277.
- Synowiecki, J., Al-Khateeb, N.A., 2003.** Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives.
- Tamone, S.L., Adams, M.M., Dutton, J.M., 2005.** Effect of eyestalk-ablation on circulating ecdysteroids in hemolymph of snow crabs, *Chionoecetes opilio*: physiological evidence for a terminal molt. *Integrative and Comparative Biology* 45, 166–171.
- Tao, J., 2013.** Chapter Twenty-Two - FTIR and Raman Studies of Structure and Bonding in Mineral and Organic–Mineral Composites, in: De Yoreo, J.J. (Ed.), *Methods in Enzymology, Research Methods in Biomineralization Science*. Academic Press, pp. 533–556.
- Tarazona, J.V., Sobanska, M.A., Cesnaitis, R., Sobanski, T., Bonnomet, V., Versonnen, B., De Coen, W., 2014.** Analysis of the ecotoxicity data submitted within the framework of the REACH Regulation. Part 2. Experimental aquatic toxicity assays. *Science of the total environment* 472, 137–145.

- Taylor, D., 1983.** The significance of the accumulation of cadmium by aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 7, 33–42.
- Taylor, A.C., Spicer, J.I., 1987.** Metabolic responses of the prawns *Palaemon elegans* and *P. serratus* (Crustacea: Decapoda) to acute hypoxia and anoxia. *Marine Biology* 95, 521–530.
- Taylor, L.J., Mann, N.S., Daoud, D., Clark, K.F., van den Heuvel, M.R., Greenwood, S.J., 2019.** Effects of sublethal chlorpyrifos exposure on postlarval American lobster (*Homarus americanus*). *Environmental toxicology and chemistry* 38, 1294–1301.
- Techa, S., Chung, J.S., 2015.** Ecdysteroids regulate the levels of molt-inhibiting hormone (MIH) expression in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *PLoS One* 10, e0117278.
- Toumi, H., Boumaiza, M., Millet, M., Radetski, C.M., Felten, V., Fouque, C., Férard, J.F., 2013.** Effects of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on growth, reproduction, embryonic development and sex differentiation in two strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). *Science of the total Environment* 458, 47–53.
- Travis, D.F., 1954.** The molting cycle of the spiny lobster, *Panulirus argus* Latreille. I. Molting and growth in laboratory-maintained individuals. *The Biological Bulletin* 107, 433–450.
- Travis, O.F., 1955.** The molting cycle of the spiny lobster, *Panulirus argus* Latreille. II. Pre-ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues. *The Biological Bulletin* 108, 88–112.
- Travis, D.F., Friberg, U., 1963.** The deposition of skeletal structures in the crustacea: Vi. Microradiographic studies of the exoskeleton of the crayfish *Orconectes virilis* Hagen. *Journal of ultrastructure research* 9, 285–301.
- Tsirilakis, K., Kim, C., Vicencio, A.G., Andrade, C., Casadevall, A., Goldman, D.L., 2012.** Methylxanthine inhibit fungal chitinases and exhibit antifungal activity. *Mycopathologia* 173, 83–91.
- Tuberty, S.R., McKenney Jr, C.L., 2005.** Ecdysteroid responses of estuarine crustaceans exposed through complete larval development to juvenile hormone agonist insecticides. *Integrative and comparative biology* 45, 106–117.
- Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F., 1985.** Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. *Biometrics* 295–301.

- Vacca, L.L., Fingerman, M., 1975.** The mechanism of tanning in the fiddler crab, *Uca pugilator*—II. The cyclic appearance of tanning agents and attached carrier proteins in the blood during the molting cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 51, 483–487.
- Van Handel, E., 1985a.** Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc* 1(3), 299–301.
- Van Handel, E., 1985b.** Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 1, 302–304.
- Vega, F.J., Dávila-Alcocer, V.M., Filkorn, H.F., 2005.** Characterization of cuticle structure in Late Cretaceous and Early Tertiary decapod Crustacea from Mexico. *Bulletin of the Mizunami Fossil Museum* 32.
- Verslycke, T.A., Fockedey, N., McKenney Jr, C.L., Roast, S.D., Jones, M.B., Mees, J., Janssen, C.R., 2004.** Mysid crustaceans as potential test organisms for the evaluation of environmental endocrine disruption: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 23, 1219–1234.
- Vigh, D.A., Dendinger, J.E., 1982.** Temporal relationships of postmolt deposition of calcium, magnesium, chitin and protein in the cuticle of the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 72, 365–369.
- Volz, D.C., Wirth, E.F., Fulton, M.H., Scott, G.I., Block, D.S., Chandler, G.T., 2002.** Endocrine-mediated effects of UV-A irradiation on grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) reproduction. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 133, 419–434.
- Von der Ohe, P.C., Liess, M., 2004.** Relative sensitivity distribution of aquatic invertebrates to organic and metal compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 23, 150–156.
- Vrinda, S., Abdulaziz, A., Abhilash, K.S., Jasmin, C., Kripa, V., Singh, I.B., 2019.** Neuroendocrine and immunotoxicity of polyaromatic hydrocarbon, chrysene in crustacean post larvae. *Ecotoxicology* 28, 964–972.

- Waddy, S.L., Merritt, V.A., Hamilton-Gibson, M.N., Aiken, D.E., Burridge, L.E., 2007.** Relationship between dose of emamectin benzoate and molting response of ovigerous American lobsters (*Homarus americanus*). *Ecotoxicology and environmental safety* 67, 95–99.
- Wall, V.D., Alberts, J.J., Moore, D.J., Newell, S.Y., Pattanayek, M., Pennings, S.C., 2001.** The effect of mercury and PCBs on organisms from lower trophic levels of a Georgia salt marsh. *Archives of environmental contamination and toxicology* 40, 10–17.
- Wang, S.Y., Stickle, W.B., 1987.** Bioenergetics, growth and molting of the blue crab, *Callinectes sapidus*, exposed to the water-soluble fraction of South Louisiana crude oil. *Pollution physiology of estuarine organisms* 107–126.
- Wang, W.-N., Wang, A.-L., Wang, D.-M., Wang, L.-P., Liu, Y., Sun, R.-Y., 2003.** Calcium, phosphorus and adenylate levels and Na⁺–K⁺-ATPase activities of prawn, *Macrobrachium nipponense*, during the moult cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 134, 297–305.
- Wang, Y., Chang, Y., Yu, L., Zhang, C., Xu, X., Xue, Y., Li, Z., Xue, C., 2013.** Crystalline structure and thermal property characterization of chitin from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Carbohydrate polymers* 92, 90–97.
- Waterman, T.H., Chace Jr, F.A., 1960.** General crustacean biology. The physiology of Crustacea 1, 1–33.
- Waugh, D.A., Feldmann, R.M., Burrell, J.L., Hull, A.L., Hein, K., Schweitzer, C.E., 2009.** Ontogenetic variations in cuticle morphology in the blue crab *Callinectes sapidus*. *Journal of Crustacean Biology* 29, 141–156.
- Weis, J.S., 1976a.** Effects of mercury, cadmium, and lead salts on regeneration and ecdysis in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Fish. Bull. (United States)* 74.
- Weis, J.S., 1976b.** Effects of environmental factors on regeneration and molting in fiddler crabs. *The Biological Bulletin* 150, 152–162.
- Weis, J.S., Mantel, L.H., 1976.** DDT as an accelerator of limb regeneration and molting in fiddler crabs. *Estuarine and Coastal Marine Science* 4, 461–466.
- Weis, J.S., Donellon, N., Barnwell, F.H., 1986.** Regeneration of tubercles on the limbs of *Uca pugilator* and effects of mercury and cadmium on their growth. *Journal of crustacean biology* 6, 648–651.

- Weis, J.S., Cristini, A., Ranga Rao, K., 1992.** Effects of pollutants on molting and regeneration in Crustacea. *American Zoologist* 32, 495–500.
- Weis, J.S., Smith, G., Santiago-Bass, C., 2000.** Predator/prey interactions: a link between the individual level and both higher and lower level effects of toxicants in aquatic ecosystems. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 7, 145–153.
- Weiss, R., Torrecilla, Z., González-Ortegón, E., González-Tizón, A.M., Martínez-Lage, A., Schubart, C.D., 2018.** Genetic differentiation between Mediterranean and Atlantic populations of the common prawn *Palaemon serratus* (Crustacea: Palaemonidae) reveals uncommon phylogeographic break. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 98, 1425–1434.
- Wheatly, M.G., 1999.** Calcium homeostasis in Crustacea: the evolving role of branchial, renal, digestive and hypodermal epithelia. *Journal of experimental zoology* 283, 620–640.
- White, S.L., Rainbow, P.S., 1986.** Accumulation of cadmium by *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda). *Mar. Ecol. Prog. Ser* 32, 17–25.
- Wickins, J.F., 1972.** The food value of Brine Shrimp, *Artemia salina* L., to larvae of the prawn, *Palaemon serratus* Pennant. *Journal of experimental marine biology and ecology* 10, 151–170.
- Wilder, M.N., Jasmani, S., Jayasankar, V., Kaneko, T., Aida, K., Hatta, T., Nemoto, S., Wigginton, A., 2009.** Hemolymph osmolality, ion concentrations and calcium in the structural organization of the cuticle of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: changes with the molt cycle. *Aquaculture* 292, 104–110.
- Williams, C.L., Dillaman, R.M., Elliott, E.A., Gay, D.M., 2003.** Formation of the arthrodistal membrane in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Journal of morphology* 256, 260–269.
- Williams, L., 2012.** The effects of river sediment, endosulfan, and moderate hypoxia on blue crabs (*Callinectes sapidus*) from the tidal, freshwater James River.
- Wilson, J.E.H., Costlow, J.D., 1987.** Acute toxicity of diflubenzuron (DFB) to various life stages of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Water, Air, and Soil Pollution* 33, 411–417.
- Wirth, E.F., Fulton, M.H., Chandler, G.T., Key, P.B., Scott, G.I., 1998.** Toxicity of sediment associated PAHs to the estuarine crustaceans, *Palaemonetes pugio* and *Amphiascus tenuiremis*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 61, 637–644.

Wirth, E.F., Lund, S.A., Fulton, M.H., Scott, G.I., 2002. Reproductive alterations in adult grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, following sublethal, chronic endosulfan exposure. *Aquatic toxicology* 59, 93–99.

Wirth, E.F., Pennington, P.L., Lawton, J.C., DeLorenzo, M.E., Bearden, D., Shaddrix, B., Sivertsen, S., Fulton, M.H., 2004. The effects of the contemporary-use insecticide (fipronil) in an estuarine mesocosm. *Environmental Pollution* 131, 365–371.

Wu, J.P., Chen, H.-C., 2004. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chemosphere* 57, 1591–1598.

Xiang, F., Yang, W., Yang, Z., Chen, Y., 2011. Concentration–response function of nitrite on survival, molting, and reproduction of *Daphnia similoides*. *Journal of Freshwater Ecology* 26, 33–41.

Xie, X.-L., Chen, Q.-X., 2004. Inactivation kinetics of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*) in dioxane solution. *Biochemistry (Moscow)* 69, 1365–1371.

Xie, X.-L., Chen, Q.-X., Lin, J.-C., Wang, Y., 2004. Purification and some properties of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*). *Marine Biology* 146, 143–148.

Xie, X.-L., Chen, Q.-X., Gong, M., Wang, Q., Shi, Y., 2005. Inactivation kinetics of guanidinium chloride on *Penaeus vannamei* β -N-acetyl-D-glucosaminidase and the relationship of enzyme activity and its conformation. *The protein journal* 24, 267–273.

Xie, X.-L., Gong, M., Chen, Q.-X., 2006. Inhibition kinetics of hydrogen peroxide on β -N-acetyl-D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*). *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 21, 55–60.

Xie, X.-L., Du, J., Huang, Q.-S., Shi, Y., Chen, Q.-X., 2007. Inhibitory kinetics of bromacetic acid on β -N-acetyl-d-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*). *International journal of biological macromolecules* 41, 308–313.

Xie, X., Huang, Q., Wei, X., Du, J., Wang, Y., Ke, C., Chen, Q., 2009a. Effects of commonly used disinfection drugs on the activity of NAGase in *Penaeus vannamei*. *水生生态学杂志* 2, 108–111.

- Xie, X., Huang, Q., Wei, X., Du, J., Wang, Y., Ke, C., Chen, Q., 2009b.** The Effects of Some Aquacultural Disinfectors on the Activity of NAGase from Prawn (*Litopenaeus vannamei*). Journal of Hydroecology.
- Xie, X.-L., Hu, Y.-H., Wang, L.-L., Chen, C.-Q., Huang, Q.-S., Zhou, H.-T., Chen, Q.-X., 2010a.** Inhibitory kinetics of citric acid on β -N-acetyl-d-glucosaminidase from prawn (*Litopenaeus vannamei*). Fish & shellfish immunology 29, 674–678.
- Xie, X.-L., Zhou, H.-T., Huang, Q.-S., Wei, X.-Q., Wang, Y., Yan, J.-H., Chen, Q.-X., 2010b.** Inhibitory Kinetics of Betaine on β -N-Acetyl-d-glucosaminidase from Prawn (*Litopenaeus vannamei*). Journal of agricultural and food chemistry 58, 3820–3824.
- Xuereb, B., Lefèvre, E., Garric, J., Geffard, O., 2009.** Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): linking AChE inhibition and behavioural alteration. Aquatic Toxicology 94, 114–122.
- Yagi, H., Ceccaldi, H.J., 1984.** Influence combinée des facteurs température et salinité sur la métamorphose et la croissance larvaire de la crevette rose *Palaemon serratus* (Pennant) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae). Aquaculture 37, 73–85.
- Yagi, H., Ceccaldi, H.J., 1985.** Rôle de la température et de la salinité sur la mue, la métamorphose et la croissance à chaque stade larvaire de *Palaemon serratus* (Pennant) (Palaemonidae, Decapoda, Crustacea), in: Annales de l'Institut Océanographique (Monaco). pp. 75–93.
- Yang, J.-L., 2014.** Comparative acute toxicity of gallium (III), antimony (III), indium (III), cadmium (II), and copper (II) on freshwater swamp shrimp (*Macrobrachium nipponense*). Biological Research 47, 1–4.
- Yang, Z., Zhao, Y., Zhou, Z., Yang, J., 2006.** Effects of water CuSO₄ concentration on molting, growth and survival of *Eriocheir sinensis*. Acta Hydrobiologica Sinica 30, 569.
- Yang, Z., Zhao, Y., Li, N., Yang, J., Hua, X., 2008.** Effects of water-borne copper on the Y-organ and content of 20-hydroxyecdysone in *Eriocheir sinensis*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 54, 69–74.
- Zambrano, R., 2017.** First record of malformations in males of *Ucides occidentalis* (Brachyura, Ocypodidae) in the Gulf of Guayaquil, Ecuador. Crustaceana 90, 631–638.

Zanotto, F.P., Wheatly, M.G., 2002. Calcium balance in crustaceans: nutritional aspects of physiological regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 133, 645–660.

Zhang, J.-P., Chen, Q.-X., Wang, Q., Xie, J.-J., 2006. Purification and some properties of β -N-Acetyl-D-glucosaminidase from viscera of green crab (*Scylla serrata*). *Biochemistry (Moscow)* 71, S55–S59.

Zhang, J.-P., Hu, Y.-H., Wang, Q., Wang, W., Wang, Y., Yan, J.-H., Chen, Q.-X., 2010. Inhibitory kinetics of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from green crab (*Scylla serrata*) by zinc ion. *Journal of agricultural and food chemistry* 58, 8763–8767.

Zhang, S., Jiang, S., Xiong, Y., Fu, H., Sun, S., Qiao, H., Zhang, W., Jiang, F., Jin, S., Gong, Y., 2014. Six chitinases from oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*: cDNA characterization, classification and mRNA expression during post-embryonic development and moulting cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 167, 30–40.

Zhao, D., Huang, W.-C., Guo, N., Zhang, S., Xue, C., Mao, X., 2019. Two-step separation of chitin from shrimp shells using citric acid and deep eutectic solvents with the assistance of microwave. *Polymers* 11, 409.

Zhou, F., Wu, Z., Wang, M., Chen, K., 2010. Structure and mechanical properties of pincers of lobster (*Procambarus clarkii*) and crab (*Eriocheir Sinensis*). *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 3, 454–463.

Zielkowski, R., Spindler, K.-D., 1978. Chitinase and chitobiase from the integument of *Locusta migratoria*: characterization and titer during the fifth larval instar. *Insect Biochemistry* 8, 67–71.

Zou, E., Fingerman, M., 1997. Effects of estrogenic xenobiotics on molting of the water flea *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 38(3), 281–285.

Zou, E., Fingerman, M., 1999a. Chitobiase activity in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab *Uca pugilator* during the molting cycle. *Marine Biology* 133, 97–101.

Zou, E., Fingerman, M., 1999b. Effects of exposure to diethyl phthalate, 4-(tert)-octylphenol, and 2, 4, 5-trichlorobiphenyl on activity of chitobiase in the epidermis and hepatopancreas of

the fiddler crab, *Uca pugilator*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology 122, 115–120.

Zou, E., Fingerman, M., 1999c. Effects of estrogenic agents on chitinase activity in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca pugilator*. Ecotoxicology and environmental safety 42, 185–190.

Zou, E., Fingerman, M., 1999d. Patterns of N-acetyl- β -glucosaminidase isoenzymes in the epidermis and hepatopancreas and induction of N-acetyl- β -glucosaminidase activity by 20-hydroxyecdysone in the fiddler crab, *Uca pugilator*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology 124, 345–349.

Zou, E., Bonvillain, R., 2004. Chitinase activity in the epidermis of the fiddler crab, *Uca pugilator*, as an *in vivo* screen for molt-interfering xenobiotics. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 139, 225–230.

Zou, E., 2005. Impacts of xenobiotics on crustacean molting: the invisible endocrine disruption. Integrative and Comparative Biology 45, 33–38.

Zou, E., 2009. Effects of Hypoxia and Sedimentary Naphthalene on the Activity of N-acetyl- β -Glucosaminidase in the Epidermis of the Brown Shrimp, *Penaeus aztecus*. Bulletin of environmental contamination and toxicology 82, 579–582.

Zou, E., 2020. Invisible endocrine disruption and its mechanisms: A current review. General and comparative endocrinology 293, 113470.

杜娟 D., 安刚, 谢晓兰, 黄乾生, 王烨, 陈清西, 2008. Commonly used antibacterial drugs for breeding on the shell membrane of *Penaeus vannamei* Effect of N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity. 厦门大学学报: 自然科学版 47, 883–886.

杨学敏 Y., 谢进金, 张继平, 林建成, 陈清西, 2006. Effect of metal ions on the activity of NAGase. 台湾海峡 25, 343–347.

谢晓兰, 王悦, 陈清西, 2006b. Effects of amino acids on N-acetyl-B-D-glucosaminidase activity of *Penaeus vannamei*.

林建城 L., 王悦, 谢晓兰, 龚敏, 陈清西, 2005. Effects of metal ions on activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase from prawn (*Penaeus vannamei*). 台湾海峡 24, 78–82.

潘小芳 P., 谢晓兰 X., 徐海金 X., 赖志青 L., 2006. Effect of organic solvents on the activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase from *Tenebrio molitor*. 宁德师专学报: 自然科学版 18, 352–356.

潘小芳 P., 汪荣峰, 黄金敏, 2007. Effect of metal ions on the activity of *Tenebrio molitor* NAGase. 泉州师范学院学报 25, 113–117.

潘小芳, 谢晓兰, 肖淑铃, 2007. Effects of Some Vitamins on the Activity of NAGase from Yellow Mealworm. 莆田学院学报 14, 51–53.

王悦 W., 谢晓兰 X., 王勤 W., 陈清西 C., 2004. Effect of Ethanol on Activity and Conformation of β -N-Acetyl-D-glucosaminidase from Prawn (*Penaeus vannamei*). 厦门大学学报 (自然科学版).

颜雅雯 Y., 张继平 Z., 王勤 W., 谢进金 X., 陈清西 C., 2007. Effects of fungus drugs on the activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase of Saw-saw crab. 台湾海峡 26, 231–235.

谢晓兰, 黄乾生, 魏晓倩, 杜娟, 王烨, 柯才焕, 陈清西, 2009. Effects of commonly used disinfection drugs on the activity of NAGase in *Penaeus vannamei*. 水生态学杂志 2, 108–111.

Annexes

Annexe 1 Liste non exhaustive des études mesurant des marqueurs sub-individuels au laboratoire en utilisant les crevettes Palaemonidae.

Marqueurs	Contaminants	Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Circulation hémocytaire GST SOD ATP	Ammoniaque	0-0,9-2 nmol.L ⁻¹	72 h	Hémocytes : Baisse de mobilité dose dépendante SOD, ATP : Hausse d'activité dose dépendante GST : Aucun effet	<i>M. amazonicum</i>	Pinto et al. 2016
SOD CAT GST	Fraction soluble de pétrole	0,6 mg.L ⁻¹	168 h	Hausse d'activité	<i>M. borellii</i>	Lavarias et al. 2011
SOD CAT GST	Fenitrothion	0 à 1,4 µg.L ⁻¹	168 h	Hausse d'activité selon la dose et le temps d'exposition	<i>M. borellii</i>	Lavarias et al. 2013
Total protéines	Tributhyl étain	0,09 à 0,33 ppm	96 h	Baisse du total au niveau des ovaires, hépatopancréas, branchies et muscles	<i>M. kistnensis</i>	Kharat et al. 2009
Réponse immunitaire	Phtalate	1 µg.µL ⁻¹	8 j	Baisse du total hémocytaire à 4 jours Baisse du taux granulocytes/hyalinocytes à 1 et 4 jours	<i>M. rosenbergii</i>	Chen & Sung, 2005
Expression génique hémocytaire	Nonylphénol	100 µg par nourrissage	9 j	Hausse de l'expression génique durant les premiers jours puis retour au niveau contrôle à 9 jours	<i>M. rosenbergii</i>	Sung & Ye 2009
Adhésion hémocytaires Viabilité cellulaire	Phtalates	100 mg.L ⁻¹	10 h	Hémocytes : Baisse du niveau d'adhésion pour chaque phtalate Viabilité : Hausse de mortalité cellulaire	<i>M. rosenbergii</i>	Sung et al. 2003
Peroxydase AChE	Endosulfan	0,01 à 18,62 µg.L ⁻¹	96 h	Péroxydase : Baisse d'activité à moyenne dose puis hausse d'activité à plus haute dose AChE : Baisse de l'activité dose/dépendante	<i>M. rosenbergii</i> (juvéniles)	Dai et al. 2014
GP AChE	Endosulfan	0,01 à 14,97 µg.L ⁻¹	96 h	GP : Baisse de l'activité dose/dépendante AChE : Baisse de l'activité dose/dépendante	<i>M. rosenbergii</i> (adultes)	Dai et al. 2014

Marqueurs	Contaminants	Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Osmorégulation	Pétrole brut	200 ppb	34 j	Baisse d'osmolalité hémolympatique	<i>P. adspersus</i>	Baden <i>et al.</i> 1982
Accumulation dans l'exosquelette MT	Zinc	0 à 500 µg.L ⁻¹	96 h	Accumulation efficiente à plus haute dose Hausse du niveau de MT à la plus forte dose	<i>P. argentinus</i>	Bertrand <i>et al.</i> 2015
MT	Cadmium	individus tolérants : 0 à 12,26 µg.L ⁻¹ individus non-tolérants : 0 à 3,06 µg.L ⁻¹	15 j	Hausse du niveau de MT selon la dose Hausse du niveau plus important chez individus non tolérants	<i>P. argentinus</i>	Boudet <i>et al.</i> 2019
GST CAT	Cyanotoxines	NA	28 j	Hausse d'expression quand cyanotoxines présentes	<i>P. argentinus</i>	Galanti <i>et al.</i> 2013
ACHÉ SOD CAT GST	Fenitrothion	0 à 0,9 µg.L ⁻¹	96 h	ACHÉ : Baisse d'activité dose dépendante SOD: Hausse d'activité à la dose la plus faible GST + CAT : Hausse d'activité dose dépendante	<i>P. argentinus</i>	Lavarias & Garcia, 2015
Circulation hémocytaire	Métaux lourds	NA	96 h	Baisse d'hémocytes circulants jusqu'à 24h, puis restauration du niveau de 24 à 96h	<i>P. elegans</i>	Lorenzon <i>et al.</i> 2011
HSP Ubiquitine	Stress thermique	20 à 32°C	NA	HSP : Aucun effet Ubiquitine : Hausse d'activité selon la température	<i>P. elegans</i>	Madeira <i>et al.</i> 2015

Marqueurs	Contaminants	Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Respiration Excrétion	Oxyde de graphène	0 à 4 mg.L ⁻¹		Hausse de respiration à dose intermédiaire puis baisse à dose maximale Baisse d'excrétion aux doses les plus fortes		
	Cadmium	0 à 0,05 mg.L ⁻¹	2 h	Hausse de respiration à dose intermédiaire puis baisse à dose maximale Baisse d'excrétion dose/dépendante	<i>P. pandaliformis</i>	De Melo <i>et al.</i> 2019a
	Zinc	0 à 4 mg.L ⁻¹		Baisse de respiration dose/dépendante Baisse d'excrétion dose/dépendante		
ACHe	Dichlorvos	0,196 à 50 µg.L ⁻¹	24 h	LOEC : 50 µg/L	<i>P. pugio</i>	Bolton-Warberg <i>et al.</i> 2007
HSP SOD Protéine métabolique Glucigénèse Protéine cuticule	Hypoxie	1,5-8 mg.L ⁻¹	3 j 3 j 7 j 7 j 14 j	Baisse d'expression Hausse d'expression Baisse d'expression Hausse d'expression Hausse d'expression	<i>P. pugio</i>	Brown-Peterson <i>et al.</i> 2008
Lactate	Hypoxie	3 niveaux d'oxygénation	4 h	Hausse du niveau de lactate	<i>P. pugio</i>	Cochran & Burnett, 1996
GP	Fipronil Endosulfan Cadmium	0,2 µg.L ⁻¹ 1 µg.L ⁻¹ 320 µg.L ⁻¹	96 h	Hausse d'expression	<i>P. pugio</i>	Griffitt <i>et al.</i> 2006
MDA GSH CAT	Bifenthrine	0 à 0,016 µg.L ⁻¹	96 h	Aucun effet	<i>P. pugio</i>	Harper <i>et al.</i> 2008

Marqueurs	Contaminants	Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
GSH LPO CHL AChE	Irgarol	0 à 2 mg.L ⁻¹	96 h	GSH : Aucun effet MDA : Hausse d'activité aux plus hautes doses CHL : Baisse d'activité à toute dose AChE : Hausse d'activité à la plus haute dose	<i>P. pugio</i>	Key <i>et al.</i> 2009
GSH LPO CHL AChE	Simvastatin	0-1 mg.L ⁻¹	96 h	GSH : Aucun effet MDA : Hausse d'activité aux doses extrêmes CHL : Baisse d'activité à la plus haute dose AChE : Aucun effet	<i>P. pugio</i>	Key <i>et al.</i> 2008
Génotoxicité	Résidus de combustion de charbon	NA	156 j	Hausse de génotoxicité	<i>P. pugio</i>	Kuzmick <i>et al.</i> 2007
Ecdystéroïdes	Dispersant Accell Clean Dispersant PES51	0 à 37 mg.L ⁻¹ 0 à 111 mg.L ⁻¹	96 h	Acell clean : Hausse du niveau d'ecdystéroïdes à la plus haute dose	<i>P. pugio</i> (larves)	Baxter <i>et al.</i> 2018
GSH	Dispersant Accell Clean Dispersant PES51	0 à 111 mg.L ⁻¹ 0 à 111 mg.L ⁻¹	96 h	Acell clean : Hausse de GSH aux plus hautes doses	<i>P. pugio</i> (adultes)	Baxter <i>et al.</i> 2018
AChE Teneur protéique	Carbarl Phosalone	0 à 1000 µg.L ⁻¹	29 j	AChE : Inhibition dose dépendante Teneur protéique : Aucun effet	<i>P. serratus</i>	Bocquené & Galgani, 1991
Genotoxicité	Méthylméthane sulfonate	0 à 100 µmol.L ⁻¹	14 j	Hausse de génotoxicité dose/dépendante	<i>P. serratus</i>	Erraud <i>et al.</i> 2019b
HSP	Pollution sonore	NA	1 h	Hausse d'expression	<i>P. serratus</i>	Filiciotto <i>et al.</i> 2016

Marqueurs	Contaminants	Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
AChE	Organophosphate Carbamate	NA	NA	Inhibition	<i>P. serratus</i>	Frasco <i>et al.</i> 2006
CAT GP AChE	Anthracène	16 à 1024 µg.L ⁻¹	96 h	Hausse d'expression dose dépendante	<i>P. serratus</i>	Gravato <i>et al.</i> 2014
LPO LDH CAT	Naphtalène Pyrène	0,125 à 8 mg.L ⁻¹ 0,006 à 0,4 mg.L ⁻¹	96 h	Naphtalène LPO : hausse selon la dose / LDH : baisse d'activité / CAT : hausse d'activité Pyrène LPO : aucun effet / LDH : baisse d'activité / CAT : aucun effet	<i>P. serratus</i>	Luis & Guilhermino, 2012

Annexe 2 Liste non exhaustive des études mesurant des marqueurs individuels au laboratoire lors d'exposition aiguës en utilisant les crevettes Palaemonidae.

Paramètres biologiques	Contaminants	Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Comportement (locomotion)	Drainage minier acide	NA	NA	Aucun effet à pH neutre Diminution locomotion à pH < 5	<i>M. lanchesteri</i>	Mohti <i>et al.</i> 2012
Comportement (inhibition alimentation)	Profenofos Diméthoate Chlorpyrifos Carbendazim Zinc	3,125 à 50 µg.L ⁻¹ 78,125 à 1250 µg.L ⁻¹ 0,15 à 5 µg.L ⁻¹ 10 à 100 mg.L ⁻¹ 53,1 à 850 µg.L ⁻¹	24 h	24h-CE ₅₀ : 6,02 µg.L ⁻¹ 24h-CE ₅₀ : 269,32 µg.L ⁻¹ 24h-CE ₅₀ : 0,29 µg.L ⁻¹ 24h-CE ₅₀ : > 100 mg.L ⁻¹ 24h-CE ₅₀ : 109,01 µg.L ⁻¹	<i>M. rosenbergii</i>	Satapornvanit <i>et al.</i> 2009
Comportement (locomotion)	Cyperméthrine	0 à 0,025 µg.L ⁻¹	5 min	Effet dose réponse de l'activité natatoire	<i>P. argentinus</i>	Collins & Capello, 2006
Comportement (locomotion)	Hypoxie Anoxie	NA NA	NA	Bref comportement exploratoire puis quiescence	<i>P. elegans</i> <i>P. serratus</i>	Taylor & Spicer 1987
Comportement	Anthracène	16 à 1024 µg.L ⁻¹	96 h	Vélocité de nage diminue avec l'augmentation de la dose	<i>P. serratus</i>	Gravato <i>et al.</i> 2014
Comportement (vélocité nage)	Naphtalène Pyrène	0,125 à 8 mg.L ⁻¹ 0,006 à 0,4 mg.L ⁻¹	/	CE ₅₀ : 1,7 mg.L ⁻¹ LOEC : 0,4 mg.L ⁻¹	<i>P. serratus</i>	Luis & Guilhermino 2012
Comportement (vélocité nage)	Deltaméthrine	NA	NA	LOEC : 0,6 ng.L ⁻¹	<i>P. serratus</i>	Oliveira <i>et al.</i> 2012
Comportement (vélocité nage)	Benzoapyrène	16 à 4096 µg.L ⁻¹	NA	LOEC : 128 µg.L ⁻¹	<i>P. serratus</i>	Silva <i>et al.</i> 2013
Comportement (évitement)	Triclosan	0 à 100 µg.L ⁻¹	0 à 3 h	3h-CE50 système linéaire : 42 µg.L ⁻¹ 3h-CE50 multi habitats : 51 µg.L ⁻¹	<i>P. varians</i>	Araujo <i>et al.</i> 2019

Paramètres biologiques	Contaminants	Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Comportement (évitement)	Crèmes solaires (lotion, gel, spray)	0 à 300 mg.L ⁻¹	0 à 4 h	Augmentation de l'évitement pour la lotion et le gel (pas d'effets doses-réponses stricts)	<i>P. varians</i>	Araujo <i>et al.</i> 2020a
Comportement (évitement)	Cuivre	0 à 120 µg.L ⁻¹	0 à 4 h	4h-CE ₅₀ homogénéisation : 10,4 µg.L ⁻¹ 4h-CE ₅₀ immersion directe : 24,7 µg.L ⁻¹	<i>P. varians</i>	Araujo <i>et al.</i> 2018
Comportement	Galaxolide Tonalide	0 à 50 µg.L ⁻¹	3 h	Evitement augmente avec la dose pour les 2 contaminants	<i>P. varians</i>	Ehiguese <i>et al.</i> 2019
Mortalité	Pétrole brut	0 à 320 mg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 120,23 mg.L ⁻¹	<i>D. trispinosa</i>	Ndimele, 2011
Mortalité	Temephos <i>B. thuringiensis</i> s-Methoprène Pyriproxyfène	0-0,04 ppm 0-250 UT (x 10 ⁶) 0-40 ppm 0-0,5 ppm	96 h	96h-CL ₅₀ : 0,0112 ppm 96h-CL ₅₀ : 60,9 UT 96h-CL ₅₀ : 14,32 ppm 96h-CL ₅₀ : 0,098 ppm	<i>L. tenuicornis</i>	Brown <i>et al.</i> 1996
Mortalité	Temephos <i>B. thuringiensis</i> s-Methoprène Pyriproxyfène	NA	24 h	24h-CL ₉₅ : 0,05 ppm 24h-CL ₉₅ : 1,5x10 ⁶ UT 24h-CL ₉₅ : < 4x10 ⁻⁵ ppm 24h-CL ₉₅ : 51 ppm	<i>L. tenuicornis</i>	Brown <i>et al.</i> 1999
			post larves	96h-CL ₅₀ : 21,14 mg.L ⁻¹		
Mortalité	Ammoniaque		juvéniles	96h-CL ₅₀ : 21,14 mg.L ⁻¹	<i>M. amazonicum</i>	Dutra <i>et al.</i> 2016
			adultes	96h-CL ₅₀ : 36,59 mg.L ⁻¹		

Paramètres biologiques	Contaminants	Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Mortalité	Sulfate de cuivre Sulfate de zinc	NA NA	96 h	96h-CL ₅₀ : 0,247 mg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 3,188 mg.L ⁻¹	<i>M. lamarrei</i>	Murti & Shukla, 1984
Mortalité	Eau usée municipale Eau usée hospitalière	NA	18 h 7 h	18h-CL ₅₀ : 26% 7h-CL ₅₀ : 30 %	<i>M. nipponense</i>	Gerhardt <i>et al.</i> 2002
Mortalité	Gallium (III) Antimoine (III) Indium (III) Cadmium (III) Cuivre (III)	0 à 10 mg.L ⁻¹ 0 à 16 mg.L ⁻¹ 0 à 16 mg.L ⁻¹ 0 à 0,6 mg.L ⁻¹ 0 à 0,6 mg.L ⁻¹	96 h	95h-CL ₅₀ : 2,774 mg.L ⁻¹ 95h-CL ₅₀ : 1,963 mg.L ⁻¹ 95h-CL ₅₀ : 6,894 mg.L ⁻¹ 95h-CL ₅₀ : 0,054 mg.L ⁻¹ 95h-CL ₅₀ : 0,031 mg.L ⁻¹	<i>M. nipponense</i>	Yang 2014
Mortalité	Carbofurane	0 à 4 mg.L ⁻¹	24 à 96 h	24h-CL ₅₀ : 1,64 mg.L ⁻¹ 48h-CL ₅₀ : 1,22 mg.L ⁻¹ 72h-CL ₅₀ : 0,86 mg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 0,42 mg.L ⁻¹	<i>M. olfersii</i>	Barbieri <i>et al.</i> 2016
Mortalité	Endosulfan	juvéniles adultes	0,01 à 18,62 µg.L ⁻¹ 0,01 à 199,89 µg.L ⁻¹	24 h 96 h 24 h 96h	24h-CL ₅₀ : 10,44 µg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 1,86 µg.L ⁻¹ 24h-CL ₅₀ : 174,2 µg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 6,09 µg.L ⁻¹	<i>M. rosenbergii</i> Dai <i>et al.</i> 2014
Mortalité	Profenofos Diméthoate Chlorpyrifos Carbendazim Zinc	3,125 à 50 µg.L ⁻¹ 78,125 à 1250 µg.L ⁻¹ 0,15 à 5 µg.L ⁻¹ 10 à 100 mg.L ⁻¹ 53,1 à 850 µg.L ⁻¹	24 h	24h-CL ₅₀ : 11,6 µg.L ⁻¹ 24h-CL ₅₀ : 142,1 µg.L ⁻¹ 24h-CL ₅₀ : 0,7 µg.L ⁻¹ 24h-CL ₅₀ : > 100 mg.L ⁻¹ 24h-CL ₅₀ : 439,7 µg.L ⁻¹	<i>M. rosenbergii</i>	Satapornvaniit <i>et al.</i> 2009
Mortalité	Thiaméthoxam	0,5 à 5 mg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 1,45 mg.L ⁻¹	<i>P. adspersus</i>	Fatima & Billel, 2019
Mortalité	Cyperméthrine	0 à 0,025 µg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 0,002 µg.L ⁻¹	<i>P. argentinus</i>	Collins & Capello, 2006

Paramètres biologiques	Contaminants		Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Mortalité	Oxyde de Graphène Cadmium Zinc		0,1 à 5 mg.L ⁻¹ 0,0005 à 0,25 mg.L ⁻¹ 0,1 à 10 mg.L ⁻¹	96 h	NA 96h-CL ₅₀ : 0,0017 mg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 0,22 mg.L ⁻¹	<i>P. pandaliformis</i>	De Melo et al. 2019a
Mortalité	Dispersant (Accell Cleam)	larves	4,1 à 333 mg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 48,64 mg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Baxter et al. 2018
		adultes	4,1 à 333 mg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 44,18 mg.L ⁻¹		
	Dispersant (PES-51)	larves	12,3 à 1000 mg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 155,42 mg.L ⁻¹		
		adultes	4,1 à 333 mg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 38,75 mg.L ⁻¹		
Mortalité	Fenvalérate Cyperméthrine 1,2,4 Trichlorobenzène Oxyde de TBT Oxyde de triphényltin		NA	96 h	96h-LC ₅₀ : 0,003 µg.L ⁻¹ 96h-LC ₅₀ : 0,016 µg.L ⁻¹ 96h-LC ₅₀ : 540 µg.L ⁻¹ 96h-LC ₅₀ : 20 µg.L ⁻¹ 96h-LC ₅₀ : 50 µg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Clark et al. 1987
Mortalité	Etofenprox	embryons	1,23 à 100 µg.L ⁻¹	96 h	96h-LC ₅₀ : 100 µg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	DeLorenzo & De Leon 2010
		larves	0 à 0,33 µg.L ⁻¹	96 h	96h-LC ₅₀ : 0,89 µg.L ⁻¹		
		adultes	0,04 à 3 µg.L ⁻¹	96 h	96h-LC ₅₀ : 1,26 µg.L ⁻¹		
Mortalité	Microplastique polyéthylène		sphères fragments fibres	3 h	Mortalité augmente quand taille microplastique augmente	<i>P. pugio</i>	Gray & Weinstein, 2017

Paramètres biologiques	Contaminants		Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Mortalité	lambda-cyhalothrine perméthrine cyperméthrine deltaméthrine phénothrine	juvéniles	NA	96 h	96h-CL ₅₀ : 6,24 ng.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 50 ng.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 19,08 ng.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 5,04 ng.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 154 ng.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	DeLorenzo <i>et al.</i> 2014
	lambda-cyhalothrine perméthrine cyperméthrine deltaméthrine phénothrine	adultes			96h-CL ₅₀ : 11,44 ng.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 112,7 ng.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 21,2 ng.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 5,8 ng.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 161 ng.L ⁻¹		
Mortalité	Bifenthrine	larves (eau)	0 à 0,1 µg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 0,013 µg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Harper <i>et al.</i> 2008
		larves (sédiment)	NA	24 h	24h-CL ₅₀ : 0,210 µg.L ⁻¹		
Mortalité	Bifenthrine	adulte (eau)	0 à 0,1 µg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 0,02 µg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Harper <i>et al.</i> 2008
		adulte (sédiment)	NA	24 h	24h-CL ₅₀ : 0,339 µg.L ⁻¹		
Mortalité	Malathion	jeunes larves	1,88 à 30 µg.L ⁻¹		96h-CL ₅₀ : 9,06 µg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Key <i>et al.</i> 1998
		larves âgées	12,5 à 200 µg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 13,24 µg.L ⁻¹		
		adultes	12,5 à 30 µg.L ⁻¹		96h-CL ₅₀ : 38,19 µg.L ⁻¹		

Paramètres biologiques	Contaminants		Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Mortalité	Irgarol	larves (eau)	0,5 à 8 mg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 1,52 mg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Key <i>et al.</i> 2009
		larves (sédiment)	0,2 à 16,2 µg.L ⁻¹		24h-CL ₅₀ : 14,16 µg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 0,36 µg.L ⁻¹		
		adultes (eau)	0,25 à 3 mg.L ⁻¹		96h-CL ₅₀ : 2,46 mg.L ⁻¹		
		adultes (sédiment)	0,2 à 16,2 µg.L ⁻¹		24h-CL ₅₀ : 16,12 µg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 2,08 µg.L ⁻¹		
Mortalité	Simvastatine	larves	0,625 à 10 mg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 1,18 mg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Key <i>et al.</i> 2008
		adultes	0,625 à 10 mg.L ⁻¹	96 h	LOEC : 10 mg.L ⁻¹		
Mortalité	Phenotrine	embryons (eau)	3,125 à 50 µg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 19,55 µg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Key <i>et al.</i> 2011
		larves (sédiment)	/	24 h	24h-CL ₅₀ : 0,771 µg.L ⁻¹		
		larves (eau)	0,0156 à 0,250 µg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 0,154 µg.L ⁻¹		
		adultes (sédiment)	/	24 h	24h-CL ₅₀ : 6,30 µg.L ⁻¹		
		adultes (eau)	0,0625 à 1 µg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 0,161 µg.L ⁻¹		
Mortalité	UV Trace d'huiles		NA	24 h	NA	<i>P. pugio</i>	Key <i>et al.</i> 2020
			NA	24 h	NA		

Paramètres biologiques	Contaminants	Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Mortalité	methyl tert-butyl ether	0 à 550 mg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 166 mg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Rausina <i>et al.</i> 2002
Mortalité	fraction soluble de pétrole	NA	96 h	96h-CL ₅₀ : 22.3 %	<i>P. pugio</i>	Rayburn <i>et al.</i> 1996
Mortalité	chlorure de cuivre chlorure de méthylène 6-aminonicotinamide	NA NA /NA	96 h	96-CL ₅₀ : 1,82 mg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 0,071 % 96h-CL ₅₀ : 210 mg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Rayburn <i>et al.</i> 1999
Mortalité	HAP mélange	0x à 100x	96 h	96h-CL ₅₀ : 8,20x (9542 ng.g ⁻¹ sec)	<i>P. pugio</i>	Wirth <i>et al.</i> 1998
Mortalité	Naphtalène Pyrène	0,125 à 8 mg.L ⁻¹ 0,006 à 0,4 mg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 3,2 mg.L ⁻¹ NA	<i>P. serratus</i>	Luis & Guilhermino 2012
Mortalité	Deltaméthrine	0,6 à 313 ng.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 48,4 ng.L ⁻¹	<i>P. serratus</i>	Oliveira <i>et al.</i> 2012
Mortalité	Benzoapyrène	16 à 4096 µg.L ⁻¹	96 h	NA	<i>P. serratus</i>	Silva <i>et al.</i> 2013
Mortalité	Galaxolide Tonalide	0 à 50 µg.L ⁻¹	24 h	NA	<i>P. varians</i>	Ehiguese <i>et al.</i> 2019
Mortalité	Eau usée oliveraie	0,2 à 1-2 %	24 h	24h-CL ₅₀ : 0,7%	<i>Palaemonidae</i>	Pavlidou <i>et al.</i> 2014

Annexe 3 Liste non exhaustive des études mesurant des marqueurs individuels au laboratoire lors d'expositions chroniques en utilisant des crevettes Palaemonidae

Paramètres biologiques	Contaminants	Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Comportement (locomotion)	Drainage minier acide	NA	NA	Aucun effet à pH neutre Diminution locomotion à pH < 5	<i>M. lanchesteri</i>	Mohti <i>et al.</i> 2012
Comportement (inhibition alimentation)	Profenofos Diméthoate Chlorpyrifos Carbendazim Zinc	3,125 à 50 µg.L ⁻¹ 78,125 à 1250 µg.L ⁻¹ 0,15 à 5 µg.L ⁻¹ 10 à 100 mg.L ⁻¹ 53,1 à 850 µg.L ⁻¹	24 h	24h-CE ₅₀ : 6,02 µg.L ⁻¹ 24h-CE ₅₀ : 269,32 µg.L ⁻¹ 24h-CE ₅₀ : 0,29 µg.L ⁻¹ 24h-CE ₅₀ : > 100 mg.L ⁻¹ 24h-CE ₅₀ : 109,01 µg.L ⁻¹	<i>M. rosenbergii</i>	Satapornvanit <i>et al.</i> 2009
Comportement (locomotion)	Cyperméthrine	0 à 0,025 µg.L ⁻¹	5 min	Effet dose réponse de l'activité natatoire	<i>P. argentinus</i>	Collins & Capello, 2006
Comportement (locomotion)	Hypoxie Anoxie	/	/	Bref comportement exploratoire puis quiescence	<i>P. elegans</i> <i>P. serratus</i>	Taylor & Spicer 1987
Comportement	Anthracène	16 à 1024 µg.L ⁻¹	96 h	Vélocité de nage diminue avec l'augmentation de la dose	<i>P. serratus</i>	Gravato <i>et al.</i> 2014
Comportement (vélocité nage)	Naphtalène Pyrène	0,125 à 8 mg.L ⁻¹ 0,006 à 0,4 mg.L ⁻¹	/	CE ₅₀ : 1,7 mg.L ⁻¹ LOEC : 0,4 mg.L ⁻¹	<i>P. serratus</i>	Luis & Guilhermino 2012
Comportement (vélocité nage)	Deltaméthrine	/	/	LOEC : 0,6 ng.L ⁻¹	<i>P. serratus</i>	Oliveira <i>et al.</i> 2012
Comportement (vélocité nage)	Benzoapyrène	16 à 4096 µg.L ⁻¹	/	LOEC : 128 µg.L ⁻¹	<i>P. serratus</i>	Silva <i>et al.</i> 2013
Comportement (évitement)	Triclosan	0 à 100 µg.L ⁻¹	0 à 3 h	3h-CE ₅₀ système linéaire : 42 µg.L ⁻¹ 3h-CE ₅₀ multi habitats : 51 µg.L ⁻¹	<i>P. varians</i>	Araujo <i>et al.</i> 2019

Paramètres biologiques	Contaminants	Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Comportement (évitement)	Crèmes solaires (lotion, gel, spray)	0 à 300 mg.L ⁻¹	0 à 4 h	Augmentation de l'évitement pour la lotion et le gel (pas d'effets doses-réponses stricts)	<i>P. varians</i>	Araujo <i>et al.</i> 2020a
Comportement (évitement)	Cuivre	0 à 120 µg.L ⁻¹	0 à 4 h	4h-CE ₅₀ homogénéisation : 10,4 µg.L ⁻¹ 4h-CE ₅₀ immersion directe : 24,7 µg.L ⁻¹	<i>P. varians</i>	Araujo <i>et al.</i> 2018
Comportement	Galaxolide Tonalide	0 à 50 µg.L ⁻¹	3 h	Evitement augmente avec la dose pour les 2 contaminants	<i>P. varians</i>	Ehiguese <i>et al.</i> 2019
Mortalité	Pétrole brut (Nigéria)	0 à 320 mg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 120,23 mg.L ⁻¹	<i>D. trispinosa</i>	Ndimele, 2011
Mortalité	Temephos <i>B. thuringiensis</i> s-Methoprène Pyriproxyfène	0-0,04 ppm 0-250 UT (x 10 ⁶) 0-40 ppm 0-0,5 ppm	96 h	96h-CL ₅₀ : 0,0112 ppm 96h-CL ₅₀ : 60,9 UT 96h-CL ₅₀ : 14,32 ppm 96h-CL ₅₀ : 0,098 ppm	<i>L. tenuicornis</i>	Brown <i>et al.</i> 1996
Mortalité	Temephos <i>B. thuringiensis</i> s-Methoprène Pyriproxyfène	NA	24 h	24h-CL ₉₅ : 0,05 ppm 24h-CL ₉₅ : 1,5x10 ⁶ UT 24h-CL ₉₅ : < 4x10 ⁻⁵ ppm 24h-CL ₉₅ : 51 ppm	<i>L. tenuicornis</i>	Brown <i>et al.</i> 1999
Mortalité	Ammoniac		post larves juvéniles adultes	96h-CL ₅₀ : 21,14 mg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 21,14 mg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 36,59 mg.L ⁻¹	<i>M. amazonicum</i>	Dutra <i>et al.</i> 2016

Paramètres biologiques	Contaminants	Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Mortalité	Sulfate de cuivre Sulfate de zinc	NA NA	96 h	96h-CL ₅₀ : 0,247 mg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 3,188 mg.L ⁻¹	<i>M. lamarrei</i>	Murti & Shukla, 1984
Mortalité	Eau usée municipale Eau usée hospitalière	NA	18 h 7 h	18h-CL ₅₀ : 26 % 7h-CL ₅₀ : 30 %	<i>M. nipponense</i>	Gerhardt <i>et al.</i> 2002
Mortalité	Gallium (III) Antimoine (III) Indium (III) Cadmium (III) Cuivre (III)	0 à 10 mg.L ⁻¹ 0 à 16 mg.L ⁻¹ 0 à 16 mg.L ⁻¹ 0 à 0,6 mg.L ⁻¹ 0 à 0,6 mg.L ⁻¹	96 h	95h-CL ₅₀ : 2,774 mg.L ⁻¹ 95h-CL ₅₀ : 1,963 mg.L ⁻¹ 95h-CL ₅₀ : 6,894 mg.L ⁻¹ 95h-CL ₅₀ : 0,054 mg.L ⁻¹ 95h-CL ₅₀ : 0,031 mg.L ⁻¹	<i>M. nipponense</i>	Yang <i>et al.</i> 2014
Mortalité	Carbofurane	0 à 4 mg.L ⁻¹	24 à 96 h	24h-CL ₅₀ : 1,64 mg.L ⁻¹ 48h-CL ₅₀ : 1,22 mg.L ⁻¹ 72h-CL ₅₀ : 0,86 mg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 0,42 mg.L ⁻¹	<i>M. olfersii</i>	Barbieri <i>et al.</i> 2016
Mortalité	Endosulfane	juvéniles adultes	0,01 à 18,62 µg.L ⁻¹ 0,01 à 199,89 µg.L ⁻¹	24 h 96 h 24 h 96h	24h-CL ₅₀ : 10,44 µg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 1,86 µg.L ⁻¹ 24h-CL ₅₀ : 174,2 µg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 6,09 µg.L ⁻¹	<i>M. rosenbergii</i> Dai <i>et al.</i> 2014
Mortalité	Profenofos Diméthoate Chlorpyrifos Carbendazim Zinc	3,125 à 50 µg.L ⁻¹ 78,125 à 1250 µg.L ⁻¹ 0,15 à 5 µg.L ⁻¹ 10 à 100 mg.L ⁻¹ 53,1 à 850 µg.L ⁻¹	24 h	24h-CL ₅₀ : 11,6 µg.L ⁻¹ 24h-CL ₅₀ : 142,1 µg.L ⁻¹ 24h-CL ₅₀ : 0,7 µg.L ⁻¹ 24h-CL ₅₀ : > 100 mg.L ⁻¹ 24h-CL ₅₀ : 439,7 µg.L ⁻¹	<i>M. rosenbergii</i>	Satapornvanit <i>et al.</i> 2009
Mortalité	Thiaméthoxam	0,5 à 5 mg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 1,45 mg.L ⁻¹	<i>P. adspersus</i>	Fatima & Billel, 2019
Mortalité	Cyperméthrine	0 à 0,025 µg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 0,002 µg.L ⁻¹	<i>P. argentinus</i>	Collins & Capello, 2006

Paramètres biologiques	Contaminants		Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Mortalité	Oxyde de Graphène Cadmium Zinc		0,1 à 5 mg.L ⁻¹ 0,0005 à 0,25 mg.L ⁻¹ 0,1 à 10 mg.L ⁻¹	96 h	/ 96h-CL ₅₀ : 0,0017 mg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 0,22 mg.L ⁻¹	<i>P. pandaliformis</i>	De Melo <i>et al.</i> 2019a
Mortalité	Dispersant (Accell Cleam)	larves	4,1 à 333 mg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 48,64 mg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Baxter <i>et al.</i> 2018
		adultes	4,1 à 333 mg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 44,18 mg.L ⁻¹		
	Dispersant (PES-51)	larves	12,3 à 1000 mg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 155,42 mg.L ⁻¹		
		adultes	4,1 à 333 mg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 38,75 mg.L ⁻¹		
Mortalité	Fenvalérate Cyperméthrine 1,2,4 Trichlorobenzène Oxyde de TBT Oxyde de triphényltin		/	96 h	96h-CL ₅₀ : 0,003 µg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 0,016 µg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 540 µg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 20 µg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 50 µg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Clark <i>et al.</i> 1987
Mortalité	Etofenprox	embryons	1,23 à 100 µg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 100 µg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	DeLorenzo & De Leon 2010
		larves	0 à 0,33 µg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 0,89 µg.L ⁻¹		
		adultes	0,04 à 3 µg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 1,26 µg.L ⁻¹		
Mortalité	Microplastique polyéthylène		sphères fragments fibres	3 h	Mortalité augmente quand taille microplastique augmente	<i>P. pugio</i>	Gray & Weinstein, 2017

Paramètres biologiques	Contaminants		Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Mortalité	lambda-cyhalothrine perméthrine cyperméthrine deltaméthrine phénothrine	juvéniles	NA	96 h	96h-CL ₅₀ : 6,24 ng.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 50 ng.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 19,08 ng.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 5,04 ng.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 154 ng.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	DeLorenzo <i>et al.</i> 2012
	lambda-cyhalothrine perméthrine cyperméthrine deltaméthrine phénothrine	adultes			96h-CL ₅₀ : 11,44 ng.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 112,7 ng.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 21,2 ng.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 5,8 ng.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 161 ng.L ⁻¹		
Mortalité	Bifenthrine	larves (eau)	0 à 0,1 µg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 0,013 µg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Harper <i>et al.</i> 2008
		larves (sédiment)	NA	24 h	24h-CL ₅₀ : 0,210 µg.L ⁻¹		
Mortalité	Bifenthrine	adulte (eau)	0 à 0,1 µg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 0,02 µg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Harper <i>et al.</i> 2008
		adulte (sédiment)	/	24 h	24h-CL ₅₀ : 0,339 µg.L ⁻¹		
Mortalité	Malathion	jeunes larves	1,88 à 30 µg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 9,06 µg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Key <i>et al.</i> 1998
		larves âgées	12,5 à 200 µg.L ⁻¹		96h-CL ₅₀ : 13,24 µg.L ⁻¹		
		adultes	12,5 à 30 µg.L ⁻¹		96h-CL ₅₀ : 38,19 µg.L ⁻¹		

Paramètres biologiques	Contaminants		Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Mortalité	Irgarol	larves (eau)	0,5 à 8 mg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 1,52 mg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Key <i>et al.</i> 2007
		larves (sédiment)	0,2 à 16,2 µg.L ⁻¹		24h-CL ₅₀ : 14,16 µg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 0,36 µg.L ⁻¹		
		adultes (eau)	0,25 à 3 mg.L ⁻¹		96h-CL ₅₀ : 2,46 mg.L ⁻¹		
		adultes (sédiment)	0,2 à 16,2 µg.L ⁻¹		24h-CL ₅₀ : 16,12 µg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 2,08 µg.L ⁻¹		
Mortalité	Simvastatine	larves	0,625 à 10 mg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 1,18 mg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Key <i>et al.</i> 2008
		adultes	0,625 à 10 mg.L ⁻¹	96 h	LOEC : 10 mg.L ⁻¹		
Mortalité	Phenotrine	embryons (eau)	3,125 à 50 µg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 19,55 µg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Key <i>et al.</i> 2011
		larves (sédiment)	/	24 h	24h-CL ₅₀ : 0,771 µg.L ⁻¹		
		larves (eau)	0,0156 à 0,250 µg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 0,154 µg.L ⁻¹		
		adultes (sédiment)	/	24 h	24h-CL ₅₀ : 6,30 µg.L ⁻¹		
		adultes (eau)	0,0625 à 1 µg.L ⁻¹	96h	96h-CL ₅₀ : 0,161 µg.L ⁻¹		
Mortalité	UV Trace d'huiles		NA	24 h	NA	<i>P. pugio</i>	Key <i>et al.</i> 2020
			NA	24 h	NA		

Paramètres biologiques	Contaminants	Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Mortalité	methyl tert-butyl ether	0 à 550 mg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 166 mg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Rausina et al. 2002
Mortalité	fraction soluble de pétrole	NA	96 h	96h-CL ₅₀ : 22.3 %	<i>P. pugio</i>	Rayburn et al. 1996
Mortalité	chlorure de cuivre chlorure de méthylène 6-aminonicotinamide	NA NA NA	96 h	96-CL ₅₀ : 1,82 mg.L ⁻¹ 96h-CL ₅₀ : 0,071 % 96h-CL ₅₀ : 210 mg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Rayburn et al. 1999
Mortalité	HAP mélange	0x à 100x	96 h	96h-CL ₅₀ : 8,20x (9542 ng.g ⁻¹ sec)	<i>P. pugio</i>	Wirth et al. 1998
Mortalité	Naphtalène Pyrène	0,125 à 8 mg.L ⁻¹ 0,006 à 0,4 mg.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 3,2 mg.L ⁻¹ /	<i>P. serratus</i>	Luis & Guilhermino 2012
Mortalité	Deltaméthrine	0,6 à 313 ng.L ⁻¹	96 h	96h-CL ₅₀ : 48,4 ng.L ⁻¹	<i>P. serratus</i>	Oliveira et al. 2012
Mortalité	Benzoapyrène	16 à 4096 µg.L ⁻¹	96 h	NA	<i>P. serratus</i>	Silva et al. 2013
Mortalité	Galaxolide Tonalide	0 à 50 µg.L ⁻¹	24 h	NA	<i>P. varians</i>	Ehiguese et al. 2019
Mortalité	Eau usée oliveraie	0,2 à 1-2 %	24 h	24-CL ₅₀ : 0,7%	<i>Palaemonidae</i>	Pavlidou et al. 2014

Paramètres biologiques	Contaminants	Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Croissance Reproduction Survie	Cuivre	9-26 µg.L ⁻¹	NA	Hausse de la taille des larves Hausse du temps de la phase larvaire	<i>P. pugio</i>	Manyin & Rowe 2010
				Baisse du nombre de larves obtenues par ponte Inhibition des larves produites par les femelles		
Croissance Reproduction Survie	Pyrène	5,1 à 63,4 µg.L ⁻¹	42 j	Pas d'effet sur la survie	<i>P. pugio</i>	Oberdorster <i>et al.</i> 2000
				Baisse du nombre de mue chez les mâles à haute dose Hausse du temps avant accouplement chez les mâles Décal du temps avant première ponte Hausse de mortalité adultes à haute dose Hausse de mortalité d'embryons produits quand mères exposées		
Croissance Reproduction Survie	Cuivre Méthylène 6-aminonicotinamide	NA	12 j	Cuivre : Malformations des yeux, hausse du taux de malformations, hausse du temps de développement	<i>P. pugio</i>	Rayburn <i>et al.</i> 1999
				Méthylène : Malformations des yeux, forme, hépatopancréas ; hausse du taux de malformations ; hausse du temps de développement 6-aminonicotinamide : Hausse du temps de développement		

Paramètres biologiques	Contaminants	Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Croissance Reproduction	UV + hydrocarbures	/	/	Hausse du temps à la métamorphose ; hausse du nombre de mue après 21j Hausse du temps pour que les femelles soient gravides	<i>P. pugio</i>	Key <i>et al.</i> 2020
Croissance Survie	Dioxyde de carbone	1900 ppmv 1000 ppmv	15 semaines 30 semaines	Hausse de fréquence de mue Hausse de mortalité Baisse de croissance Baisse de taille totale des individus Baisse de fréquence de mue Hausse de mortalité	<i>P. pacificus</i>	Kurihara <i>et al.</i> 2008
Croissance Survie	Cyperméthrine	0,0001 à 0,01 µg.L ⁻¹	15 j	Hausse temps d'intermue Baisse survie Baisse croissance	<i>P. argentinus</i>	Collins & Capello 2006
Croissance Survie	Diclofénac sodium Acide clofibrique Clotrimazole	40-750 µg.L ⁻¹ 17-361 µg.L ⁻¹ 0,14-4 µg.L ⁻¹	/	Acide clofibrique : Hausse du temps de développement, hausse du temps d'intermue Clotrimazole : Hausse du temps de développement, hausse du temps d'intermue, baisse du taux de croissance spécifique	<i>P. longirostris</i>	Gonzalez-Ortegon <i>et al.</i> 2016

Paramètres biologiques	Contaminants	Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Croissance Survie	Malathion	1,88 à 30 µg.L ⁻¹	Pulse tous les 5 j	Diminution du nombre de juvéniles obtenus à plus haute dose 18j-CL ₅₀ : 12,98 µg.L ⁻¹ 25j-CL ₅₀ : 6,48 µg.L ⁻¹ 35j-CL ₅₀ : 5,58 µg.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Key <i>et al.</i> 1998
Croissance Survie	Diclofénac sodium Acide clofibrique Clotrimazole	40-1600 µg.L ⁻¹ 26-1000 µg.L ⁻¹ 0,25-10 µg.L ⁻¹	/	Baisse de masse des juvéniles ; baisse du taux de croissance ; hausse du temps d'intermue. Hausse de mortalité (à haute dose)	<i>P. serratus</i>	Gonzalez-Ortegon <i>et al.</i> 2013
Croissance Survie	Diclofénac sodium Acide clofibrique Clotrimazole	77-720 µg.L ⁻¹ 42-394 µg.L ⁻¹ 0,07-3,16 µg.L ⁻¹ + faible nutrition	/	Diclofénac sodium : Baisse du nombre de stade larvaire et baisse du temps de développement (à faible dose) Acide clofibrique : Baisse du nombre de stade larvaire et baisse du temps de développement (à haute dose) Clomitrazone : Baisse de masse des juvéniles, baisse du taux de croissance et hausse du temps d'intermue Hausse mortalité (à haute dose)	<i>P. serratus</i>	Gonzalez-Ortegon <i>et al.</i> 2013

Paramètres biologiques	Contaminants	Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Reproduction Survie	Hypoxie	2,5 ppm oxygène 1,5 ppm oxygène	15 j 70 j	15 j : baisse de fécondité (nombre œufs/femelle) 70 j : baisse de fécondité (nombre œufs/femelle), hausse de l'intervalle entre les pontes et baisse de la survie des larves	<i>P. pugio</i>	Brouwer <i>et al.</i> 2007
Reproduction Survie	Cadmium	1,51-2,51 µg.L ⁻¹	8 m	Baisse du nombre de larves obtenues par ponte Baisse de survie chez les formes adultes	<i>P. pugio</i>	Manyin & Rowe 2008
Reproduction Survie	Cuivre Méthylène 6-aminonicotinamide	NA	12 j	12j-CL ₅₀ : 1,44 mg.L ⁻¹ 12j-CL ₅₀ : 0,031 % 12j-CL ₅₀ : 0,057 g.L ⁻¹	<i>P. pugio</i>	Rayburn & Fisher, 1999
Reproduction Survie	Fraction soluble de pétrole	NA	12 j	12j-CL ₅₀ : 15,2 %	<i>P. pugio</i>	Rayburn <i>et al.</i> 1996
Reproduction Survie	Endosulfan Endosulfan + UV	0-200-400 ng.L ⁻¹	50 j	UV : Hausse du nombre de femelles gravides ; Baisse du temps de développement des embryons UV + endosulfan 200 ng.L ⁻¹ : Baisse du nombre de femelles gravides par rapport au témoin UV Hausse de mortalité chez femelles exposées à endosulfan à haute dose + UV	<i>P. pugio</i>	Volz <i>et al.</i> 2002
Croissance	Hydrocarbures	NA	16 j	Baisse du taux de croissance	<i>P. pugio</i>	Gundersen <i>et al.</i> 1996
Reproduction	Cobalt issu de radiation gamma	3-30-300-3000 mGY	/	Baisse du nombre d'œufs Hausse du nombre de juvéniles morts	<i>M. rosenbergii</i>	Stalin <i>et al.</i> 2019
Reproduction	Hypoxie cyclique	1,5-8 mg.L ⁻¹	77 j	Baisse du nombre de ponte Baisse de fécondité	<i>P. pugio</i>	Brown-Peterson <i>et al.</i> 2008

Paramètres biologiques	Contaminants	Concentrations	Temps	Effets	Espèces	Référence
Reproduction	Endosulfan	0-200-400 ng.L ⁻¹	43 j	Baisse du nombre de femelles gravides	<i>P. pugio</i>	Wirth <i>et al.</i> 2002
Survie	Teflubenzuron	0,0025 à 1,88 µg.g ⁻¹	66 j	66j-CL ₅₀ : 18,4 ng.g ⁻¹	<i>P. elegans</i>	Samuelsen <i>et al.</i> 2020
Survie	Pétrole brut dilué	0-1-10-100 %	15 j	Hausse de mortalité pour les 2 plus hautes doses	<i>P. pugio</i>	Fisher & Foss 1993
Survie	Diflubenzuron	0,1 à 5 µg .L ⁻¹	NA	Hausse de mortalité des larves et juvéniles avec hausse de dose	<i>P. pugio</i>	Wilson & Costlow; 1987
Survie	Mélange d'hydrocarbures	1 à 10 fois concentrations sédiments	7 j	Hausse de mortalité avec hausse de dose	<i>P. pugio</i>	Wirth <i>et al.</i> 1998
Activité respiratoire	Pétrole brut	50 à 200 ppb	15 j	Augmentation de l'activité respiratoire mais non temps-dépendant	<i>P. adspersus</i>	Baden & Hagerman 1981

Annexe 4 Liste des expérimentations réalisées *in vitro* sur l'interaction entre contaminant et activité NAGase

Substance	Espèce	Origine	Dose maximale	IC50	Effet	Auteur
Mercure	<i>Penaeus vannamei</i>	NA	1,2 mmol.L ⁻¹	0,3 mmol.L ⁻¹	Inhibition irréversible	Lin <i>et al.</i> (2006)
Zinc	<i>Scylla serrata</i>	NA	10 mmol.L ⁻¹	0,5 ± 0,012 mmol.L ⁻¹	Inhibition réversible	Zhang <i>et al.</i> (2010)
Phenol	<i>Scylla serrata</i>	NA	150 mmol.L ⁻¹	75 mmol.L ⁻¹	Inhibition réversible	Zhang <i>et al.</i> (2007)
Chlorure guanidinium	<i>Scylla serrata</i>	NA	1 mmol.L ⁻¹	0,404 ± 0,025 mmol.L ⁻¹	Inhibition irréversible	Zhang <i>et al.</i> (2012)
Chlorure guanidinium	<i>Litopenaeus vannamei</i>	NA	3,0 mmol.L ⁻¹	0,268 ± 0,040 mmol.L ⁻¹	Inhibition irréversible	Xie <i>et al.</i> (2005)
Acide citrique	<i>Litopenaeus vannamei</i>	NA	10 mmol.L ⁻¹	5,00 ± 0,35 mmol.L ⁻¹	Inhibition réversible	Xie <i>et al.</i> (2010a)
Bétaine	<i>Litopenaeus vannamei</i>	NA	30 mmol.L ⁻¹	15,00 ± 0,30 mmol.L ⁻¹	Inhibition réversible	Xie <i>et al.</i> (2010b)
Dioxane	<i>Penaeus vannamei</i>	NA	3,5 mol.L ⁻¹	1,1 mol.L ⁻¹	Inhibition réversible	Xie & Chen (2004)
Acide bromoacétique	<i>Penaeus vannamei</i>	NA	50 mmol.L ⁻¹	17,05 ± 0,65 mmol.L ⁻¹	Inhibition réversible	Xie <i>et al.</i> (2007)
Péroxyde d'hydrogène	<i>Penaeus vannamei</i>	NA	3,0 mol.L ⁻¹	0.85 mol.L ⁻¹	Inhibition réversible	Xie <i>et al.</i> (2006a)
Glycine	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscères	15 mmol.L ⁻¹	NA	Pas d'effet	Xie <i>et al.</i> (2006b)
Alanine	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscères	15 mmol.L ⁻¹	NA	Pas d'effet	Xie <i>et al.</i> (2006b)
Valine	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscères	15 mmol.L ⁻¹	NA	Pas d'effet	Xie <i>et al.</i> (2006b)
Leucine	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscères	15 mmol.L ⁻¹	NA	Pas d'effet	Xie <i>et al.</i> (2006b)
Isoleucine	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscères	15 mmol.L ⁻¹	NA	Pas d'effet	Xie <i>et al.</i> (2006b)
Proline	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscères	15 mmol.L ⁻¹	NA	Pas d'effet	Xie <i>et al.</i> (2006b)
Serine	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscères	15 mmol.L ⁻¹	NA	Pas d'effet	Xie <i>et al.</i> (2006b)
Threonine	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscères	15 mmol.L ⁻¹	NA	Pas d'effet	Xie <i>et al.</i> (2006b)
Cystéine	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscères	15 mmol.L ⁻¹	NA	Pas d'effet	Xie <i>et al.</i> (2006b)
Glutamine	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscères	15 mmol.L ⁻¹	NA	Pas d'effet	Xie <i>et al.</i> (2006b)
Asparginine	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscères	15 mmol.L ⁻¹	NA	Pas d'effet	Xie <i>et al.</i> (2006b)
Tryptophane	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscères	15 mmol.L ⁻¹	NA	Inhibition	Xie <i>et al.</i> (2006b)
Acide aspartique	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscères	30 mmol.L ⁻¹	20 mmol.L ⁻¹	Inhibition	Xie <i>et al.</i> (2006b)
Acide glutamique	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscères	30 mmol.L ⁻¹	28 mmol.L ⁻¹	Inhibition	Xie <i>et al.</i> (2006b)
Hystidine	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscères	15 mmol.L ⁻¹	NA	Stimulation	Xie <i>et al.</i> (2006b)
Lysine	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscères	15 mmol.L ⁻¹	NA	Stimulation	Xie <i>et al.</i> (2006b)
Arginine	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscères	15 mmol.L ⁻¹	NA	Stimulation	Xie <i>et al.</i> (2006b)

Substance	Espèce	Origine	Dose maximale	IC50	Effet	Auteur
Traitement antibactérien (Enrofloxacin)	<i>Scylla serrata</i>	Viscère	2.0 mg.mL ⁻¹	0.44mg.mL ⁻¹	Inhibition	Yan <i>et al.</i> (2007)
Céfradine	<i>Scylla serrata</i>	Viscère	4.5 mg.mL ⁻¹	NA	Stimulation	Yan <i>et al.</i> (2007)
Sulfadiazine	<i>Scylla serrata</i>	Viscère	4.5 mg.mL ⁻¹	NA	Pas d'effet	Yan <i>et al.</i> (2007)
Streptomycine	<i>Scylla serrata</i>	Viscère	10.0 mg.mL ⁻¹	NA	Pas d'effet	Yan <i>et al.</i> (2007)
Gentamicine	<i>Scylla serrata</i>	Viscère	10.0 mg.mL ⁻¹	NA	Stimulation	Yan <i>et al.</i> (2007)
DMSO	<i>Tenebrio molitor</i> <i>Linnaeus</i>	Epiderme	40 %	5 %	Inhibition	Pan <i>et al.</i> (2006a)
trichloroisocyanuric acid (TCCA) (désinfectant)	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscère	5.25 µmol.L ⁻¹	1.8 mol.L ⁻¹	Inhibition	Xie <i>et al.</i> (2009a)
trichloroisocyanuric acid (TCCA) (désinfectant)	<i>Penaeus vannamei</i>	Carapace	6.0 µmol.L ⁻¹	2.1 mol.L ⁻¹	Inhibition	Xie <i>et al.</i> (2009a)
Hypochlorite	<i>Penaeus vannamei</i>	Carapace	5.5 µmol.L ⁻¹	2.6 mmol.L ⁻¹	Hormèse Inhibition	Xie <i>et al.</i> (2009a)
Hypochlorite	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscère	3.0 µmol.L ⁻¹	0.4 mmol.L ⁻¹	Hormèse Inhibition	Xie <i>et al.</i> (2009a)
glutaraldehyde	<i>Penaeus vannamei</i>	Carapace	20 µmol.L ⁻¹	NA	Pas d'effet	Xie <i>et al.</i> (2009b)
glutaraldehyde	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscère	20 µmol.L ⁻¹	NA	Stimulation	Xie <i>et al.</i> (2009b)
didecyldimethyl ammonium chloride, DDAC	<i>Penaeus vannamei</i>	Carapace	22 µmol.L ⁻¹	NA	Stimulation	Xie <i>et al.</i> (2009b)
didecyldimethyl ammonium chloride, DDAC	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscère	99.5 µmol.L ⁻¹	NA	Inhibition	Xie <i>et al.</i> (2009b)
Ethanol	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscère	50 %	35 %	Inhibition	Wang <i>et al.</i> (2004)
Mg2+	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscère	5.0 mmol.L ⁻¹	NA	Stimulation	Lin <i>et al.</i> (2005)
Ca2+	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscère	5.0 mmol.L ⁻¹	NA	Stimulation	Lin <i>et al.</i> (2005)

Substance	Espèce	Origine	Dose maximale	IC50	Effet	Auteur
Ba2+	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscère	5.0 mmol.L ⁻¹	NA	Inhibition	Lin et al. (2005)
Mn2+	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscère	2.0 mmol.L ⁻¹	NA	Stimulation	Lin et al. (2005)
Al3+	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscère	2.0 mmol.L ⁻¹	NA	Inhibition	Lin et al. (2005)
Fe3+	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscère	2.0 mmol.L ⁻¹	NA	Inhibition	Lin et al. (2005)
Cd2+	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscère	10.0 mmol.L ⁻¹	NA	Inhibition	Lin et al. (2005)
Zn2+	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscère	10.0 mmol.L ⁻¹	NA	Inhibition	Lin et al. (2005)
Co2+	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscère	10.0 mmol.L ⁻¹	NA	Inhibition	Lin et al. (2005)
Hg2+	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscère	1.0 mmol.L ⁻¹	< 0.5 mmol.L ⁻¹	Inhibition	Lin et al. (2005)
Pb2+	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscère	2.0 mmol.L ⁻¹	NA	Inhibition	Lin et al. (2005)
Cu2+	<i>Penaeus vannamei</i>	Viscère	2.0 mmol.L ⁻¹	NA	Inhibition	Lin et al. (2005)
Vitamine C	<i>Tenebrio molitor Linnaeus</i>	Organisme	500 mmol.L-1	78 mmol.L-1	Inhibition	Pan et al. (2007)
Vitamine B6	<i>Tenebrio molitor Linnaeus</i>	Organisme	50 mmol.L ⁻¹	15 mmol.L-1	Inhibition	Pan et al. (2007)
Vitamine B1	<i>Tenebrio molitor Linnaeus</i>	Organisme	40 mmol.L ⁻¹	12.5 mmol.L ⁻¹	Inhibition	Pan et al. (2007)
Vitamine B5	<i>Tenebrio molitor Linnaeus</i>	Organisme	NA	NA	Pas d'effet	Pan et al. (2007)
Vitamine B12	<i>Tenebrio molitor Linnaeus</i>	Organisme	NA	NA	Pas d'effet	Pan et al. (2007)
Vitamine B2	<i>Tenebrio molitor Linnaeus</i>	Organisme	NA	NA	Pas d'effet	Pan et al. (2007)
Methanol	<i>Tenebrio molitor Linnaeus</i>	Epiderme	40 %	35 %	Inhibition	Pan et al. (2006b)
Ethanol	<i>Tenebrio molitor Linnaeus</i>	Epiderme	40 %	25 %	Inhibition	Pan et al. (2006b)
n-propanol	<i>Tenebrio molitor Linnaeus</i>	Epiderme	40 %	17 %	Inhibition	Pan et al. (2006b)
Glycérol	<i>Tenebrio molitor Linnaeus</i>	Epiderme	30 %	21 %	Hormèse Inhibition	Pan et al. (2006b)
Ethylène glycol	<i>Tenebrio molitor Linnaeus</i>	Epiderme	30 %	30 %	Hormèse Inhibition	Pan et al. (2006b)
Dioxane	<i>Tenebrio molitor Linnaeus</i>	Epiderme	40 %	18.0 %	Inhibition	Pan et al. (2006b)
DMF (dimethylformamide)	<i>Tenebrio molitor Linnaeus</i>	Epiderme	40 %	8.0 %	Inhibition	Pan et al. (2006b)
Penicilline	<i>Penaeus vannamei</i>	Carapace	0,01 mg.mL ⁻¹	NA	Pas d'effet	Du et al. (2008)

Substance	Espèce	Origine	Dose maximale	IC50	Effet	Auteur
Kanamycine	<i>Penaeus vannamei</i>	Carapace	0,01 mg.mL ⁻¹	NA	Pas d'effet	Du <i>et al.</i> (2008)
Gebtamicine	<i>Penaeus vannamei</i>	Carapace	0,025 mg.mL ⁻¹	NA	Stimulation	Du <i>et al.</i> (2008)
Streptomycine	<i>Penaeus vannamei</i>	Carapace	1,0 mg.mL ⁻¹	NA	inactivation - 0 a 4%	Du <i>et al.</i> (2008)
Sulfadiazine	<i>Penaeus vannamei</i>	Carapace	0,4 mg.mL ⁻¹	NA	Stimulation	Du <i>et al.</i> (2008)
Ciprofloxacin Hydrochloride	<i>Penaeus vannamei</i>	Carapace	1,0 mg.mL ⁻¹	NA	Stimulation	Du <i>et al.</i> (2008)
Norflaxacin	<i>Penaeus vannamei</i>	Carapace	1,0 mg.mL ⁻¹	NA	Inhibition	Du <i>et al.</i> (2008)
Sulfamethoxazole	<i>Penaeus vannamei</i>	Carapace	1,0 mg.mL ⁻¹	< 0.1 mg.mL ⁻¹	Inhibition	Du <i>et al.</i> (2008)
Al ³⁺	<i>Tenebrio molitor Linnaeus</i>	Organisme	10,0 mmol.L ⁻¹	NA	Inhibition	Pan <i>et al.</i> (2007)
Fe ³⁺	<i>Tenebrio molitor Linnaeus</i>	Organisme	10,0 mmol.L ⁻¹	NA	Inhibition	Pan <i>et al.</i> (2007)
Zn ²⁺	<i>Tenebrio molitor Linnaeus</i>	Organisme	25,0 mmol.L ⁻¹	NA	Inhibition	Pan <i>et al.</i> (2007)
Cd ²⁺	<i>Tenebrio molitor Linnaeus</i>	Organisme	25,0 mmol.L ⁻¹	NA	Inhibition	Pan <i>et al.</i> (2007)
Hg ²⁺	<i>Tenebrio molitor Linnaeus</i>	Organisme	20 mmol.L ⁻¹	0.3 mmol.L ⁻¹	Inhibition	Pan <i>et al.</i> (2007)
Ag ²⁺	<i>Tenebrio molitor Linnaeus</i>	Organisme	25 mmol.L ⁻¹	4;2 mmol.L ⁻¹	Inhibition	Pan <i>et al.</i> (2007)
Pb ²⁺	<i>Tenebrio molitor Linnaeus</i>	Organisme	25 mmol.L ⁻¹	7.0 mmol.L ⁻¹	Inhibition	Pan <i>et al.</i> (2007)
Cu ²⁺	<i>Tenebrio molitor Linnaeus</i>	Organisme	25 mmol.L ⁻¹	11.0 mmol.L ⁻¹	Inhibition	Pan <i>et al.</i> (2007)
Ca ²⁺	<i>Scylla serrata</i>	NA	1,0 mmol.L ⁻¹	NA	Stimulation	Yang <i>et al.</i> (2006)
Ba ²⁺	<i>Scylla serrata</i>	NA	1,0 mmol.L ⁻¹	NA	Stimulation	Yang <i>et al.</i> (2006)
Mg ²⁺	<i>Scylla serrata</i>	NA	1,0 mmol.L ⁻¹	NA	Stimulation	Yang <i>et al.</i> (2006)
Co ²⁺	<i>Scylla serrata</i>	NA	1,0 mmol.L ⁻¹ puis 15 mmol.L ⁻¹	NA	Hormèse Inhibition	Yang <i>et al.</i> (2006)
Mn ²⁺	<i>Scylla serrata</i>	NA	15 mmol.L ⁻¹	NA	Stimulation	Yang <i>et al.</i> (2006)
Al ³⁺	<i>Scylla serrata</i>	NA	300µmol.L ⁻¹	NA	Inhibition	Yang <i>et al.</i> (2006)
Fe ³⁺	<i>Scylla serrata</i>	NA	300µmol.L ⁻¹	150 µmol.L ⁻¹	Inhibition	Yang <i>et al.</i> (2006)
Hg ²⁺	<i>Scylla serrata</i>	NA	1,5 µmol.dm ⁻³	< 1 µmol.L ⁻¹	Inhibition	Yang <i>et al.</i> (2006)
Cd ²⁺	<i>Scylla serrata</i>	NA	15 mmol.L ⁻¹	NA	Inhibition	Yang <i>et al.</i> (2006)
Pb ²⁺	<i>Scylla serrata</i>	NA	8 mmol.L ⁻¹	< 2 mmol.L ⁻¹	Inhibition	Yang <i>et al.</i> (2006)

Annexe 5 Table d'annotation des principaux groupements chimiques identifiables sur un spectre infrarouge. L'intensité d'un pic peut être forte (F), moyenne (m) ou fine (f).

Liaison	Nombre d'onde(cm^{-1})	Intensité
O-H alcool libre	3580-3670	F; large
C _{sp} -H	3300-3310	m
O-H alcool lié	3200-3400	F
N-H (amines+imines)	3100-3500	m
N-H (amides)	3100-3500	F
C _{sp2} -H	3000-3100	m
C _{sp2} -H aromatique	3030-3080	m
C _{sp3} -H	2800-3000	F
C _{sp2} -H aldéhyde	2750-2900	m
O-H acide carboxylique	2500-3200	F à m; large
C=C	2100-2250	f
C=N	2120-2160	F ou m
C=O anhydride	1700-1840	F; 2 bandes
C=O chlorure d'acyle	1770-1820	F
C=O ester	1700-1740	F
C=O aldéhyde et cétone	1650-1730 (- 20 à 30 cm^{-1} si conjugaison)	F
C=O acide	1680-1710	F
C=O amide	1650-1700	F
C=C	1625-1685	m
C=C aromatique	1450-1600	variable
N=O	1510-1580 et 1325-1365	F; 2 bandes
C=N	1600-1680	F
N-H amine ou amide	1560-1640	F ou m

Activité chitinolytique et propriétés structurales de la cuticule chez la crevette *Palaemon serratus* – Description au cours du cycle de mue et perspectives d'utilisation en écotoxicologie

Résumé

La mue est une fonction physiologique cruciale chez les crustacés, sous la dépendance de mécanismes moléculaires complexes pouvant être la cible de polluants. Si des perturbations de la mue par l'action de xénobiotiques ont été rapportées en conditions contrôlées de laboratoire par de nombreux travaux, les méthodologies permettant de poser un diagnostic de telles perturbations *in natura* (i.e. chez des spécimens autochtones ou encagés) restent extrêmement limitées. Dans ce contexte, l'objectif de ces travaux de thèse est d'étudier des processus clés en lien avec la mue, dans une perspective de dégager quelques marqueurs candidats susceptibles de détecter des altérations de cette fonction chez la crevette marine *Palaemon serratus*, tant dans le cadre d'essais en laboratoire que de suivis *in situ*. Les investigations se sont focalisées sur i) l'activité de l'enzyme chitinolytique N-acétyl- β -D-glucosaminidase (i.e. NAGase), indispensable à l'accomplissement de l'exuviation, et ii) la mesure des propriétés physicochimiques de la cuticule, inhérentes à sa structure. Ces réponses ont été retenues car elles permettent de faire la jonction entre la réalisation de la régulation hormonale de la mue et la physiologie de l'organisme. La première étape de ces travaux a été consacrée à l'optimisation méthodologique et le suivi des réponses au cours du cycle de mue de *P. serratus*, ainsi que l'espèce *Gammarus fossarum*, régulièrement utilisée en écotoxicologie continentale. Ainsi, les conditions de dosage de l'activité enzymatique de la NAGase ont été calibrées, permettant d'obtenir un protocole de lecture robuste. Les niveaux et profils d'activité NAGase mesurés au cours du cycle de mue étaient cohérents avec ceux retrouvés dans la littérature, corroborant une élévation significative de l'activité de la NAGase en fin de prémue. Au contraire du cycle de mue, aucune différence d'activité n'a été observée entre spécimens mâles et femelles. Ces résultats ont confirmé l'importance de fixer une même fenêtre d'observation au cours du cycle de mue chez les spécimens analysés, avec un intérêt prononcé pour le stade D2 chez les crevettes, et D1 pour les gammarus. Dans une même perspective de développement et d'optimisation d'outils, une batterie d'approches physicochimiques a été déployée pour caractériser les propriétés de la cuticule de *P. serratus*. Les analyses thermiques ont ainsi permis d'identifier des événements remarquables associés à l'évaporation de l'eau, la dégradation des macromolécules, de la chitine et à la volatilisation de la fraction inorganique labile. Ces analyses ont été complétées par la caractérisation de la fraction minérale par ICP-MS et une analyse du spectre infrarouge des éléments de surface obtenu par IRTF. Une description dynamique au cours du cycle de mue a permis de mettre en évidence des changements structuraux. Ces observations étaient cohérentes avec le processus de rigidification de la cuticule lors de la postmue. Parmi les métriques mesurées, celles obtenues par l'analyse thermogravimétrique couplée au dosage des éléments inorganiques se sont révélées les plus pertinentes pour caractériser des modifications structurales de la cuticule. Lors d'une seconde étape, l'activité de la NAGase et les propriétés cuticulaires ont été étudiées sous l'influence de stress chimiques dans le cadre d'expositions contrôlées. Un screening *in vitro* a permis de mettre en évidence des inhibitions de l'activité de la NAGase en présence d'un inhibiteur spécifique, la pentoxifylline, et de contaminants environnementaux tels que le cadmium ou le glyphosate. De même, l'altération des propriétés physicochimiques de la cuticule a été observée dans le cadre de traitement *in vitro* de cuticule à un stress acide. En revanche, aucun effet significatif sur l'activité de la NAGase ou l'intégrité cuticulaire n'a été observé chez des spécimens de *P. serratus* exposés *in vivo* après $21 \pm 0,4$ jours au cadmium et à la pentoxifylline (i.e. respectivement 0,5 et 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). De même, malgré l'apparition de délais de mue chez des gammarus exposés 16 jours *ex situ* à des effluents de STEP, aucune perturbation de l'activité de la NAGase n'a été recensée. En parallèle, la mesure de l'activité de la NAGase sur des crevettes présentes en différents sites du littoral de la Baie de Seine a montré des niveaux inter-sites contrastés, cohérents avec l'historique de contamination de ces sites. Si l'apparition de réponses contrastées a également été observée par analyse ATG, ces dernières étaient en opposition avec les mesures de NAGase, soulignant l'intérêt de mieux appréhender la variabilité des réponses fournies par ces méthodes innovantes. *In fine*, l'intérêt et le périmètre de l'utilisation, en tant que biomarqueur, des méthodes développées au cours de ce travail de thèse sont discutés au regard de l'ensemble des résultats.

Mots-clés : Crustacés ; *Palaemon serratus* ; Mue ; Composition minérale ; N-acétyl- β -D-glucosaminidase ; Cuticule ; Thermogravimétrie.

Chitinolytic enzyme activity and cuticle structural properties of the marine prawn *Palaemon serratus*- Description along the moult cycle and application perspectives in ecotoxicology

Abstract

Moult is a key physiological function for crustaceans, dependant from many molecular mechanisms that could be targeted by contaminants. If moult disturbances, owing to the contaminant actions, have been greatly reported in laboratory conditions, methods allowing this kind of diagnosis *in natura* are extremely limited. In this context, the thesis aim was to study the main mechanisms linked with moulting process, to select some interesting markers that could detect moult alterations on the marine prawn *Palaemon serratus*, on both laboratory and field conditions. Research have been focused on i) the activity of the chitinolytic enzyme N-acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAGase), required to achieve moult, and ii) the analysis of physicochemical cuticle properties, linked with its structure. These mechanisms have been observed since their responses may linked the moult molecular regulation and the organism physiology. The first step of this study consisted of the methodological optimisation and the analysis of the selected moult responses along the moult cycle of *P. serratus*, as well as for *Gammarus fossarum*, freshwater crustacean regularly used in ecotoxicology. To do this, enzymatic activity measurement has been calibrated, defining a robust measuring protocol. Levels and dynamics of NAGase activity along the moult cycle were similar with other crustaceans, highlighting an increase of activity during the late premoult. Contrary to moult cycle, no sex influence was observed on NAGase activity. These results confirmed the need to define a specific moult period to analyse the response of markers, particularly in D2 and D1 stages for prawn and gammarid NAGase activities respectively. In a same way, several physicochemical approaches were used to characterise *P. serratus* cuticle properties. Thermal analyses allowed to identify specific events linked with bound water evaporation, protein, and chitin degradations, as well as inorganic salt volatilisation. These analyses have been completed with the ICP-MS mineral fraction characterisation and the cuticle surface composition performed by FTIR measurements. A dynamical study of cuticle properties along the moult cycle revealed some major structure changes. Such changes were consistent with the cuticle rigidification process occurring at postmoult. Among parameters measured, these obtained by both TGA and ICP-MS mineral analyses were the most relevant to characterise cuticle structure modifications. In a second step, NAGase activity and cuticle property markers were assessed in controlled exposure approaches. Hence, *in vitro* screening showed NAGase inhibitions led by a specific inhibition, pentoxifylline, as well as by cadmium or glyphosate. Similarly, cuticle property alterations were detected following a formic acid exposure of *P. serratus* cuticle. However, after an *in vivo* exposure of prawns to cadmium and pentoxifylline (at 0.5 and 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ respectively) during $21 \pm 0,4$ days, no alterations were found based on moult marker analyses. Besides, despite the observation of moult delays, no impact was detected on NAGase activity of gammarids exposed to *ex situ* STEP effluent concentrations. In parallel, the NAGase activity assessment on prawns collected on different sites along the Baie de Seine coastline revealed differences in activity, which were consistent with the contamination degree found in these sites. Such differences were also observed with TGA analyses, but not in agreement with the contamination degree, highlighting the need to better know the response variability of this marker, through both natural and pollutant influences. Finally, interest and use setting of the selected markers as potential biomarkers were discussed according to all the results obtained during this work.

Keywords: Crustaceans; *Palaemon serratus*; moult; mineral composition; N-acetyl- β -D-glucosaminidase; cuticle; TGA analysis