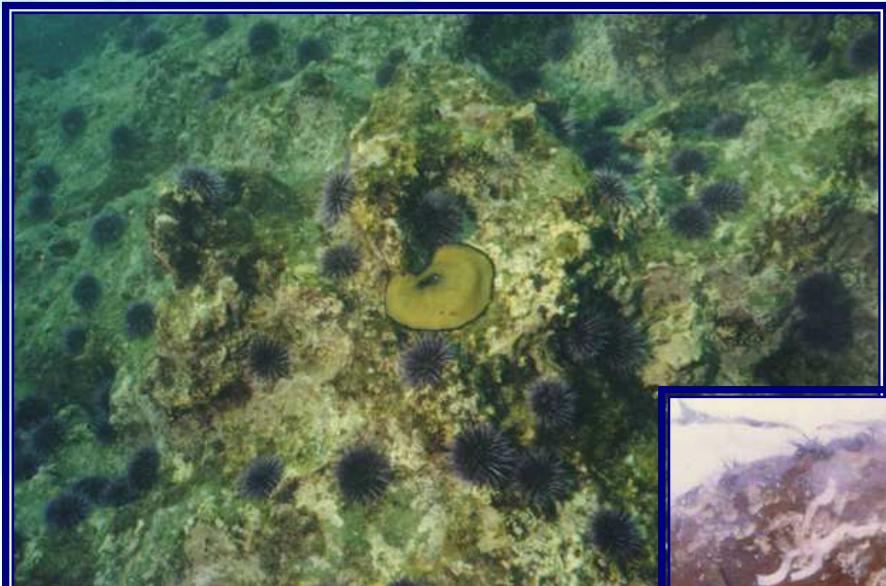




biosyn  
Arzneimittel  
GmbH

ALIMENTATION, REPRODUCTION, CROISSANCE ET  
ELEVAGE DU MOLLUSQUE « GIANT KEYHOLE LIMPET »  
**MEGATHURA CRENULATA**



PIEN Sébastien  
BLIN Jean-Louis  
RICHARD Olivier

Juillet 2009  
SMEL/CE-prod/2009-01

**Numéro d'identification du rapport : le numéro SMEL**

**Diffusion :** libre  restreinte  interdite

**Version du document :** définitive

**Date de publication :** Juillet 2009

**Nombre de page :** 81

**Bibliographie :** oui  non

**Illustration(s) :** oui  non

**Validé par :**

**Titre et sous titre du rapport :**

*Megathura crenulata*

Rapport final des études menées entre 1993 et 2001.

**Auteur(s) principal(aux) :**

Sébastien PIEN; Jean-Louis BLIN; Olivier RICHARD.

**Organisme(s) et adresse(s)**

Syndicat Mixte pour l'Équipement du Littoral  
S.M.E.L  
Zone conchylicole  
50 560 BLAINVILLE / MER

**Autre(s) participant(s)**

Christelle BEAUFILS, Martine LENGRONNE, Laurence MACE-HEGRON, Stéphanie PETINAY, Olivier BASUYAUX, Didier BIRAISS, Jean-Louis LESOIF, Stéphane PACARY, Roland VIOLETTE : **SMEL**.

Virginie PELLETIER, Bruno CHANUT, Vanessa GEORGES : stagiaires du **SMEL**.

Ortwin KOTTWITZ, Pr. STIEGEL et toute l'équipe de **BIOSYN**.

Dr Shamana MUDDUKRISHNA : **Biosyn Corporation**.

Georges KELLY, Richard RHODE : **Marinus**, Steven LE PAGE, Dr. LEIGHTON : **SCRIPPS San Diego**.

Pr. Jorgen MARKL et son équipe : **Université de MAINZ** (Allemagne)

Pr. Peter G. BENINGER, Rozenn CANNUEL : **ISOMER Nantes**

Bertrand PERRIN, A. Hily, F. Poirier : **Université de Bretagne Sud**, Vannes.

Jean-Pierre CUIF, Yannick DAUPHIN : **Université Orsay**.

Pr. Eve BOUCAUD-CAMOU, Emmanuelle DANTON : **Université de Caen**.

~~~~~

*Megathura crenulata* : rapport final des études menées entre 1993 et 2001.

#### Résumé :

Le programme *Megathura crenulata* fut initié au SMEL en 1993 à la demande de la société pharmaceutique Biosyn Arzneimittel GmbH, située dans les environs de Stuttgart (Allemagne). Cette société possède un brevet d'extraction d'une molécule de l'hémolymphe de ce mollusque issu des côtes de Californie (USA), l'hémocyanine, aux propriétés anticancéreuses.

Dans un premier temps, les travaux ont porté sur la stabulation des animaux. En effet, une fois péchés, ils étaient stockés dans des conditions insuffisantes pour garantir l'intégrité de la molécule. Après 18 mois d'études, et au vu de son expérience sur le circuit fermé, le SMEL a pu mettre au point une méthode de stabulation qui permettait de conserver les animaux en captivité plusieurs jours sans que l'hémocyanine subisse une quelconque dégradation. Par la suite, Biosyn a installé une unité de stabulation d'animaux pré-ponctionnables en Allemagne et en Californie sur le modèle des installations du SMEL.

Suite à ces travaux, Biosyn souhaitait poursuivre ces études en les orientant vers la définition des paramètres d'élevage. Ainsi de 1995 à 2001, les études ont porté sur quatre grands thèmes : la définition des conditions biotiques de l'animal, la maîtrise du cycle de reproduction, la connaissance du mode et régime alimentaire et l'optimisation de la croissance et la maîtrise de la mortalité. Les connaissances biologiques sur *Megathura crenulata* étant très faibles, le SMEL engageait un programme de recherche destiné à évoluer la faisabilité de l'élevage de cette espèce. Ce programme fut réalisé par le Syndicat, en collaboration avec plusieurs laboratoires de recherche.

En 2001, les conclusions de l'étude de faisabilité étant plutôt positives, le SMEL proposait à Biosyn de passer à la définition des paramètres d'élevage, et ainsi confirmer en améliorant les résultats acquis à échelle semi-industrielle. Cependant, après un an de réflexion, Biosyn décida de mettre un terme à ce programme pour des raisons de stratégie d'entreprise.

#### Abstract :

The *Megathura crenulata* program was introduced to the SMEL in 1993 at the request of the pharmaceutical company Biosyn Arzneimittel GmbH, situated around Stuttgart (Germany). This company possesses a patent of extraction of a molecule of the hémolymphe of this mollusk whose coming from coasts of California (USA), the hémocyanine, with anticancerous properties.

At first, the works concerned the stalling of animals. Indeed, once sinned, they were stored in insufficient conditions to guarantee the integrity of the molecule. After 18 months of studies, and in view of its experience(experiment) on the closed circuit, the SMEL was able to finalize(to work out) a method of stalling which allowed to keep(preserve) animals in captivity several days without that the hémocyanine undergoes some degradation. Afterward, Biosyn installed(settled) a unity(unit) of stalling of animals pré--ponctionnables in California on the model of the installations of the SMEL.

Further to these works, Biosyn wished to pursue these studies by directing them to the definition of the parameters of breeding. So from 1995 till 2001, the studies concerned four big subjects: the definition of the conditions bioticks of the animal, the control(master's degree) of the cycle of reproduction, the knowledge of the mode and the diet and the optimization of the growth and the control(master's degree) of the mortality. The biological knowledge on *Megathura crenulata* being very weak, the SMEL engaged(started) a research program intended to evolve the feasibility of the breeding of this sort. This program was realized by the Labor union(Syndicate) and in association with several research laboratories.

In 2001, the conclusions of the feasibility study being rather positive, the SMEL suggested to Biosyn passing in the definition of the parameters of breeding, and so to confirm by improving the results(profits) acquired in partly industrialized scale(ladder). However, after one year of reflection, Biosyn decided to put an end in this of strategy of company.

**Mots clés :** *Megathura crenulata*, élevage, circuit fermé, stabulation, reproduction, alimentation, croissance.

|                                                                                                            |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Table des photographies.....                                                                               | 5         |
| Table des schémas.....                                                                                     | 6         |
| Table des graphiques.....                                                                                  | 6         |
| Table des tableaux.....                                                                                    | 6         |
| Table des cartes.....                                                                                      | 7         |
| <b>CHAPITRE 1 / INTRODUCTION.....</b>                                                                      | <b>8</b>  |
| <b>CHAPITRE 2 / LA BIOLOGIE DE MEGATHURA CRENULATA.....</b>                                                | <b>12</b> |
| II.1. Présentation de l'animal.....                                                                        | 12        |
| II.2. Les conditions biotiques.....                                                                        | 14        |
| II.2.1. Répartition bathymétrique.....                                                                     | 14        |
| II.2.2. Répartition géographique .....                                                                     | 15        |
| II.2.3. Température, salinité, ensoleillement et turbidité. ....                                           | 15        |
| II.2.5. Environnement, faune et flore associées.....                                                       | 17        |
| Aphropidae sp .....                                                                                        | 19        |
| Aureliana sp .....                                                                                         | 19        |
| Aureliana sp .....                                                                                         | 19        |
| Clavelina sp.....                                                                                          | 19        |
| II.3. Reproduction : cycle et stades larvaires. ....                                                       | 20        |
| II.3.1. Le cycle chez <i>Haliotis rufescens</i> en Californie et chez les fissurellidés dans le monde..... | 20        |
| II.3.2. Etude du cycle reproducteur.....                                                                   | 21        |
| II.3.3. Fécondation.....                                                                                   | 26        |
| II.3.4. Développement larvaire. ....                                                                       | 27        |
| II.4 Alimentation.....                                                                                     | 28        |
| II.4.1. Bibliographie : l'alimentation chez les fissurelles.....                                           | 28        |
| II.4.2. Etude de la radula.....                                                                            | 28        |
| II.4.3. Etude des enzymes digestives.....                                                                  | 31        |
| II.4.4. Les contenus stomacaux.....                                                                        | 33        |
| II.4 Biologie générale et croissance.....                                                                  | 36        |
| II.4.1. Biologie générale.....                                                                             | 36        |
| II.4.2. Croissance. ....                                                                                   | 37        |
| <b>CHAPITRE 3 / MISE AU POINT DES PARAMETRES DE STABULATION.....</b>                                       | <b>39</b> |
| III.1. Objectifs.....                                                                                      | 39        |
| III.2 Calendrier et budget. ....                                                                           | 39        |
| III.3 Le cadre expérimental .....                                                                          | 40        |
| III.3.1. Les équipements expérimentaux. ....                                                               | 40        |
| III.3.2. Gestion du risque sanitaire .....                                                                 | 41        |
| III.4 Résultats .....                                                                                      | 41        |
| III.4.1. L'alimentation. ....                                                                              | 41        |
| III.4.2. Maintien de la molécule. ....                                                                     | 44        |
| III.4.3. Conclusions. ....                                                                                 | 45        |
| <b>CHAPITRE 4 / DEFINITION DES PARAMETRES D'ELEVAGE EN CIRCUIT FERME.....</b>                              | <b>47</b> |
| IV.1. Objectifs.....                                                                                       | 47        |
| IV.2. Calendrier et budget.....                                                                            | 47        |
| IV.3. Les moyens techniques. ....                                                                          | 48        |
| IV.3.1. La gestion du confinement. ....                                                                    | 48        |
| IV.4. Les paramètres d'élevage.....                                                                        | 50        |
| IV.4.1 Paramètres physico-chimiques et bactériens.....                                                     | 50        |
| IV.4.2 Les facteurs de croissance.....                                                                     | 60        |
| <b>CHAPITRE 5 / DEVELOPPEMENT ET CONSEIL A L'ENTREPRISE.....</b>                                           | <b>74</b> |
| V.1. Objectifs.....                                                                                        | 74        |
| V.2. Calendrier et budget .....                                                                            | 74        |
| V.3. Résultats.....                                                                                        | 75        |
| V.3.1. Pré-étude de stock. ....                                                                            | 75        |
| V.3.2. Conseil technologique.....                                                                          | 76        |
| <b>CHAPITRE 6 / CONCLUSION.....</b>                                                                        | <b>78</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>                                                                                  | <b>80</b> |

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### Table des photographies.

| N° photo          | Intitulé de la photo                                                                        | Source                                           | Page |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------|
| <b>Photo 1 :</b>  | <i>Megathura crenulata</i>                                                                  | SMEL                                             | 8    |
| <b>Photo 2 :</b>  | Hémocyanine purifiée                                                                        | Biosyn                                           | 8    |
| <b>Photo 3 :</b>  | <i>Megathura crenulata</i> adulte de couleur nommée « tigrée »                              | internet                                         | 12   |
| <b>Photo 4 :</b>  | Le mollusque dans son milieu naturel                                                        | SMEL                                             | 14   |
| <b>Photo 5 :</b>  | <i>M. crenulata</i> dans une zone rocheuse de faune encroûtante                             | SMEL                                             | 17   |
| <b>Photo 6 :</b>  | Vue d'une « kelp forest »                                                                   | Internet                                         | 17   |
| <b>Photo 7 :</b>  | Anémone                                                                                     | Université Vannes                                | 19   |
| <b>Photo 8 :</b>  | Ascidie                                                                                     | Université Vannes                                | 19   |
| <b>Photo 9 :</b>  | Polychète                                                                                   | Université Vannes                                | 19   |
| <b>Photo 10 :</b> | Bivalve                                                                                     | Université Vannes                                | 19   |
| <b>Photo 11 :</b> | <i>Haliotis rufescens</i>                                                                   | Internet                                         | 20   |
| <b>Photo 12 :</b> | <i>H. rufescens</i> dans son habitat                                                        | Internet                                         | 20   |
| <b>Photo 13 :</b> | Coupe histologique de gonade mâle                                                           | SMEL                                             | 21   |
| <b>Photo 14 :</b> | Coupe histologique de gonade femelle                                                        | SMEL                                             | 21   |
| <b>Photo 15 :</b> | Coupe histologique de gonade mâle                                                           | Université Nantes                                | 22   |
| <b>Photo 16 :</b> | Coupe histologique de gonade femelle                                                        | Université Nantes                                | 22   |
| <b>Photo 17 :</b> | Tests histo chimique de la gangue                                                           | Université Nantes                                | 23   |
| <b>Photo 18 :</b> | Exemple de visualisation de contrôle sous microscope des œufs de <i>Megathura crenulata</i> | SMEL                                             | 26   |
| <b>Photo 19 :</b> | Fluorescence au DAPI - 5 min après éclosion                                                 | SMEL                                             | 26   |
| <b>Photo 20 :</b> | Fluorescence au DAPI - 90 min après fécondation                                             | SMEL                                             | 26   |
| <b>Photo 21 :</b> | Radula de <i>Megathura crenulata</i>                                                        | SMEL                                             | 30   |
| <b>Photo 22 :</b> | Vue d'ensemble de la radula                                                                 | Université Vannes                                | 31   |
| <b>Photo 23 :</b> | Détail du cartilage odontophore                                                             | Université Vannes                                | 31   |
| <b>Photo 24 :</b> | Détail des dents radulaires                                                                 | Université Vannes                                | 31   |
| <b>Photo 25 :</b> | Bryozoaire : <i>Filicrisia franciscana</i>                                                  | Université Vannes                                | 34   |
| <b>Photo 26 :</b> | Bivalve : <i>Hiatella</i> sp                                                                | Université Vannes                                | 34   |
| <b>Photo 27 :</b> | Bivalve : <i>Saxicava</i> sp                                                                | Université Vannes                                | 34   |
| <b>Photo 28 :</b> | Ostracode : non déterminé                                                                   | Université Vannes                                | 34   |
| <b>Photo 29 :</b> | Foraminifère : <i>Trochammina pacifica</i>                                                  | Université Vannes                                | 34   |
| <b>Photo 30 :</b> | Algues calcaires : <i>Lithothamniée</i>                                                     | Université Vannes                                | 34   |
| <b>Photo 31 :</b> | Boudin de mucus retrouvé dans le système digestif                                           | Université Vannes                                | 35   |
| <b>Photo 32 :</b> | <i>Fissurella picta</i> Bruguière (1791)                                                    | Internet                                         | 36   |
| <b>Photo 33 :</b> | <i>M. crenulata</i> disséqué                                                                | SMEL                                             | 36   |
| <b>Photo 34 :</b> | Système digestif seul de <i>M. crenulata</i> .                                              | SMEL                                             | 37   |
| <b>Photo 35 :</b> | Etude de la rythmicité de la striation de la coquille de <i>M. crenulata</i>                | Université Orsay                                 | 37   |
| <b>Photo 36 :</b> | Structure de stabulation                                                                    | SMEL                                             | 40   |
| <b>Photo 37 :</b> | Disposition dans les lignes d'eau.                                                          | SMEL                                             | 40   |
| <b>Photo 38 :</b> | Crabe décortiqué                                                                            | SMEL                                             | 44   |
| <b>Photo 39 :</b> | Présentation des crabes dans la structure                                                   | SMEL                                             | 44   |
| <b>Photo 40 :</b> | Biosyn corporation (Carlsbad - Californie).                                                 | <a href="http://www.biosyn.de">www.biosyn.de</a> | 45   |
| <b>Photo 41 :</b> | Exemple de visualisation de contrôle sous microscope des œufs de <i>Megathura crenulata</i> | SMEL                                             | 58   |
| <b>Photo 42 :</b> | Installation de l'écloserie au SMEL.                                                        | SMEL                                             | 58   |
| <b>Photo 43 :</b> | Type de panier d'élevage de juvéniles                                                       | SMEL                                             | 65   |
| <b>Photo 44 :</b> | Présentation de l'aliment artificiel.                                                       | SMEL                                             | 68   |

### Table des schémas.

|                    |                                                                                        |                   |    |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|----|
| <b>Schéma 1 :</b>  | Structure tertiaire d'une molécule desoxygénée d'hémocyanine d'arthropode              | Biosyn            | 8  |
| <b>Schéma 2 :</b>  | Structure de l'hémocyanine.                                                            | Biosyn            | 9  |
| <b>Schéma 3 :</b>  | Formules dentaires de <i>H. tuberculata</i> , <i>M. crenulata</i> et <i>P. vulgata</i> | SMEL              | 29 |
| <b>Schéma 4 :</b>  | Vue d'ensemble de la radula                                                            | Université Vannes | 31 |
| <b>Schéma 5 :</b>  | Coupe transversale de la radula                                                        | Université Vannes | 31 |
| <b>Schéma 6 :</b>  | Structure de stabulation                                                               | SMEL              | 40 |
| <b>Schéma 7 :</b>  | Local de quarantaine                                                                   | SMEL              | 49 |
| <b>Schéma 8 :</b>  | Protocole d'induction de ponte                                                         | SMEL              | 57 |
| <b>Schéma 9 :</b>  | Zone d'introduction de la seringue                                                     | SMEL              | 57 |
| <b>Schéma 10 :</b> | Exemple d'implantation d'une ferme                                                     | SMEL              | 71 |

### Table des graphiques.

|                       |                                                                                                       |    |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Graphique 1 :</b>  | Répartition de couleur de manteau sur 109 animaux prélevés par le SMEL                                | 12 |
| <b>Graphique 2 :</b>  | Température de l'eau à San Diego, à une profondeur de 6,50 mètres, entre janvier 1995 et juin 1997.   | 16 |
| <b>Graphique 3 :</b>  | Photopériode naturelle en Californie et en Normandie                                                  | 16 |
| <b>Graphique 4 :</b>  | Pourcentage des différentes cellules dans la gonade mâle                                              | 22 |
| <b>Graphique 5 :</b>  | Pourcentage des différentes cellules dans la gonade femelle                                           | 22 |
| <b>Graphique 6 :</b>  | Suivi individuel de l'indice gonadique en poids sec                                                   | 24 |
| <b>Graphique 7 :</b>  | Pourcentage saisonnier de chaque élément (en masse) composant un animal                               | 25 |
| <b>Graphique 8 :</b>  | Quantification d'enzymes digestives chez <i>M. crenulata</i> et <i>H. tuberculata</i> .               | 32 |
| <b>Graphique 9 :</b>  | Répartition du budget pour la période 1993 - 1994.                                                    | 40 |
| <b>Graphique 10 :</b> | Répartition financière entre SMEL et Biosyn (1995-2001).                                              | 48 |
| <b>Graphique 11 :</b> | Température de la structure prégrossissement / grossissement                                          | 52 |
| <b>Graphique 12 :</b> | Salinité de la structure prégrossissement / grossissement                                             | 52 |
| <b>Graphique 13 :</b> | Suivi du potentiel Hydrogène dans la structure entre 1997 et 2001                                     | 53 |
| <b>Graphique 14 :</b> | Suivi des composés azotés dans la structure de prégrossissement entre 1997 et 2001                    | 54 |
| <b>Graphique 15 :</b> | Suivi de la flore bactérienne et vibrios entre 1977 et 2001                                           | 55 |
| <b>Graphique 16 :</b> | Poids moyen des 9 animaux suivis entre novembre 1995 et décembre 1996                                 | 62 |
| <b>Graphique 17 :</b> | Suivi de la croissance pondérale du lot E 96.11                                                       | 64 |
| <b>Graphique 18 :</b> | Suivi de la croissance du lot E 95.10 entre octobre 1996 et novembre 2001                             | 65 |
| <b>Graphique 19 :</b> | Nombre d'individus au cours du suivi                                                                  | 66 |
| <b>Graphique 20 :</b> | Aliments artificiels : évolution pondérale par représentation graphique et intervalles de confiances. | 68 |

### Table des tableaux.

|                     |                                                                                                                  |    |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tableau 1 :</b>  | Classification de <i>Megathura crenulata</i> .                                                                   | 12 |
| <b>Tableau 2 :</b>  | Valeurs des constantes ( $Y=aX$ ) et du coefficient de corrélation des équations biométriques...                 | 13 |
| <b>Tableau 3 :</b>  | Comparaison de deux biotopes de <i>Megathura crenulata</i> .                                                     | 18 |
| <b>Tableau 4 :</b>  | Formules dentaires des 3 espèces.                                                                                | 30 |
| <b>Tableau 5 :</b>  | Variation de poids selon l'alimentation                                                                          | 42 |
| <b>Tableau 6 :</b>  | Synthèse des tests d'appétences à divers aliments.                                                               | 43 |
| <b>Tableau 7 :</b>  | Timing du développement larvaire de la fécondation au stade juvénile formé.                                      | 59 |
| <b>Tableau 8 :</b>  | Comparatif de croissance et mortalité entre deux pontes.                                                         | 60 |
| <b>Tableau 9 :</b>  | Gain de croissance en fonction de l'alimentation (lot E 96.11)                                                   | 64 |
| <b>Tableau 10 :</b> | Pente de courbe sur deux périodes                                                                                | 66 |
| <b>Tableau 11 :</b> | Comparatif des taux de croissance linéaire (en %age / jour) entre la fissurelle américaine et l'ormeau européen. | 69 |
| <b>Tableau 12 :</b> | Calendrier des ponctions effectuées en 2001.                                                                     | 70 |
| <b>Tableau 13 :</b> | Prévisionnel de couts d'une unité expérimentale de production                                                    | 72 |
| <b>Tableau 14 :</b> | Détails des différents cadrats effectués par le SMEL en Californie.                                              | 76 |

### Table des cartes.

|                  |                                                                                   |    |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Carte 1 :</b> | Répartition géographique de <i>Megathura crenulata</i> sur la côte californienne. | 15 |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----|

## CHAPITRE 1 / INTRODUCTION.



Photo 1 : *Megathura crenulata*

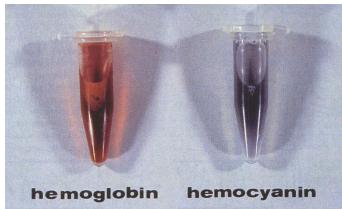


Photo 2 : Hémocyanine purifiée (à droite)

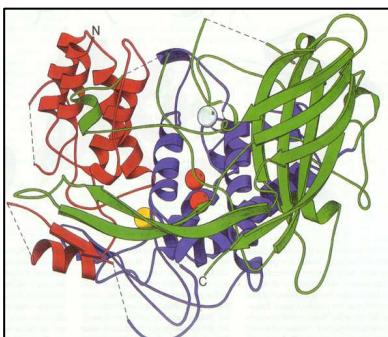


Schéma 1 : structure tertiaire d'une molécule desoxygénée d'hémocyanine d'arthropode

Cette molécule contient 3 domaines (caractérisés ici par les 3 couleurs rouge, bleue et verte). Le domaine central en bleu contient le centre actif avec les 2 ions de cuivre (2 boules en rouge), qui s'éloignent quand s'intercale une molécule d'oxygène. En bleu est représenté un ion calcium et en jaune, un ion chlorure. Ce schéma est dessiné par Kâthe Rehbinder, d'après un graphique sur ordinateur de K. Magnus, W. Hol & Co.

La société pharmaceutique allemande **BIOSYN ARZNEIMITELL GmbH**, basée à Fellbach, près de Stuttgart, est spécialisée dans la biopharmacie. Elle a déjà mis au point nombre de produits dont les principes actifs sont des molécules provenant de plantes ou d'animaux. L'une de ces molécules utilisées est l'**hémocyanine**, extraite d'un archéogastéropode endémique de la Californie, *Megathura crenulata* (de la Baja California au Mexique jusqu'au niveau de Los Angeles aux Etats-Unis) (cf. photo 1). Cette protéine, présente dans l'hémolymphe des mollusques et des crustacés, capte l'oxygène pour le transporter aux tissus (rôle de l'hémoglobine chez les mammifères) (cf. photo 2). Cette métallo-protéine, articulée autour d'une molécule de cuivre, est une molécule de grosse taille (cf. schéma 1 et 2), rendant compliquée, voire impossible, sa biosynthèse au début des années 1990.

Depuis une quarantaine d'années, de nombreuses équipes de recherches travaillent sur cette molécule. Cette protéine est utilisée pour ses vertus en immunothérapie. Le support biologique, *Megathura crenulata*, a été choisi par une équipe de recherche californienne, qui fut la première à travailler sur le sujet. Elle voyait en ce mollusque un double avantage : la proximité pour son approvisionnement et sa grande taille. Cependant, des études sur cette molécule sont conduites par les chercheurs sur d'autres invertébrés marins comme les limules, les apladies et même les ormeaux.

A la suite de ces années de recherches aux Etats-Unis, puis partout dans le monde, la société Biosyn, en collaboration avec le laboratoire du Pr. Jorgen MARKL de l'Université de Mainz (Allemagne), a lancé une recherche sur la purification de cette molécule, ainsi que l'élaboration de deux médicaments. Après avoir obtenu une license d'extraction de la molécule, cette recherche permet aujourd'hui à

l'entreprise de commercialiser la protéine purifiée à différents laboratoires de recherches universitaires ou privés. Elle propose également deux médicaments :

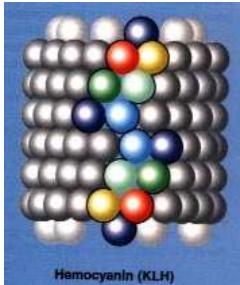


Schéma 2 : structure de l'hémocyanine. En couleur, son principe actif.

1. **IMMUCOTHEL** : il prévient les récidives de cancer de la vessie et de l'urètre en activant le système immunitaire humain. Il est homologué aux Pays-Bas.
2. **VACCUM** : Selon le même principe actif que Immucothel, il est utilisé comme transporteur de vaccines (permet de franchir les barrières immunitaires à des molécules chimiques). En 2000, les tests cliniques étaient en cours en oncologie, allergologie et virologie.

Au début des années 1990, pour assurer son approvisionnement en matière première, Biosyn faisait pêcher les mollusques, aux USA puis les importait en Allemagne où ils étaient stockés dans de grands aquariums. Cependant, les conditions de stabulation étaient insuffisantes : la mortalité était élevée et, l'intégrité de l'hémocyanine n'était pas conservée. Ayant eu connaissance des activités du SMEL, notamment sur l'élevage en circuit fermé de l'haliotide *Haliotis tuberculata*, espèce assez proche de *Megathura crenulata*, Biosyn contactait le SMEL afin qu'une collaboration puisse naître entre la société allemande et le centre expérimental du SMEL. Un programme fut défini en 1993. Il avait pour objectif de **définir les paramètres permettant de stabuler les fissurelles géantes dans de bonnes conditions**. Le programme de recherche comportait plusieurs aspects :

- Une revue des connaissances par une étude bibliographique couplée à des observations de terrain.
- Une définition du spectre alimentaire sur un plan qualitatif et quantitatif.
- Un suivi de la qualité de l'hémocyanine.
- Une estimation des coûts de stabulation.

Ce programme a débuté en Septembre 1993 pour une durée de 16 mois (convention du 07 juillet 1993 et avenants 1 et 2).

Les résultats positifs de cette première étude ont conduit Biosyn à demander au SMEL la poursuite du projet (avenant 3 à 6 à la convention de 1993 et convention 1999-2001). L'objectif était d'évaluer les paramètres de faisabilité d'un élevage de *Megathura crenulata* en circuit fermé, sur le modèle de l'élevage des ormeaux développé par le centre expérimental du SMEL. Ces travaux furent conduits entre Janvier 1995 et Décembre 2001. Durant ces sept années, quatre axes de recherche ont été explorés :

1. Identification des conditions biotiques des animaux en élevage.
2. Détermination du cycle de reproduction et maîtrise de la phase d'écloserie.
3. Poursuite des travaux engagés lors de la première coopération sur l'alimentation afin d'adapter celle-ci aux conditions d'élevage.
4. Optimisation de la durée de l'élevage et de la mortalité.

Cet axe étant en étroite relation avec les études portant sur les conditions biotiques et l'alimentation.

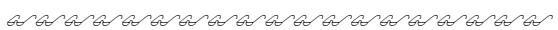
Dans le même temps, Biosyn a demandé au SMEL de la conseiller dans son analyse des différentes sources d'approvisionnements *in situ*. Dans ce cadre, des agents du SMEL se sont déplacés en Californie pour rencontrer les pêcheurs et autres professionnels afin d'évaluer l'état des connaissances. Ils ont par ailleurs exploré différents biotopes de *Megathura* et acquis ainsi des connaissances supplémentaires en matière d'écologie.

Ces travaux concluaient à la faisabilité de l'élevage de cette espèce et l'étape concernant la définition des paramètres d'élevage pouvait être engagée. Ainsi, le SMEL proposa la mise en place d'une unité d'élevage expérimental, ayant un double objectif : définir la zootechnie et

engager à petite échelle, une production. Cependant, pour des raisons de stratégie d'entreprise, Biosyn décidait, en 2002, d'arrêter certains programmes recherche et développement, dont celui concernant le programme *Megathura crenulata*.

Ce présent document résume l'ensemble des travaux conduits entre 1993 et 2001 par l'équipe technique du SMEL, seule ou en collaboration avec certains partenaires scientifiques. Dans la plupart des domaines, la présentation des résultats ne sera pas développée et renverra le lecteur à des rapports techniques disponibles au centre expérimental du SMEL. La présentation de l'étude est découpée en quatre grands thèmes :

1. **La biologie de *Megathura crenulata***: Les recherches conduites sur neuf années permirent d'étoffer une maigre bibliographie et servirent d'appuis à la définition des aspects techniques de l'élevage.
2. **La stabulation** : Ce programme eut lieu entre septembre 1993 et décembre 1994. Il devait améliorer la qualité de stockage des animaux avant ponction de leur hémolymphé.
3. **La définition des paramètres d'élevage** : Cette opération fait suite à l'étude sur la stabulation et s'est poursuivie jusqu'en 2001. Elle a permis d'identifier les principaux facteurs permettant l'obtention d'animaux « ponctionnables » à partir des larves obtenues en écloserie.
4. **Le développement et conseil** : Pour différents domaines, la société Biosyn a sollicité les agents du SMEL afin de les guider dans leur choix aquacole, domaine qui ne leur était pas familier. Ces interventions furent ponctuelles au cours de ces neuf années.



## CHAPITRE 2 / LA BIOLOGIE DE MEGATHURA CRENULATA.

### II. 1. Présentation de l'animal.

*Megathura crenulata* est un mollusque de la classe des gastéropodes, et plus précisément des archéo-gastéropodes. Il fait partie de la famille des fissurellidés, caractérisée par des animaux ayant un trou apical légèrement porté sur l'avant de l'animal. Cette famille est divisée principalement en deux sous-familles : les fissurelles et les diodorines. *Megathura crenulata* fait partie de cette dernière sous-famille (cf. tableau 1).

| Nom scientifique | <i>Megathura crenulata</i> SOWERBY (1825) |
|------------------|-------------------------------------------|
|------------------|-------------------------------------------|

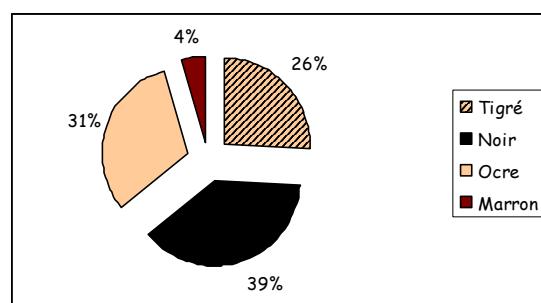
|                   |                                                   |
|-------------------|---------------------------------------------------|
| embranchemen      | mollusque                                         |
| sous-embranchemer | conchifère                                        |
| classe            | gastéropode                                       |
| sous-classe       | prosobranche                                      |
| ordre             | diotocarde                                        |
| super-famille     | pleurotomariaidé                                  |
| famille           | fissurellidé                                      |
| sous-famille      | diodorine                                         |
| genre             | <i>Megathura</i>                                  |
| synonymes         | <i>Lucipina crenulata</i><br>giant keyhole limpet |

Linder (1975)

Tableau 1 : Classification de *Megathura crenulata*



Photo 3 : *Megathura crenulata* adulte de couleur nommée « tigrée »



Graphique 1 : répartition de couleur de manteau sur 109 animaux prélevés par le SMEI

Un *Megathura crenulata* adulte (cf. photo 3), dans la nature, a un poids moyen d'environ 250 à 300 g. Cependant, certains spécimens peuvent atteindre 400 g, et les plongeurs de la société Marinus ont un record de 600 g. La coquille, généralement recouverte par un manteau, a une longueur moyenne de 9 cm, pour une largeur de 5,5 cm et une hauteur de 2 cm. Le manteau peut prendre plusieurs couleurs (graphique 1) sans qu'il ne s'agisse d'un quelconque dimorphisme particulier.

Dans le cadre d'une expérimentation sur le volume gonadique (cf. II.3.2.2. « Etude de la variabilité annuelle du volume gonadique »), une centaine de mollusque furent disséqués entre avril 1998 et septembre 2000. Chaque compartiment de la fissurelle fut séparé, pesé et séché de manière à faire également des rapports de biométrie, comme le montre le tableau 2.

| <i>Y</i>                | <i>X</i>                | <i>a</i> | <i>r</i> <sup>2</sup> | <i>a</i> | <i>r</i> <sup>2</sup> |
|-------------------------|-------------------------|----------|-----------------------|----------|-----------------------|
| Largeur                 | Longueur                | 0,621    | 0,98                  | 0,673    | 0,95                  |
| Hauteur                 | Longueur                | 0,219    | 0,77                  | 0,239    | 0,73                  |
| Poids frais de muscle   | Poids frais total       | 0,547    | 0,79                  | 0,412    | 0,82                  |
| Poids frais de coquille | Poids frais total       | 0,093    | 0,24                  | 0,303    | 0,84                  |
| Poids frais de viscères | Poids frais total       | 0,062    | 0,51                  |          |                       |
| Poids frais de gonades  | Poids frais total       | 0,060    | 0,21                  | 0,176    | 0,84                  |
| Poids sec de muscle     | Poids sec total         | 0,342    | 0,67                  | 0,237    | 0,75                  |
| Poids sec de coquille   | Poids sec total         | 0,515    | 0,59                  | 0,674    | 0,95                  |
| Poids sec de viscères   | Poids sec total         | 0,064    | 0,44                  |          |                       |
| Poids sec de gonades    | Poids sec total         | 0,078    | 0,29                  | 0,089    | 0,67                  |
| Poids sec de muscle     | Poids frais de muscle   | 0,109    | 0,61                  | 0,230    | 0,97                  |
| Poids sec de coquille   | Poids frais de coquille | 0,962    | 0,99                  | 0,875    | 0,98                  |
| Poids sec de viscères   | Poids frais de viscères | 0,180    | 0,79                  |          |                       |
| Poids sec de gonades    | Poids frais de gonades  | 0,224    | 0,97                  | 0,203    | 0,86                  |

Tableau 2 : valeurs des constantes ( $Y=aX$ ) et du coefficient de corrélation des équations biométriques pour la population de *Megathura crenulata* de Los Angeles (109 individus) comparée à la populations d'ormeaux de l'archipel de Chausey (O. Basuya, 1997)

Il en ressort que pour une diodorine d'environ 250g, le muscle (pied et manteau) représente 137g (55%), la coquille 23g (9%), le système digestif (ou viscères) 15g (6%), et la gonade 15g (6%). L'eau est présente à hauteur de 24%, soit 60g. La composante muscle représente une partie plus importante chez *Megathura crenulata* que *Haliotis tuberculata*, que ce soit en poids frais ou en poids sec. Pourtant, le rapport poids sec sur poids frais est deux fois plus important chez l'ormeau que chez la diodorine dont le pied est plus « spongieux », constitué de nombreuses vacuoles. Il en fait l'animal idéal pour être ponctionné sans être détruit.

## II.2. Les conditions biotiques.

### II.2.1. Répartition bathymétrique.

Dans la plupart des cas, la fissurellide se trouve au niveau de l'étage infra-littoral et sub-littoral supérieur, sur la zone rocheuse. Comme toujours, l'emplacement d'une fissurellide est déterminé par la présence d'alimentation. *Fissurella spp.*, au Chili, répond à cette loi de la nature et les juvéniles sont plus abondants là où l'on trouve l'algue *Gelidium chilense* (S.A. Gonzalez, 1991). Une étude comparative de trois types de fissurelles (C.J. Franz, 1990) sur l'estran d'une île vénézuélienne montre que les animaux ont des préférences bien marquées : *Fissurella nimbosa*, *Fissurella nodosa* et *Fissurella barbadensis* ont des préférences alimentaires distinctes ; la résultante directe est qu'il existe des niches écologiques différentes pour ces trois espèces. *Megathura crenulata* répond à cette logique, il est le plus abondant dans la zone des dix mètres, là il trouve la faune encroûtante, sa nourriture de prédilection (cf. photo 4).



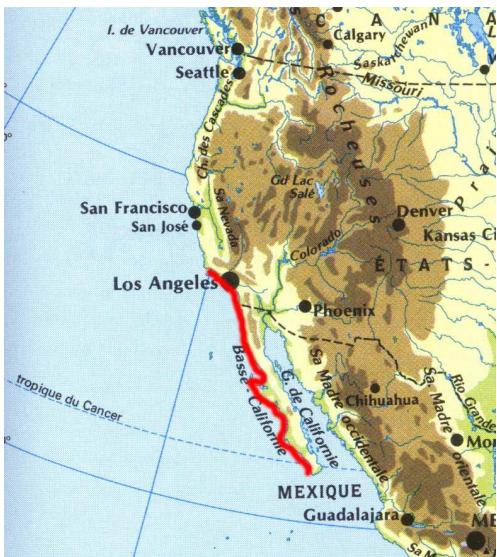
**Photo 4 :** le mollusque dans son milieu naturel.

Ces gastéropodes peuplent les fonds durs, roches et éboulis, proches de la limite inférieure du niveau de la basse mer de vives eaux (le marnage est d'environ 3 à 4 mètres) et jusqu'à 20 mètres de profondeur. Il semble qu'il soit possible d'en repérer jusque dans la zone des 40 mètres (communication R. Rhode, Sté Marinus). Cependant, lors de leurs plongées, tant sur Los Angeles, San Diego ou les « channel islands », les scientifiques du SMEL ont noté les densités les plus importantes et les animaux les plus gros pour des bathymétries comprises entre 6 et 10 mètres, voire jusqu'à 20 mètres dans la zone de San Diego. Ces zones sont extrêmement battues par la houle du Pacifique. Des mesures effectuées par cadrats ont donné une densité d'une fissurellidé pour 10m<sup>2</sup> dans les zones étudiées. En comparaison, les densités maximales observées chez *Haliotis tuberculata* dans la zone Manche Ouest sont d'un haliotide par m<sup>2</sup> (Richard, 1988).

## II.2.2. Répartition géographique

*Megathura crenulata* est une espèce endémique des côtes californiennes. Elle se répartit entre la latitude de Los Angeles aux Etats-Unis et le sud de Basse Californie au Mexique (cf. carte 1).

Cependant, étant donné que la société Biosyn est implantée aux Etats-Unis, par l'intermédiaire de sa filiale Biosyn corporation à Carlsbad (entre Los Angeles et San Diego), les données recueillies sur le milieu naturel ne concernent que la Côte des Etats-Unis. De par le peu d'informations acquises, toute la partie mexicaine, la plus importante, est totalement occultée dans ce rapport. En effet, le SMEL n'a pu travailler qu'en relation avec la société Biosyn par l'intermédiaire de leur filiale américaine. Par choix d'entreprise, Biosyn a exclu de travailler sur la partie mexicaine. En conséquence, toutes les données fournies dans ce rapport ne concernent que la partie américaine, qui est la limite nord de l'aire de répartition de cet animal. Il est pensable que les conditions soient différentes en Baja California, voire même plus favorables à leur développement.



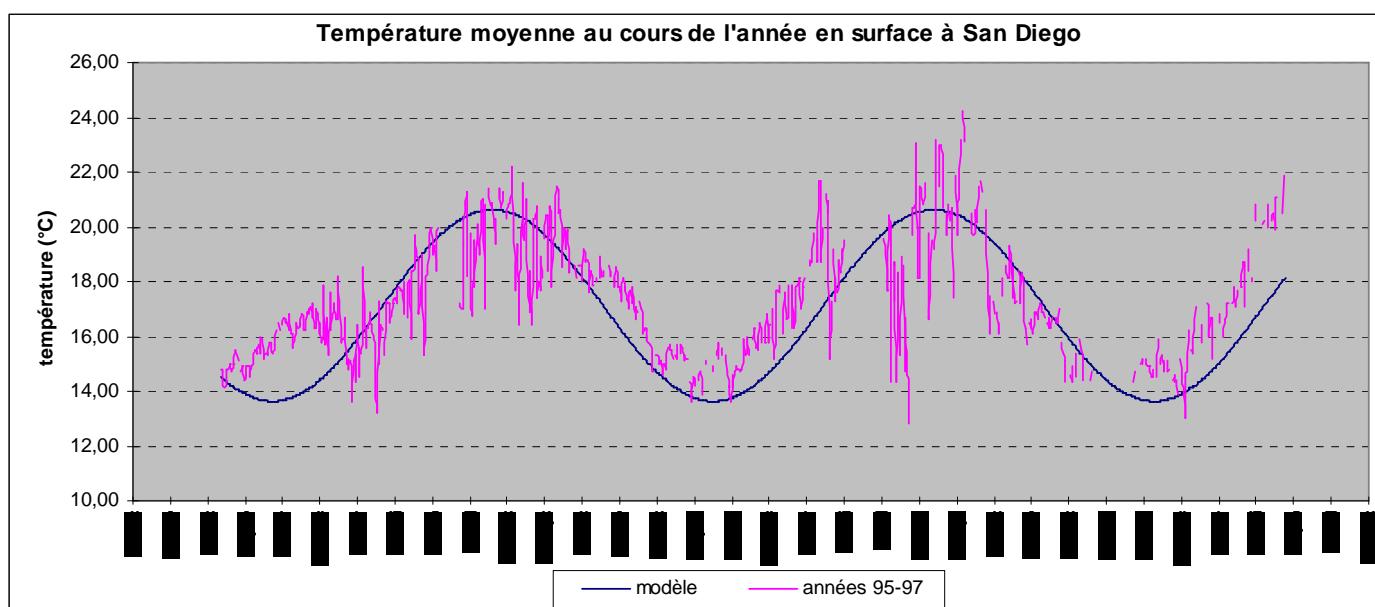
Carte 1 : répartition géographique (trait rouge) de *Megathura crenulata* sur la côte californienne

## II.2.3. Température, salinité, ensoleillement et turbidité.

Les températures rapportées dans le graphique 2 sont issues du site internet du SCRIPPS de San Diego (Californie - USA), diffusées quotidiennement. Elles ont été relevées entre le 01 janvier 1995 et le 31 mai 1997, à une profondeur de 6,50 mètres. A partir de ces données, un modèle a été créé, donnant ainsi une température théorique. On peut voir que, durant ces trente mois de suivi, l'amplitude maximale observée fut de 9°C (13°C - 24°C) et de 7°C en moyenne (14°C - 21°C) Ainsi, les mollusques vivent dans des eaux tempérées.

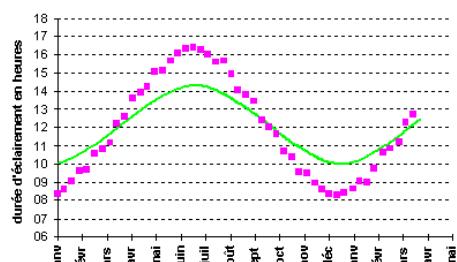
Les eaux californiennes sont des eaux océaniques (cf. carte 1 page 15), et la salinité y est constante, de l'ordre de  $33,5 \text{ g.l}^{-1}$  (Communication Marinus).

Pour la zone considérée, soit la région de Los Angeles, la photopériode est de l'ordre de 10 / 14, soit 10 heures de nuit l'été contre 14 heures l'hiver. Le graphique 3 montre son évolution au cours de l'année, en comparaison avec la situation en Normandie. Cependant, cette zone pour la fissurelle est la plus nordique de sa répartition, et la situation au Mexique est plus proche d'une périodicité 12 / 12. Somme



**Graphique 2 :** Température de l'eau à San Diego, à une profondeur de 6,50 mètres, entre janvier 1995 et juin 1997. toute, on voit que l'ensoleillement est un facteur relativement stable dans cette région.

Les données sur la turbidité proviennent des observations effectuées par les scientifiques du SMEC *in situ*, et de l'expérience des plongeurs scientifiques interrogés sur place (R. Rhode de la société Marinus et S. Le Page de la société M-REP). L'eau est généralement claire, mais avec beaucoup de particules en suspension. Toutefois, il est possible que l'eau soit trouble, voire très trouble, surtout lorsque les courants dominants sont modifiés par le phénomène El Niño.



**Graphique 3 :** Photopériode naturelle en Californie (en vert) et en Normandie (en rose)

## II.2.5. Environnement, faune et flore associées

Lors des investigations *in situ* des agents du SMEL, deux biotopes furent observés. L'un est constitué de fonds de roches (cf. photo 5), caractérisé par des densités importantes d'oursins, notamment *Strongylocentrotus purpuratus* (oursin violet) en très grande quantité accompagné de *Strongylocentrotus franciscanus* (oursin rouge de taille plus importante). La population algale y est très faible, composée d'algues vertes en tapis sur le rocher. Par contre, la faune fixée et encroûtante tient une place très importante et spatialement dominante.

L'autre biotope observé est la forêt de « kelp », caractéristique de la côte californienne (cf. photo 6). Sur un sol composé d'éboulis, proche du littoral et au pied des falaises, les algues brunes (*Macrocystis pyrifera*) ont une pousse très rapide (jusqu'à 60 cm par jour) et atteignent la surface où elles continuent leur croissance en flottant sur l'eau. La densité d'oursins est moins importante, tout comme la faune fixée et encroûtante. Les algues empêchent la luminosité de passer, et elles ralentissent la houle, donnant un milieu moins mouvementé.

Ces deux sites ont été observés à chaque saison, entre juin 1999 et septembre 2000. Il est apparu que le milieu ne subissait pas de changement visible. La faune et la flore étaient présente et constante au cours de cette investigation.

La composition du biotope a une incidence sur la taille des fissurelles prélevées. Sur la zone de roches, les prélèvements ont donné des animaux d'environ 250 grammes (50 individus prélevés au total), quelle que soit la période ; tandis que dans la forêt de kelp, les adultes avaient une moyenne de 120 grammes (20 individus prélevés). Par contre, la forêt de « kelp » permet de prélever des juvéniles, pratiquant le « homing » sous les cailloux, ce qui n'a pas été le cas sur la zone de roches. Deux hypothèses furent émises pour expliquer cette différence, mais qui ne sont en aucun cas confirmées :

1. selon R. Rhode (Sté Marinus), la forêt de « kelp » serait une nurserie que les animaux quitteraient pour aller vers les zones de roches. C'est pourquoi les juvéniles ne se trouvent que dans la forêt de « kelp ».
2. pour les scientifiques du SMEL, à la lumière des études conduites sur les animaux, la différence de taille des mollusques serait plutôt due à une alimentation différente et/ou en quantité plus ou moins abondante. Les migrations, toujours possibles, ne peuvent expliquer de tels écarts. De plus, les juvéniles sont toujours plus facile à localiser sur des fonds de cailloux que sur une grande zone rocheuse où ils peuvent vivre dans des failles inaccessibles. Il faut ajouter que la forêt de kelp observée est entourée exclusivement de sable, ce qui doit limiter les échanges entre les divers espaces.

Le tableau 3 synthétise les observations de ces deux biotopes.

|                          | Bathymétrie | Houle    | Géologie | Lumière    | Végétation  | Faune encroûtante | Taille |
|--------------------------|-------------|----------|----------|------------|-------------|-------------------|--------|
| <b>Fond de roches</b>    | 6 à 20 m    | Forte    | Roches   | Importante | Très faible | Très abondante    | Gros   |
| <b>Forêt de « kelp »</b> | 6 à 10 m    | Atténuée | Cailloux | Atténuée   | Importante  | Abondante à moyen | Petits |

Tableau 3 : Comparaison de deux biotopes de *Megathura crenulata*.

A la suite de ces observations, il semblait opportun de mieux connaître la faune fixée sur les rochers puisque tout indiquait que les animaux s'en nourrissaient. Parallèlement à une étude des contenus stomacaux (cf. chapitre II.4.4. « Les contenus stomacaux »), une étude de la biocénose environnante fut effectuée par le SMEL et le laboratoire de biologie de l'Université de Vannes dirigé par Mr Bertrand PERRIN. En tenant compte des observations précédentes, cette étude fut ciblée sur la zone de roches. Un panel des animaux couramment rencontrés est présenté ci-dessus : anémones, ascidies, bivalves, bryozoaires, foraminifères, hydriades, polychètes ou spongiaires (cf.

photos 7 à 10). Il faut préciser que les prélèvements furent effectués sur les rochers où l'on trouve les *Megathura* les plus gros.



Photo 7 : anémone



Photo 8 : ascidie



Photo 9 : polychète



Photo 10 : bivalve

**Photos 7 à 10 :** Exemples de faune rencontrée sur les fonds rocheux peuplés par *Megathura crenulata*.

## II.3. Reproduction : cycle et stades larvaires.

### II.3.1. Le cycle chez *Haliotis rufescens* en Californie et chez les fissurellidés dans le monde.



Photo 11 : *Haliotis rufescens*



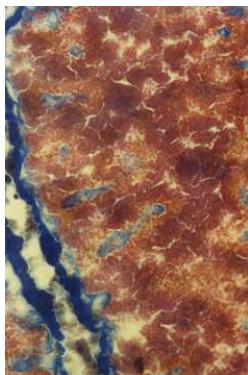
Photo 12 : *H. rufescens* dans son habitat

*Haliotis rufescens* ou l'ormeau rouge (photos 11 et 12) est endémique de la zone où vit *Megathura crenulata*. En l'absence de données sur la fissurellide, il semblait intéressant d'étudier un mollusque californien ayant la même répartition géographique que *Megathura crenulata* et de le comparer à l'ormeau européen (*Haliotis tuberculata*), dont la reproduction est maîtrisée par les techniciens du SMEL. Chez *H. rufescens*, la caractéristique principale est relevée par Young et Demartini (1970) qui porte sur la présence de gamètes matures tout au long de l'année. Ils ont également visualisé des œufs nécrosés. Par ailleurs, Shibui (1971) a démontré que la maturation était optimale chez *H. rufescens* dans des températures comprises entre 14°C et 20°C, correspondant à l'écart enregistré entre l'hiver et l'été entre Los Angeles et San Diego. Pour sa part, Leighton (1974) a réussi à faire pondre cette espèce en laboratoire toute l'année. Pour déterminer la période de ponte, Price (1974) a étudié l'indice de volume gonadique (la variabilité dans le temps du volume de la gonade). Par cette méthode, il a pu déterminer que la ponte avait lieu dans la nature en Avril et que des pontes mineures existaient en janvier et septembre. Il est également intéressant de comprendre quels facteurs déclenchent ces pontes. D'après Newman (1967), les écarts de températures sont trop faibles pour provoquer des *stimuli*. Par contre, Giese (1959) émettait l'hypothèse d'une combinaison entre la photopériode, l'agitation du milieu et l'abondance de nourriture.

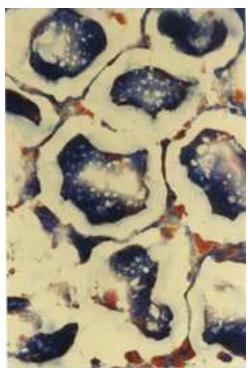
En ce qui concerne les fissurellidés, les connaissances ne sont pas aussi nombreuses. Pourtant, dès la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, L. Boutan (1885) réussissait une reproduction et suivait les différents stades larvaires chez *Fissurella gibba*. Par contre, il ne fait aucune mention sur le cycle

sexuel, indiquant juste que ces essais avaient lieu fin mai / début juin. Par contre, pour *F. nigra* (M. Bretos, 1988), il semblerait que la gonade de l'animal soit mature tout au long de l'année, mais une étude de l'indice gonado-somatique montre des variations très importantes, indiquant des chutes et donc des pontes en Mars et en Août. Il semble que cette stratégie de reproduction soit commune aux fissurelles du Chili, comme *F. maxima* (M. Bretos, 1983), *F. cumingi* (M. Bretos, 1979) ou *F. picta* (Bretos, 1988) qui pondent en novembre et en mars

*Exemples de coupes histologiques effectuées par Biosyn et le SMEL (mars 1995)*



*Photo 13 : Gonade male. En rouge, les spermatozoïdes matures et en bleu, les tubulures*



*Photo 14 : Gonade femelle. En bleu, une cellule entourée de sa gaine en blanc*

### II.3.2. Etude du cycle reproducteur.

#### II.3.2.1. Etude histologique de la gonade.

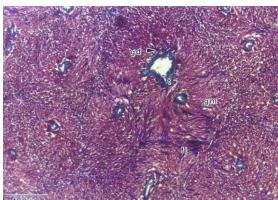
Une première phase fut menée par le SMEL et Biosyn entre mars 1995 et février 1996. La société pharmaceutique faisait parvenir des animaux de Californie, s'occupait des préparations histologiques des gonades de *Megathura crenulata* et envoyait les lames au SMEL qui se chargeait de l'analyse.

Au bout d'un an de suivi, les premières conclusions furent que la qualité de la gonade tant mâle que femelle, était qualitativement constante tout au long de l'année avec une grande majorité de cellules matures (photos 13 et 14).

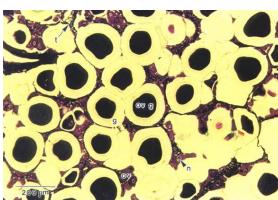
Au vu de ces résultats, il semblait possible d'obtenir des juvéniles tout au long de l'année, pouvant ainsi alimenter une éventuelle écloserie sans procéder à une maturation préalable des géniteurs. Cependant, des essais de pontes effectués à toutes les saisons ne donnaient de résultats positifs qu'en automne, entre les mois d'octobre et de décembre. Des observations de la gonade, faite en parallèle, indiquaient que son volume était très variable selon les saisons. Ce dernier point demandait à être confirmé. In fine, les conclusions de cette étude s'avéraient insuffisantes pour expliquer le cycle sexuel de ce gastéropode.

Une seconde approche histologique eu lieu entre juin 1999 et juin 2000 et fut menée en collaboration avec le laboratoire de biologie

**Exemples de coupes histologiques effectuées par le laboratoire de biologie marine de l'Université de Nantes**



**Photo 15 : Gonade male.**  
En rouge, les spermatozoïdes matures et en bleu, les tubulures



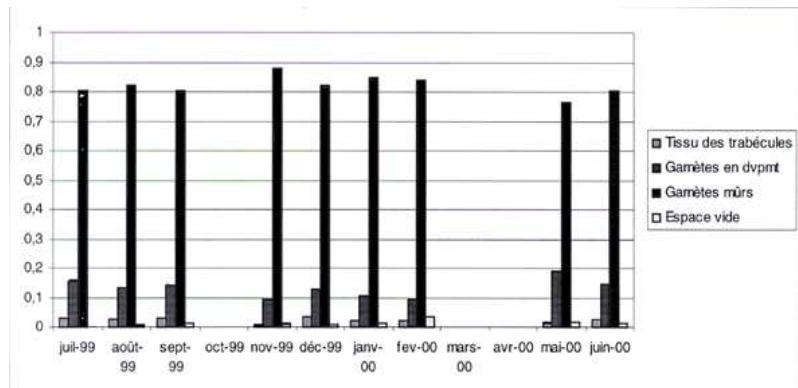
**Photo 16 : Gonade femelle.** En noir, cytoplasme des ovocytes matures, en blanc, leur gaine et le reste, ovocytes non matures

marine de l'Université de Nantes, où l'équipe du Pr. Peter G. Beninger travaillait sur cette problématique, notamment sur l'ormeau (*Haliotis tuberculata*) et l'huître (*Crassostrea gigas*).

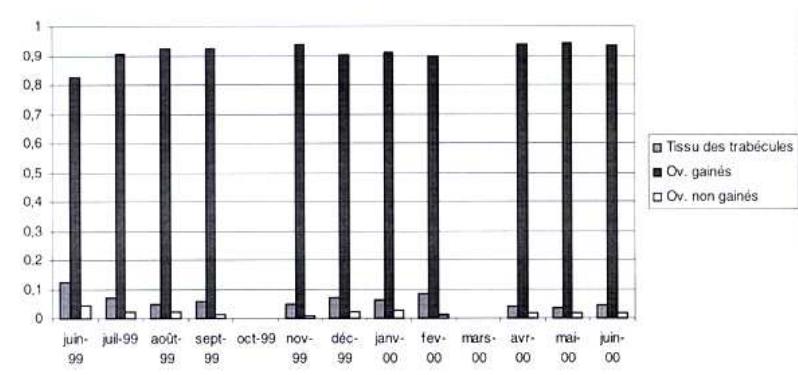
Les gonades de 5 fissurellides étaient mensuellement extraites et préparées. Après analyse des différentes coupes, les conclusions apportées par les universitaires confirmaient les résultats de la première expérimentation effectuée par le SMEL trois ans plus tôt. Les gonades mâles et femelles sont « matures » tout au long de l'année (photos 15 et 16). Les gonades ont un aspect similaire quelle que soit la période considérée et la zone de la gonade étudiée (au début de cette étude, plusieurs prélèvements étaient effectués sur une même gonade afin d'en vérifier l'homogénéité).

Une quantification des différentes cellules composant les gonades mâles et femelles confirme l'analyse visuelle des lames histologiques. Comme l'indiquent les graphiques 4 et 5, les gonades sont toujours composées d'une grande majorité de cellules matures quelle que soit la période considérée.

Ces résultats montrent qu'il n'existe pas de repos sexuel chez ce gastéropode et il n'a jamais été observé de réplétion des gamètes



**Graphique 4 : Pourcentage des différentes cellules de gonades mâles**  
(en noir, les cellules matures)



**Graphique 5 : Pourcentage des différentes cellules de gonades femelles**  
(en noir, les cellules matures)

durant ces deux études. Il semble que le stock restant de gamètes après la ponte soit conservé dans la gonade de l'animal jusqu'à la ponte suivante.

Des mesures ont été effectuées sur les cellules femelles, donnant un diamètre de 130 µm pour un ovocyte mature, composé d'une cellule entourée d'une gaine protectrice très importante dont la nature biochimique fut mise en évidence par histochimie. La coloration utilisée (bleu alcian) par le laboratoire de Nantes colore la gangue en bleu (photo 17), ce qui indique qu'elle est composée de polysaccharides acides (PSA), rendant ainsi cette partie de l'ovocyte gélatinieux. Ces PSA ont plusieurs propriétés qui ont une influence directe sur la stratégie de reproduction de l'animal dans son milieu naturel :

- Elle permet une meilleure agglutination des œufs entre eux, évitant ainsi la dispersion dans le milieu. Cette hypothèse est confirmée par les observations faites au SMEL lors des inductions de ponte. L'émission d'ovules par une femelle se traduit par l'expulsion d'une masse grise visqueuse qui sédimente très rapidement au fond du bac.
- Cette gaine gélatinuse offre une protection mécanique importante, permettant de créer un environnement stable aux ovules tout en les protégeant contre les mouvements de brassage et de turbulence de l'eau. Il faut rappeler que, dans le milieu naturel, l'agitation due à la houle du Pacifique est très importante.
- Elle offre un meilleur écoulement de l'eau facilitant les échanges avec le milieu extérieur (oxygène, gaz ou déchets solubles)

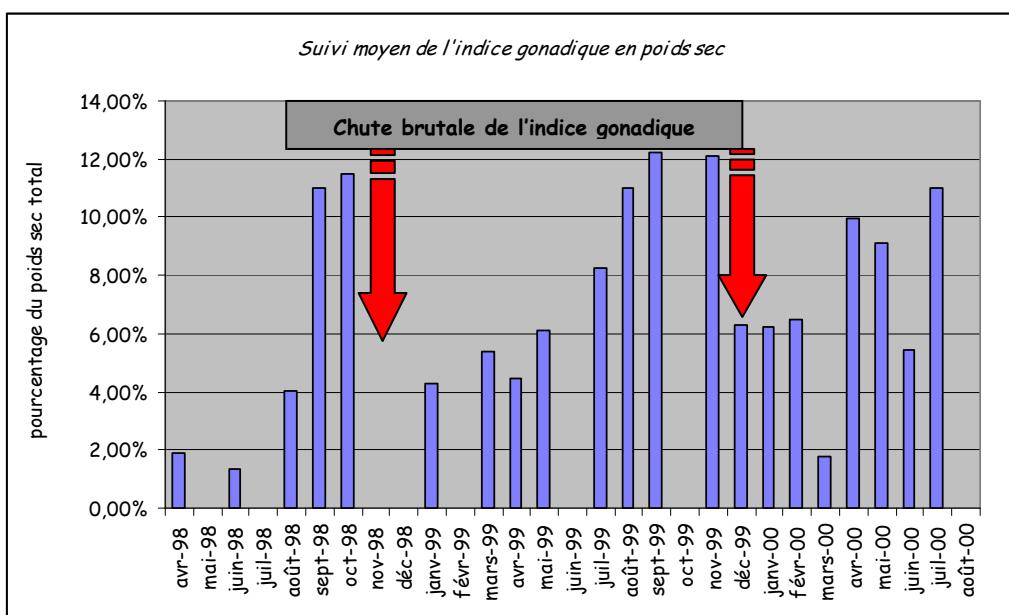
**Photo 17 : Tests histochimiques de la gangue**



En outre, d'autres tests histochimiques permettent de penser que le cytoplasme des ovules serait de nature lipidique. Mais ce point reste à confirmer. Dans ce cas, il serait utilisé comme réserve nutritive par la larve le temps de son séjour dans la gaine.

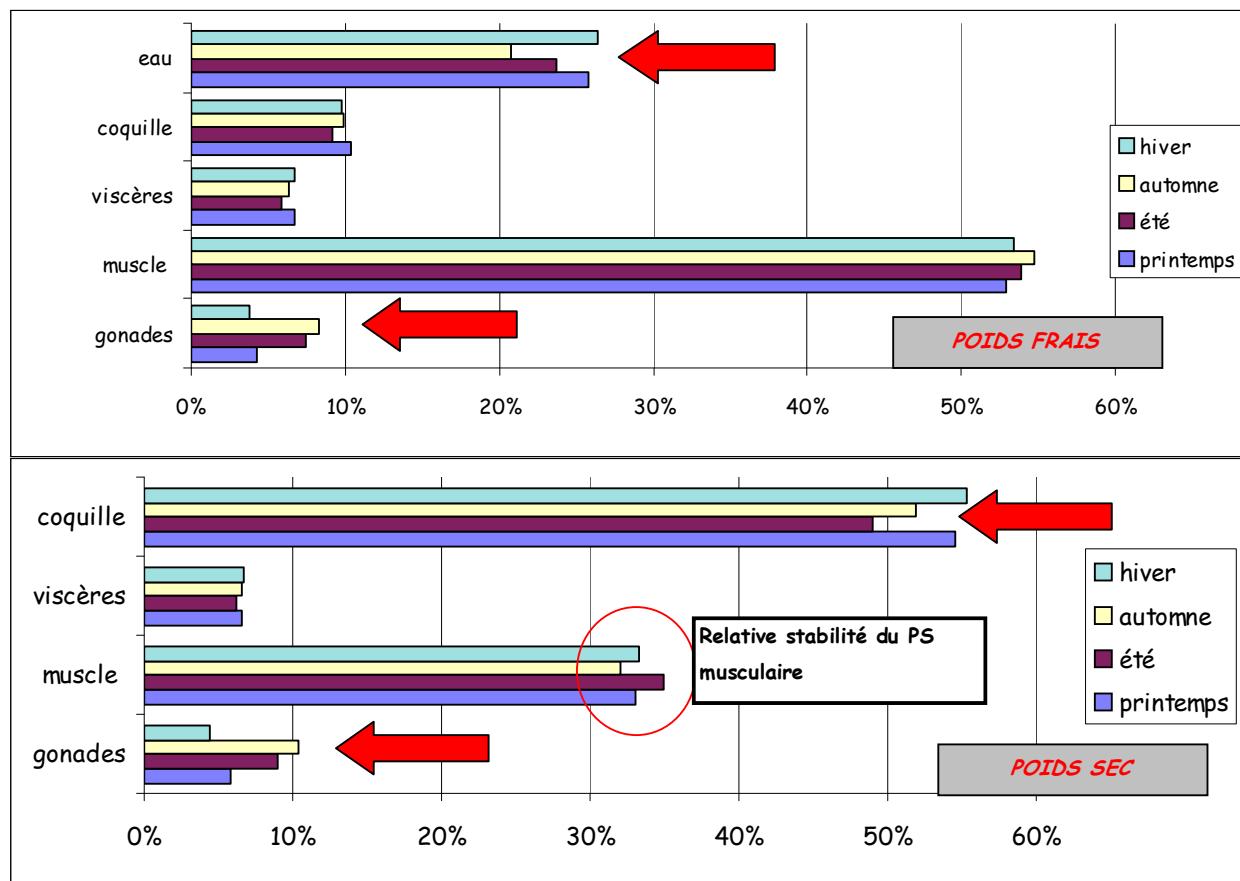
### *II.3.2.2. Etude de la variabilité annuelle du volume gonadique.*

Lors des dissections effectuées sur *Megathura crenulata* entre avril 1998 et septembre 2000 (cf. II.1. « Présentation de l'animal »), il fut effectué une étude de l'indice gonadique et de sa variation dans le temps. Le graphique 6 présente les résultats pour les gonades (mâles et femelles confondues) en poids sec, les données en poids frais offrant un profil identique.



**Graphique 6 :** suivi individuel de l'indice gonadique en poids sec - ordonnée : %age du poids total sec

On voit nettement que, durant les années 1998 et 1999, le volume gonadique atteint les 10% du poids sec total vers Août / Septembre pour chuter assez brutalement vers Novembre / Décembre autour de 5%. L'année 2000 semble offrir un profil différent, cependant c'était une année particulière d'un point de vue climatique. D'après la société Marinus, le phénomène El Niño, apparu dans le courant de l'année 1999, a induit dans l'année suivante, sur les côtes californiennes, un dérèglement du climat, donnant des températures plus fraîches, que ce soit dans l'air comme dans l'eau de mer. Malheureusement, aucune donnée scientifique n'a pu être récupérée.



Graphique 7 : Pourcentage saisonnier de chaque élément (en masse) composant un animal en poids frais et en poids sec.

D'autre part, lors du suivi biométrique, la proportion d'eau « libre » dans l'animal a été notée en déduisant du poids frais total les poids frais des différents organes prélevés. Le graphique 7 présente les résultats.

Cette étude montre que les compartiments coquille, viscère et muscle sont relativement stables au cours de l'année. Par contre, il existe un profil inversé entre les gonades et l'eau.

La gonade ne possède pas de tissu de réserve et, comme indiqué précédemment, il n'y a pas de réplétion des gamètes. Ces remarques, complétées par le constat de la stabilité du poids de muscle, tant en frais qu'en sec (cf. graphique 7), au cours des saisons, accréditent l'hypothèse que cette fissurellidé puise l'énergie nécessaire à la reproduction, directement dans son alimentation. Cette stratégie est très différente de celle observée chez l'ormeau *Haliotis tuberculata* (Cochard, 1980) qui prélève son énergie dans le muscle et chez l'oursin

*Paracentrotus lividus* (Byrne. 1990) où l'énergie est stockée dans des tissus de réserves au niveau de la gonade.

### II.3.3. Fécondation.

En s'appuyant sur l'expérience acquise sur les ormeaux, plusieurs pontes furent effectuées au centre expérimental du SMEL et donnèrent des juvéniles dès octobre 1995. Ce travail apportait de nombreux éléments de connaissance sur la fécondation et le développement larvaire, absents de la bibliographie. Si le passage dans le tractus génital est indispensable pour obtenir des gamètes féconds chez *Haliotis tuberculata*, cette étape n'est pas obligatoire pour *Megathura crenulata*. Les premières pontes étaient effectuées par dissection des géniteurs et récupération des gonades. Après extraction et lavage des gonades, les gamètes étaient récupérés et trempés une trentaine de minutes en eau de mer afin que les ovules (photo 18) aient une forme bien arrondie (réhydratation nécessaire) et que les spermatozoïdes aient une bonne mobilité.



Photo 18 : exemple de visualisation de contrôle sous microscope des œufs de *Megathura crenulata*



Photo 19 : fluorescence au DAPI - 5 min après éclosion



Photo 20 : fluorescence au DAPI - 90 min après fécondation

Si les phases de développement sont visibles en microscopie classique (cf. paragraphe II.3.4. « Développement larvaire » et annexe 1), cette approche ne donne pas toujours un résultat précis sur le timing dans les premiers instants de la fécondation. Aussi la description des premiers stades a été obtenue grâce à la technique de coloration au DAPI<sup>1</sup>, technique utilisée en collaboration avec Emmanuelle DANTON de l'Université de Caen. Ce colorant, utilisé en cytochimie, est spécifique de l'ADN. Le marquage des molécules d'ADN est ensuite visible grâce à un microscope à épi-fluorescence. Cette méthode permet de décrire le déroulement de toute la fécondation entre la sortie de l'ovule et 90 minutes après la fécondation. Les photos 19 et 20 donnent un exemple des résultats apportés par cette expérimentation. Le timing complet est visible en annexe 2.

<sup>1</sup> DAPI : Di Amino Phényl Indol.

Cette expérience a pu mettre en évidence le nombre de chromosomes de *Megathura crenulata* qui est de **16 paires** (contre 18 pour un ormeau).

#### II.3.4. Développement larvaire.

Une fois la fécondation effectuée, l'œuf commence sa mutation. La planche de photos en annexe 1 permet de suivre son développement et son timing de l'expulsion du premier globule polaire jusqu'au troisième mois, moment à partir duquel un juvénile est considéré en pré-grossissement. Il faut noter que ce timing a été obtenu dans l'écloserie du centre expérimental du SMEL, dans les conditions suivantes

- température : 19 - 20°C.
- photopériode : 12 heures jour / 12 heures nuit.
- salinité : autour de 33 g/l.
- alimentation (Phytoplancton de petite taille *Nannochlopsis sp.*).

Ces fécondations montrent que le développement larvaire de cette diodorine est classiquement celui d'un archéo-gastéropode, jusqu'à obtenir une petite fissurellidé. Les stades observés sont typiques de ceux décrits par L. Boutan (1885) sur *Fissurella gibba* ou sur l'ormeau *Haliotis tuberculata* (Clavier & Richard, 1985), à une différence près. En effet, chez la fissurellidé, l'éclosion a lieu au stade véligère, alors qu'elle s'effectue au stade trocophore chez l'haliotide (Blin, 1992).

Cette différence induit une gestion larvaire différente.



## II.4 Alimentation

### II.4.1. Bibliographie : l'alimentation chez les fissurelles.

L'une des interrogations au départ de l'étude concernait le régime alimentaire de *Megathura crenulata* qu'aucune publication n'évoque. Franz (1990), au Vénézuéla, indique que les fissurelles *F. nimbosa*, *F. nodosa* et *F. barbadensis* sont herbivores. Cette conclusion est reprise par Gonzales et al (1991) pour les espèces chiliennes de même qu'en Afrique du Sud où Anderson (1993) observe leur présence sur des champs de *Gracillaria verucosa*. Les mêmes remarques sont affûtées pour les diodorines européennes avec cependant quelques différences. Par exemple, *F. nodosa* râpe pour s'alimenter de micro-algues encroûtantes et de diatomées alors que *F. barbadensis* ingurgite toutes sortes de macro-algues (Franz 1990).

Pourtant, C.J. Franz (1990) mentionne dans sa conclusion que des analyses de contenus stomacaux effectuées sur des fissurelles du Vénézuéla avaient permis de noter la présence de petits invertébrés comme des crustacés, des polychètes ou de petits mollusques. Il ajoute que ce fait est décrit dans quelques publications (du début du XX<sup>e</sup> siècle) chez *Fisurella sp* ou *Diodorina sp*.

Afin de compléter ces informations parcellaires, trois voies de recherches ont été explorées : l'étude de la formule dentaire de la radula, l'analyse des enzymes digestives et enfin l'analyse de contenus stomacaux.

### II.4.2. Etude de la radula.

La radula fut étudiée dès 1993 au centre expérimental du SMEL, sa forme, en comparaison de celles d'autres espèces voisines mais dont le régime alimentaire est bien connu, permettait de définir grossièrement le mode alimentaire. Une étude bibliographique démontrait que

*Megathura crenulata* appartient à la superfamille des *fissurellacea* avec une radula de rhipidoglosse. Ce sont donc des racleurs, généralement herbivores ayant la formule dentaire suivante :

$$m + \underline{5} + R + \underline{5+m}$$

(m : dents marginales en nombre indéterminé, 5 : 5 dents latérales, R : dent rachidienne)

La formule dentaire de *Megathura crenulata* a ensuite été comparée à celles de deux gastéropodes taxonomiquement assez proches et dont on connaît le régime alimentaire. Les résultats observés sont synthétisés dans le schéma 3 et le tableau 4.

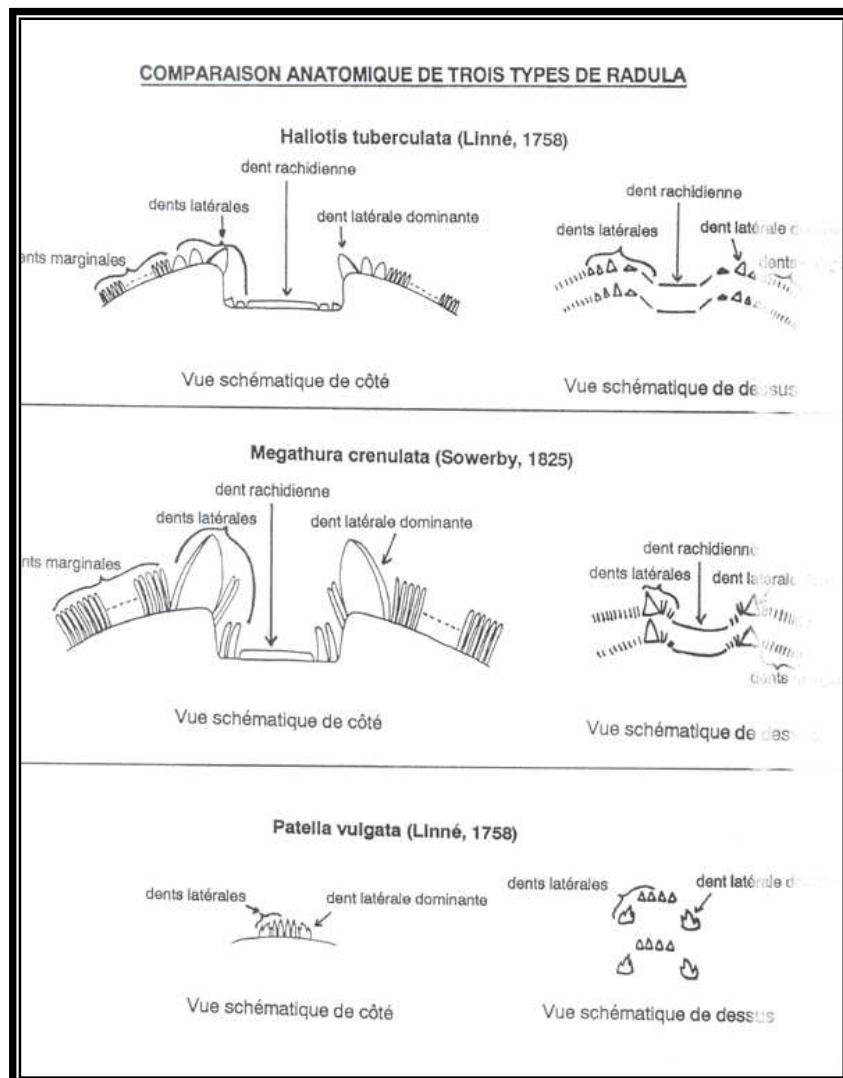


Schéma 3 : Formules dentaires de *H. tuberculata*, *M. crenulata* et *P. vulgata*

| FORMULE DENTAIRE      |                |                  |                 |                  |                 |                  |
|-----------------------|----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
| Mollusque             | Type de radula | Dents marginales | Dents latérales | Dent rachidienne | Dents latérales | Dents marginales |
| <i>H. tuberculata</i> | rhipidoglosse  | m                | 2+D+2           | 1                | 2+D+2           | m                |
| <i>M. crenulata</i>   | rhipidoglosse  | m                | D+4             | 1                | 4+D             | M                |
| <i>P. vulgata</i> E   | Docoglosse     | 3                | D+2             | 0                | 2+D             | 3                |

Tableau 4 : formules dentaires des 3 espèces.

Il apparaît que par la formule dentaire de sa radula, la fissurellide est beaucoup plus proche de l'haliotide que de la patelle. Ceci tenterait à confirmer son caractère brouteur herbivore. Cependant, d'un point de vue morphologique, la dentition semble être assez particulière, avec des dents latérales très développées et une radula particulièrement longue. Après dissection, et une fois retirée et déployée cette radula peut atteindre 80 mm (photo 20). De plus, elle est entourée d'une masse musculaire assez considérable, laissant à penser que cet animal est capable de broyer des morceaux relativement durs. Cette taille représente environ 70% de la longueur de l'animal, alors qu'une radula d'ormeau atteint 20% de sa taille totale. Par contre, la radula de la patelle peut atteindre 60 mm, soit 130% de sa longueur maximale, mais cet animal ne se déplace pas, contrairement aux deux autres.

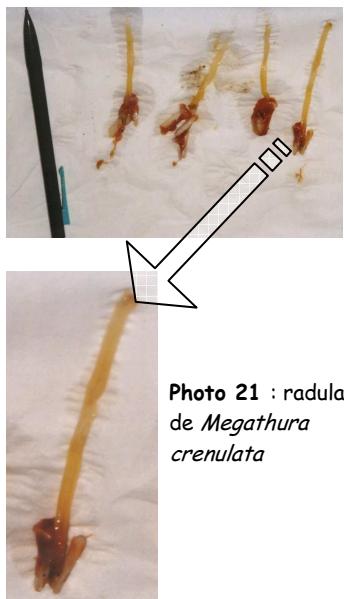


Photo 21 : radula de *Megathura crenulata*

Ces observations ont été confirmées en 2002 par Perrin *et al* qui complétaient l'étude menée par le SMEL. Les schémas 4 et 5, ainsi que les photos 21 à 23 montrent la disposition et la structure de cette radula, typique de ce taxon. Ainsi, *Megathura crenulata* s'alimente en sortant les dents radulaires de sa bouche, grâce à son cartilage odontophore, afin de râper le sol. Les aliments râpés sont ensuite envoyés directement dans l'œsophage lorsque les dents radulaires reprennent leur place initiale.

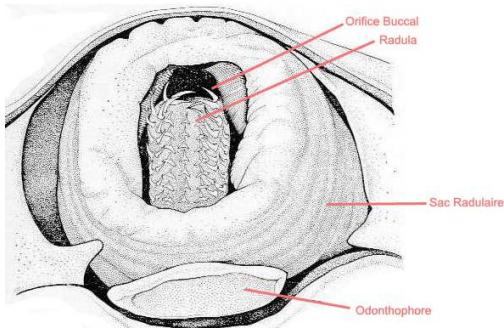


Schéma 4 : vue d'ensemble de la radula

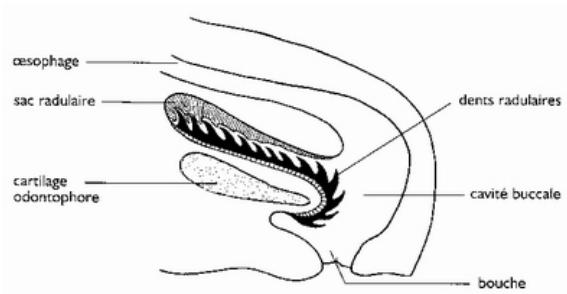


Schéma 5 : coupe transversale de la radula



Photo 22 : vue d'ensemble de la radula



Photo 23 : détail du cartilage odontophore



Photo 24 : détail des dents radulaires

Les conclusions de cette étude anatomique sont à rapprocher de celles de C.J. Franz (1990) (cf. II.4.1), indiquant quelques exceptions à la règle alimentaire chez les fissurelles (généralement herbivores) et des observations faites par le SMEL en Californie (cf. II.2.3 et II.2.4) sur le biotope du mollusque : les rochers y sont quasiment exempts d'algues et très riches en faune fixée.

Ainsi, *Megathura crenulata* serait une fissurellidé brouteuse ayant une alimentation mixte (algue et faune fixée). Cette espèce serait donc une exception parmi les gastéropodes ayant une radula de type rhipidoglosse.

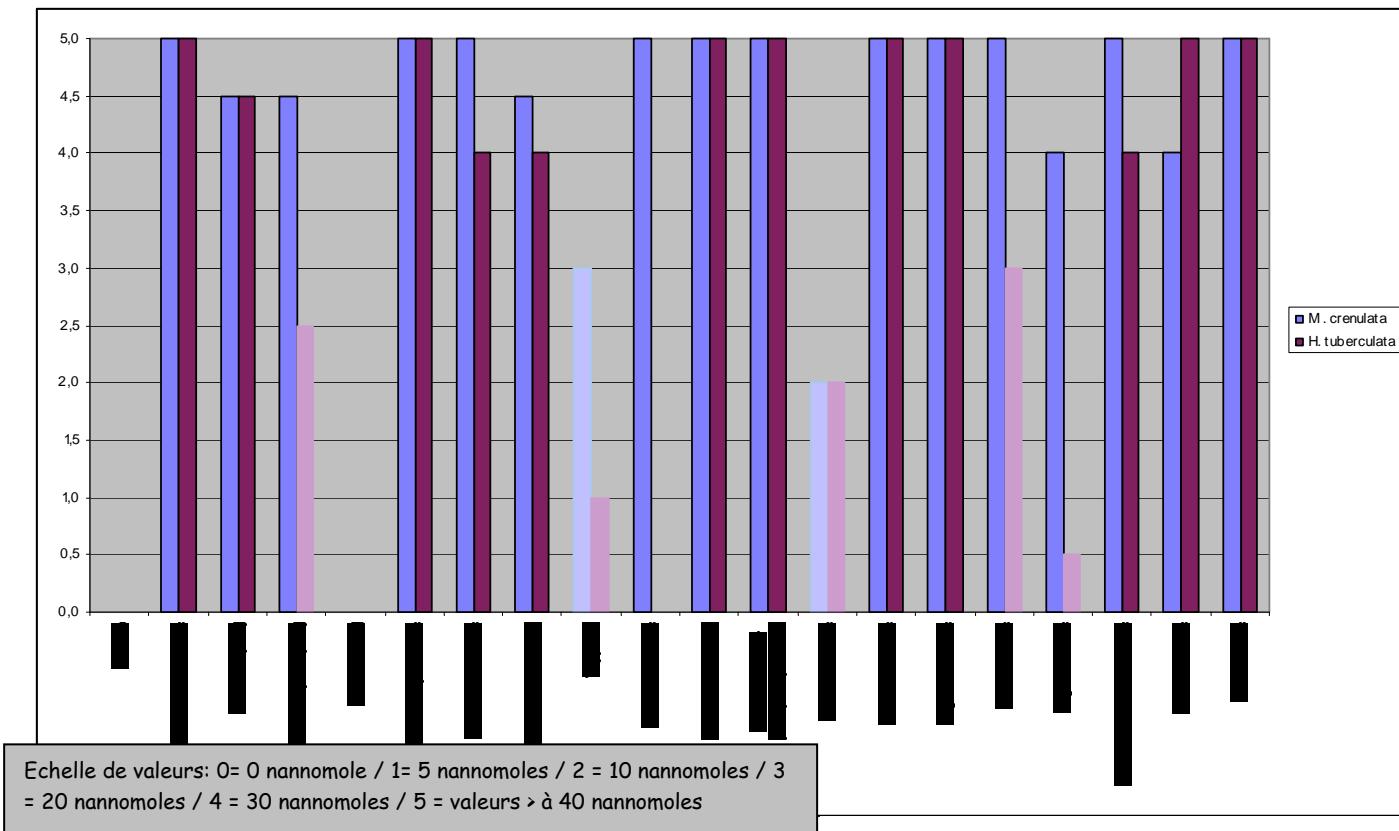
#### II.4.3. Etude des enzymes digestives.

En 1997, le SMEL a mené une étude sur les enzymes présentes dans le système digestif de *Megathura crenulata*. Afin de mieux cerner la problématique, la même opération fut menée sur l'ormeau *Haliotis tuberculata* élevé au centre expérimental.

*Megathura crenulata* : rapport final des études menées entre 1993 et 2001.

L'identification fut réalisée grâce à des tests API-ZYM permettant de quantifier une vingtaine d'enzymes parmi les plus courantes, en 5 catégories selon leur concentration (cf. graphique 7). Les animaux utilisés étaient des fissurelles issues de la nature, en stabulation au SMEL depuis moins de deux semaines. Les ormeaux, issus de l'écloserie du SMEL, étaient âgés de 18 mois et nourris exclusivement avec *Palmaria palmata* et *Laminaria digitata*. Pour la diodorine, 3 organes furent sélectionnés : l'œsophage, l'estomac et l'intestin. Pour l'haliotide, l'œsophage et un ensemble estomac / intestin furent testés.

Au regard des résultats, il semble que *Megathura crenulata* dispose d'un matériel enzymatique plus important, tout au moins sur le panel d'enzymes testées. Les différences se portent sur trois enzymes : l'estérase lipase,  $\alpha$ -glucosidase et la  $\beta$ -glucosidase. Ces deux dernières sont particulièrement intéressantes. En effet, ces enzymes sont capables de dégrader le glucose, molécule de base de stockage des glucides sous forme de glycogène, typique du règne animal. Ces deux



Graphique 8 : Quantification d'enzymes digestives chez *M. crenulata* et *H. tuberculata*.

enzymes ne se retrouvent qu'en petite quantité chez l'ormeau, herbivore strict.

Par conséquent, il semble que *Megathura crenulata* puisse digérer une alimentation carnée, il n'est donc pas un herbivore strict. Par contre, il est impossible par le panel d'enzymes testées, d'évaluer si cette diodorine est omnivore ou carnivore strict, un test sur la cellulase (enzyme dégradant la cellulose, glucide caractéristique des parois chez les végétaux et les algues) n'ayant pu être effectué.

#### II.4.4. Les contenus stomachaux.

Afin de compléter les connaissances permettant d'identifier le régime alimentaire, une étude des contenus stomachaux a été engagée. Les résultats ont été confrontés à la composition biocénotique du biotope de *Megathura crenulata* présentée dans les pages 12 à 15 (paragraphe II.2.5. : environnement, faune et flore associées). Pour cette étude, effectuée en 2000 et 2001, des agents du SMEL, avec le concours de la société Marinus de Long Beach (Californie), ont pu prélever *in situ* des animaux sur un secteur donné (cf. carte 2, page 20). Un panel de la faune et de la flore rencontrées dans un secteur d'un mètre-carré autour du lieu de prélèvement de l'animal. De retour à terre, les animaux étaient disséqués et toute la partie digestive était prélevée et mise dans de l'alcool, les prélèvements de faune et flore subissaient le même traitement. Les échantillons, une fois préparés, étaient expédiés vers le laboratoire de Mr Bertrand Perrin, de l'Université Bretagne Sud (UBS) à Vannes (Morbihan). Dans le même temps, les préleveurs ont rapporté des photos et films sous-marins des animaux dans leur milieu naturel et de leur environnement. Avec tous ces éléments, Mr Perrin et son équipe avaient pour but d'identifier la taxonomie de chaque élément retrouvé à la fois dans le système digestif de l'animal et dans son environnement proche et de les comparer. Les résultats de cette étude sont présentés dans le rapport « *Megathura crenulata*: étude du régime alimentaire » (B. Perrin, A.

Hily, F. Poirier; 2002 ; disponible au centre expérimental du SMEL sur



Photo 25 : Bryozoaire  
*Filicrisia franciscana*



Photo 26 : Bivalve  
*Hiatella sp*



Photo 27 : Bivalve  
*Saxicana sp*



Photo 28 : Ostracode  
Non déterminé



Photo 29 : Foraminifère  
*Trochammina pacifica*



Photo 30 : algue calcaire  
Litothamniée

Photos 25 à 30 : Différents taxons retrouvés dans le système digestif de *Megathura crenulata*.

CD-ROM). Après analyse, les estomacs des animaux prélevés contenaient une grande quantité de résidus de bryozoaires (*crisidae*, *filicrisia*, *tubulipora*, *tubuliporidae*, ...), mais également une quantité non négligeable de petits bivalves tels *Hiatella*. Cependant, plusieurs autres catégories sont présentes, mais en quantité plus marginales. Il s'agit d'algues calcaires (une seule espèce relevée), de petits crustacés, de morceaux de piquants provenant d'échinodermes, de foraminifères, de petits nématodes et d'ostracodes. Par conséquent, selon B. Perrin et al (2002) : « La synthèse des informations tant sur les contenus stomacaux que sur les biocénoses environnantes confirme que *Megathura crenulata* a un régime alimentaire **opportuniste** plutôt carnivore, mais en aucun cas il ne doit être considéré, comme herbivore strict ou mangeur d'éponges. Il semblerait que les proies molles soient délaissées au profit de bryozoaires calcaires, ce groupe est d'ailleurs très majoritairement représenté dans les contenus stomacaux. L'anatomie de la radula et sa taille respectable permet à cet animal d'ingérer des aliments calcaires de 0.3 cm de moyenne, pour ce faire cette radula doit trouver un support rigide sur lequel l'action de râper sa nourriture soit efficiente ».



Photo 31 :boudin de mucus retrouvé dans le système digestif

De plus, ils ont pu mettre en évidence un système de digestion lente des aliments. En effet, la digestion d'aliments carnés est toujours plus difficile et les carnivores sont généralement dotés d'un système qui permet de ralentir la progression des aliments dans le tube digestif. Or, il fut démontré que *Megathura crenulata* secrétait un mucus qu'il mélange avec des particules organiques et minérales formant ainsi un boudin très compact servant probablement à ralentir la progression des aliments lors du transit intestinal (photo 31).

## II.4 Biologie générale et croissance.

### II.4.1. Biologie générale.

#### II.4.1.1. Bibliographie : anatomie de la coquille des fissurellidés.

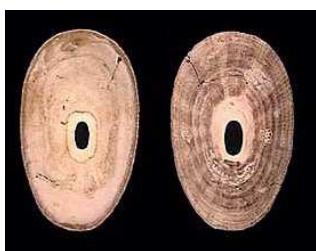


Photo 32 : *Fissurella picta*  
Bruguière (1791)

*Megathura crenulata* est appelé aux Etats-Unis, « Giant Keyhole Limpet », soit, en français, « la Patelle à Trou de Serrure Géante ». Le terme de « Géante » tenterait à démontrer que *Megathura crenulata* est atypique par sa grande taille qui peut atteindre 12 cm de coquille et un poids total de 600g. De notre point de vue d'eurocéens, les espèces de fissurellides qui peuplent nos eaux ont des tailles bien plus modestes, n'excédant pas 4,5 cm. Il s'agit de *Diodora apertura* (en mer du Nord, Manche et Atlantique) et de *Diodora italica* (pour la Méditerranée). Toutefois, certaines fissurelles peuvent atteindre des tailles similaires à la diodorine américaine comme *Fissurella cumigi* (M. Bretos), fissurelle chilienne, dont la longueur de coquille avoisine 90 mm, ou encore *Fissurella Bridgesii* (Bretos, 1978), présente au Nord du Chili et *F. picta* (photo 32)( Bretos, 1988), endémique du Sud Chili, dont les proportions sont similaires à celles de *F. cumigi*. Quant à *Fisurella maxima*, du Nord chilien (M. Bretos, 1982), elle peut atteindre des longueurs de 110 mm en 7 ans, ce qui relativise le terme de « géant » pour *Megathura crenulata*. La majorité des animaux de cette famille ont des tailles comprises entre 4 et 12 cm, *Megathura crenulata* faisant partie de la fourchette haute.

#### II.4.1.2. Le système digestif.



Photo 33 : *M. crenulata* disséqué.

Au cours des différentes dissections effectuées sur les animaux, les scientifiques du SMEL ont étudié l'organisation interne. Les viscères sont contenus entre la coquille et le pied. Dans cette partie, on retrouve les gonades en arrière de l'animal et le système digestif qui occupent 70 à 80% du volume de cet espace (photo 33). Ce système digestif est composé principalement de trois éléments : la partie radulaire composée

de la radula et son mécanisme (vu précédemment), l'œsophage et de l'hépatopancréas. La caractéristique principale de ces deux derniers éléments est d'être très muscleuse, ce qui laisse à penser qu'ils sont capables de broyer des morceaux très durs, indispensable dans l'ingestion de bryozoaires ou de petits bivalves.

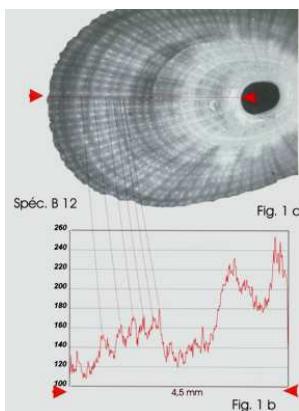


**Photo 34 :** système digestif seul de *M. crenulata*.

#### II.4.2. Croissance.

Il n'existe aucune donnée dans la bibliographie tant sur la croissance de ces animaux dans leur milieu naturel que sur leur durée de vie en Californie. Il est possible d'étendre cette remarque à toute la famille des fissurellidés. Pourtant, dans le but d'un élevage, ces données sont indispensables à l'évaluation de la faisabilité technico-économique d'un élevage. Afin de savoir si le « retour sur investissement » se fera en un an ou en trente ans.

En regardant un peu plus les coquilles des animaux morts provenant du milieu naturel, il semblait qu'elles contenaient des stries pouvant marquer des arrêts de croissance. Le travail d'études de coquilles fut mené en collaboration, durant l'année 1998, avec le Professeur Jean-Pierre CUIF, paléontologue à l'université Paris XI à Orsay (91). Ce travail (Cuif, 1998), consiste, par l'intermédiaire d'études sur la micro-striation de la coquille, à définir la rythmicité de sa synthèse au cours du temps. Des coquilles d'animaux du milieu naturel étaient comparées à celles des animaux provenant de l'écloserie du SMEL, la comparaison entre les deux devait montrer si la faible croissance des juvéniles était normale.



**Photo 35 :** Etude de la rythmicité de la striation de la coquille de *M. crenulata*

Cette étude a finalement démontré que la rythmicité de la striation était parfaitement régulière, ce qui prouve que la croissance de ce mollusque est régulière et continue, qu'il n'existe pas d'arrêt de croissance dans le milieu naturel. Ce fait peut être mis en relation avec les observations effectuées sur le terrain quelques mois après cette étude. Les conditions du milieu ne subissaient pas de variation visible durant une année. La température de l'eau avait une amplitude de 7°C et

la luminosité de 4 heures (régime 10/14). Les différences entre les coquilles seraient plus dues à un facteur interne à l'animal. Toutefois, en comparant cette striation avec celles d'autres espèces voisines, comme *Patella vulgata*, combinée à différents modèles mathématiques, une hypothèse fut émise sur l'âge moyen des animaux dont les coquilles étaient étudiées. Cet âge moyen était compris entre 10 et 12 ans, qui est un âge normal pour ce type de gastéropode. En comparaison, un ormeau peut vivre une quinzaine d'années (Clavier, 1985).

## CHAPITRE 3 / MISE AU POINT DES PARAMETRES DE STABULATION.

### ***III.1. Objectifs.***

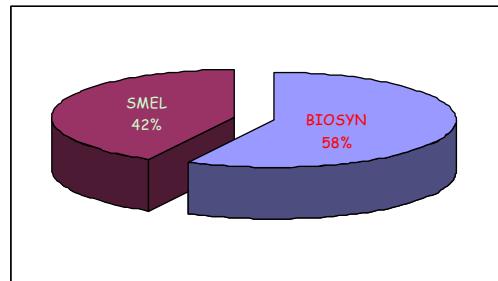
La société Biosyn exploite l'hémocyanine depuis la fin des années 1980. A cette époque, la demande en produit-base qui ne concernait que les essais cliniques, était très faible. Cependant, les dirigeants de Biosyn, réfléchissant à un éventuel développement de ce produit, souhaitaient sécuriser l'approvisionnement en matière première. Les animaux péchés en Californie, étaient importés en Allemagne où ils étaient stabulés dans de grands aquariums et nourris avec une nourriture artificielle « maison » qui ne donnait pas le résultat espéré. La mauvaise condition des animaux induisait une dégradation de la molécule d'hémocyanine, qui se fractionnait en deux sous-unités.

Ayant eu connaissance des expérimentations menées sur l'élevage de l'oursin et de l'ormeau, Biosyn contactait le SME en 1993, afin de travailler sur cette espèce voisine de l'haliotide. Le but était de définir les conditions de stabulation nécessaires à un maintien de la structure moléculaire de l'hémocyanine lors du stockage avant ponction des animaux.

### ***III.2 Calendrier et budget.***

Cette étude eu lieu entre juillet 1993 et décembre 1994. Une première convention fut signée le 07 juillet 1993 pour une durée de six mois puis un avenant prolongea le contrat d'une année supplémentaire. L'intitulé du contrat fut le suivant :

« Détermination des conditions nécessaires à l'obtention de quantités optimales d'hémolymphe à partir du mollusque gastéropode *Megathura crenulata* SOWERBY (1825) »



**Graphique 9 :** répartition du budget pour la période 1993 - 1994.

### III.3

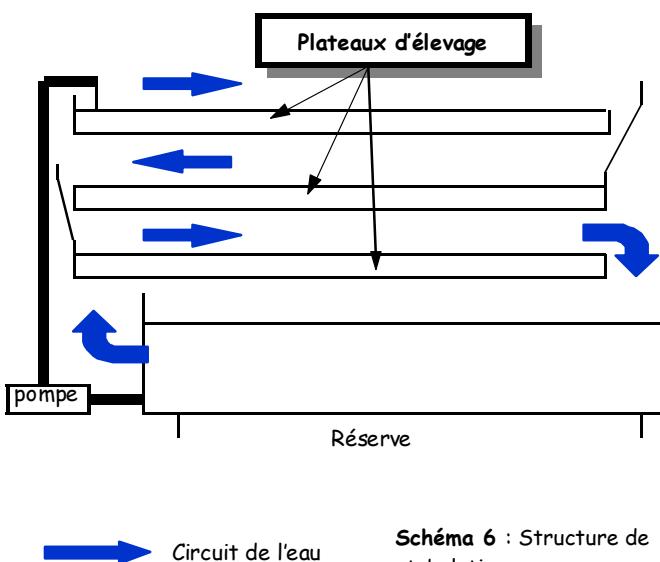
### *Le cadre expérimental*

#### III.3.1. Les équipements expérimentaux.

Les équipements utilisés ont été ceux développés au sein du centre expérimental sur le gastéropode *Haliotis tuberculata*, ou ormeau européen. Ils se composent de structures d'élevage implantées dans un local de 24 m<sup>2</sup> et fonctionnant en circuit fermé. (photo 35). Le schéma 6 montre le principe de fonctionnement de cette structure construite en 1993. Les animaux étaient placés en libre dans les plateaux d'élevage (photo 36), seules des structures appelées « abris » permettaient une augmentation de la surface. La hauteur d'eau dans ces plateaux était de 10 centimètres. L'ensemble de la structure contenait 1,4 m<sup>3</sup> d'eau de



**Photo 35 :** structure de stabulation



**Schéma 6 :** Structure de stabulation



**Photo 36 :** Disposition dans les lignes d'eau.

mer. Un renouvellement d'eau de 20% était assuré quotidiennement.

### III.3.2.

### Gestion du risque sanitaire

L'espèce étudiée étant d'origine extra communautaire, un certain nombre de procédures ont été mises en place pour éviter toute transmission d'éléments indésirables dans le milieu naturel.

Concernant l'importation des mollusques, la société Biosyn disposait des autorisations. Les animaux, en provenance des U.S.A., étaient réceptionnés en Allemagne puis immédiatement réexpédiés vers Blainville. Le conditionnement des gastéropodes assurait leur survie et leur confinement.

Au centre expérimental, l'accès au local de stabulation des mégathura était subordonné au passage dans un pétiluve et au lavage des mains. De plus, des vêtements de travail spécifiques furent affectés à ce local.

Vu le faible volume des rejets journaliers, et après accord de la D.D.A.S.S., la totalité des eaux de mer usées était, après décantation, rejetée dans le réseau d'eau douce usée. Cette procédure permettait d'éliminer par choc osmotique tout transfert de larves, de commensaux et de parasites éventuels.

## III.4

## Résultats

### III.4.1.

### L'alimentation.

Entre octobre 1993 et mars 1994, les scientifiques du SMEL (Birais, D. Richard, O. Pacary, S., 1994) ont testé un panel de différents aliments afin d'en apprécier l'appétence auprès de *Megathura crenulata*. S'étant déjà rendu sur les sites naturels du gastéropode, ils ont pu s'apercevoir, de par la pauvreté en algues du milieu, qu'une alimentation strictement végétarienne semblait peu plausible. Aussi, différents types

d'organismes marins ont été présentés aux mollusques comme aliment potentiel. Les réponses en terme d'appétence sont présentées dans le tableau n°5.

A la lecture de ces résultats, il apparaît que ce mollusque est omnivore, et que la seule algue pour laquelle l'animal réponde fortement est *Laminaria digitata*, une algue brune très rigide. Ces résultats corroborent les observations faites sur la radula qui permet à la fissurellidé d'ingérer des aliments très durs (cf § II 4.2), comme le crabe pour lequel, à l'issue des tests, il ne restait que la carapace. Ces tests ont également démontré l'importance de la présentation de l'aliment, illustrée par la laminaire qui induit une réponse différente qu'elle soit présentée en libre ou plaqué sur le fond de la goulotte.

Pour terminer, un suivi pondéral des mollusques conduit entre les mois d'octobre et décembre, a permis de voir qu'un apport alimentaire d'origine animal permet de limiter la perte de poids des animaux en stabulation (cf. tableau n°6).

| Séquence alimentaire     | Poids moyen au 15 oct. 93 (g) | Poids moyen au 20 déc. 93 (g) | Pourcentage |
|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------|
| Végétarienne stricte     | 243                           | 199                           | - 18%       |
| Végétarienne majoritaire | 244                           | 201                           | - 17%       |
| Carnée majoritaire       | 241                           | 227                           | - 6%        |

U

Tableau 5 : Variation de poids selon l'alimentation  
n

Une autre expérience, réalisée un peu plus tard, démontre qu'une alimentation strictement carnée permettait aux fissurelles d'obtenir un gain de poids de l'ordre de 5% sur un mois.

Afin de compléter ces données, il fut décidé de renouveler l'expérience sur l'appétence des mollusques pour tel ou tel type d'aliment en utilisant de l'alimentation artificielle. Ces essais ont été conduits entre mai et juillet 1994 (Chanut, 1994). Le tableau 7 résume le contenu de cette expérience.



| Aliment testé                               | Préparation                                                   | Réponse immédiate                   |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Granulés pour poissons (sans support)       | Granulés de 9 mm et 5 mm                                      | NULLE                               |
| Bâtonnets de surimi congelés (goût crabe)   | Bâtonnets placés sous élastiques                              | TRES FORTE                          |
| Surimi base                                 | Sans cuisson                                                  | MODEREE<br>(tenue dans l'eau < 24h) |
|                                             | Avec cuisson                                                  | NULLE                               |
| Surimi base de qualité supérieure (Pollock) | Sans cuisson                                                  | MODEREE<br>(tenue dans l'eau < 24h) |
|                                             | Avec cuisson                                                  | NULLE                               |
| Gel instagel                                | Mélangé avec diverses ingrédients (crabe, algue, poissons...) | NULLE                               |
| <i>Carcinus maenas</i>                      | Placés sous élastiques                                        | TRES FORTE                          |

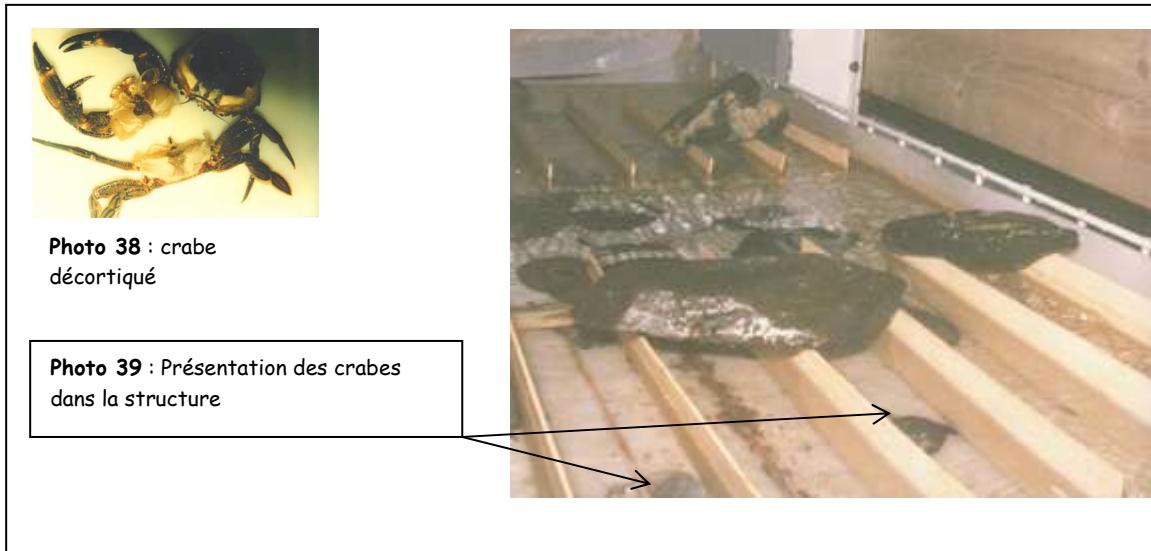
Tableau 6 : Synthèse des tests d'appétences à divers aliments.

En 1994, les aliments artificiels pour gastéropodes brouteurs sont peu utilisés dans le monde et absents en France. Quant à un aliment spécifique pour gastéropode brouteur carnivore, il n'existe toujours pas aujourd'hui et son intérêt économique semble avoir un avenir relativement restreint.

Le résultat est que seuls le crabe vert (*C. Maenas*) et le surimi semblaient donner des résultats intéressants.

Suite à cette expérience et pour des raisons économiques, le crabe fut choisi comme source alimentaire des Mégathuras en stabulation.

Il était présenté décortiqué, et placé sous des élastiques de



manière à le maintenir sur le fond de la goulotte d'élevage (photos 38 et 39). Le suivi pondéral effectué entre mars et juillet 1994 donnait une perte de poids moyen de 5.68 %, considéré comme faible.

### III.4.2.

#### Maintien de la molécule.

Au cours de ces 18 mois, les scientifiques de la société BIOSYN venaient régulièrement ponctionner les animaux stabilisés au SMEL. Plusieurs scénarios furent testés :

- Les animaux étaient déjà ponctionnés avant leur arrivée au SMEL, puis stabilisés et nourris dans les conditions décrites ci-avant. Les résultats furent bien meilleurs que ceux obtenus lors des essais effectués en aquariums dans les locaux de Biosyn à Fellbach. Cependant, ils n'étaient pas suffisamment bons pour permettre des ponctions à l'échelle industrielle, la molécule subissant encore une dégradation importante.
- Les animaux étaient stabilisés sans ponction préalable. Certains étaient nourris et d'autres pas. Dans les deux cas, les résultats étaient très satisfaisants jusqu'à deux mois dans les structures. Puis, la molécule commençait à se dégrader, mais de façon très progressive.

### III.4.3. Conclusions.

Ces résultats ont permis à la société BIOSYN d'opérer un choix stratégique afin d'amorcer leur production. La pêche étant largement suffisante pour subvenir à leurs besoins du moment, seul le stockage des animaux avant ponction posait problème. Ainsi, la société a, dès 1996, construit une unité-pilote de stabulation, dans ses locaux en Allemagne, afin d'y stocker les mollusques durant deux semaines, sans nourriture pour éviter toute pollution de l'eau avant ponction. Les animaux étaient ensuite ponctionnés en totalité et détruits. Cette installation fut largement inspirée des équipements implantés au SMEL.

Parallèlement, leur stratégie commerciale les incitait à conforter leurs positions aux Etats-Unis en s'y implantant par l'intermédiaire d'une société fille « Biosyn Corporation ». Cette unité a vu le jour sur la côte californienne, à Carlsbad, entre Los Angeles et San Diego, près de la ressource naturelle en *Megathura crenulata*. Le pilote élaboré en Allemagne fut transporté en Californie, avec deux autres modèles identiques. Cette proximité permet de faire pêcher les animaux, puis de les stabuler deux à trois semaines. Ensuite, une ponction partielle est opérée (environ 50% de l'hémolymphe totale), de manière à maintenir les animaux vivants et de les remettre sur leur lieu d'origine. Cette stratégie est actuellement en cours.

D'autre part, au vu de ces résultats et soucieuse de pérenniser son projet, Biosyn a demandé au SMEL de continuer ses travaux en les orientant vers l'élevage. Cette décision, prise fin 1994, fut motivée par plusieurs éléments:

- Aucune donnée sur l'état du stock, tant sur la côte américaine que mexicaine n'était disponible. Or, dans le cadre d'une intensification de cette activité, basée sur la pêche des mégathura, ce type d'information était indispensable. Les quelques informations existantes aujourd'hui sont les relevés effectués par les agents du SMEL.

- La pêche était alors autorisée sous une licence scientifique. L'augmentation de la pêche de cet animal demandait l'obtention d'une licence commerciale, à solliciter auprès de l'administration américaine. En l'absence de données, cette dernière statue généralement par la négative.
- Jusqu'en 1994, les animaux étaient importés en Allemagne, afin d'être ponctionnés et détruits ensuite. La société Biosyn craignait que l'autorisation d'importation ne soit suspendue ou même supprimée.

## CHAPITRE 4 / DEFINITION DES PARAMETRES D'ELEVAGE EN CIRCUIT FERME.

### IV.1. Objectifs.

Afin de répondre au souhait de la société de sécuriser les approvisionnements, et suite aux essais effectués sur la stabulation, la société BIOSYN a demandé au SMEL de continuer les travaux en les orientant vers la définition des paramètres d'élevage de *Megathura crenulata*. Il ne s'agit pas de mettre au point une zootechnie pour un élevage futur mais d'identifier les paramètres biologiques incontournables et d'en apprécier les optimums. Les informations acquises devaient permettre à Biosyn d'apprécier le potentiel économique et technique de cette activité.

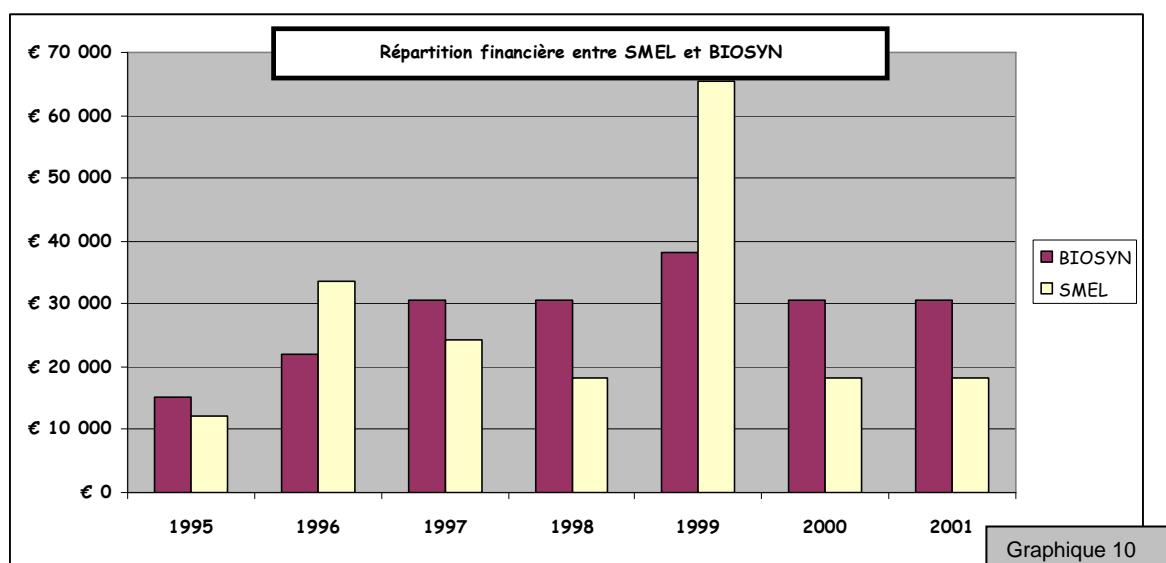
La stratégie employée est inspirée de celle utilisée pour les ormeaux en 1992. Celle-ci s'appuyait sur trois objectifs opérationnels : la reproduction, l'alimentation et la croissance, ce dernier point étant à combiner avec la mortalité.

### IV.2. Calendrier et budget.

D'un point de vue administratif, une succession d'avenants à la convention du 07 juillet 1993 permit de prolonger cette étude. Chaque avenant avait une durée d'un an et définissait le programme et le budget de l'année qui suivait. Quatre avenants furent signés entre le 1<sup>er</sup> janvier 1995 et 31 décembre 1998.

Fin 1998 et au vu des résultats jugés encourageants par Biosyn, un accord entre les deux parties permit de s'engager sur une durée de trois ans renouvelable, du 1<sup>er</sup> janvier 1999 au 31 décembre 2001.

Le budget annuel fut relativement stable aux cours de ces sept années. Le graphique 9 montre l'évolution budgétaire et souligne la part généralement majoritaire de Biosyn dans le financement. Au cours des deux premières années, les sommes attribuées à ce projet ne furent pas fixes, puis, à partir de 1998, il fut décidé que la part de Biosyn serait de 200 000 francs (environ €30 500) tandis que celle du SMEL serait de 120 000 francs (environ €18 300). Toutefois, le graphique 9 montre qu'il y eut quelques distorsions à cette règle, notamment en 1999. Mais ce fut une année particulière : le SMEL modifiait le local de confinement en l agrandissant et en améliorant le confinement. D'un coût d'environ 50 000



€ initialement imputé au programme Megathura, ce local fut conçu de façon à être réaffecté à d'autres espèces extra-communautaires. Biosyn, pour sa part et à sa demande, pris à sa charge, l'envoi de techniciens du SMEL en Californie. Un premier déplacement pour deux agents durant 2 semaines permit de caler quelques expérimentations, et fut complété par 3 autres voyages de huit jours pour un agent. Ces déplacements furent estimés à 8 500 € environ.

## *IV.3. Les moyens techniques.*

### *IV.3.1. La gestion du confinement.*

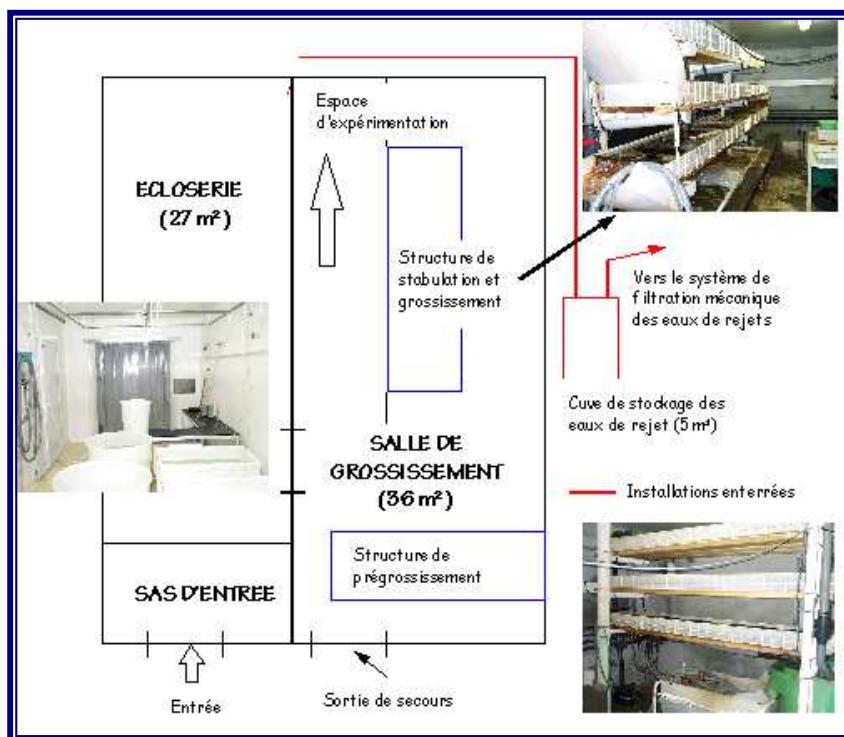


Schéma 7 : Local de quarantaine

Durant cette période, l'aménagement du local de confinement évoluait en raison de l'implantation d'une écloserie et de l'évolution des normes de sécurité sanitaire. Le schéma 7 présente la disposition finale.

L'accès à ce local se fait par un sas d'entrée, permettant les décontaminations d'entrée et de sortie. Ce sas donne accès à une écloserie. Elle est également le lieu de passage vers la salle d'élevage. Les eaux d'élevage rejetées ont dans un premier temps été envoyées dans le réseau eau douce usée (cf § III.3.2), puis à partir de l'année 2000, elles ont été traitées avant rejet dans le réseau habituel « eau de mer usée ». Le traitement consistait en un passage dans une série de filtres dont le pouvoir maximal de coupure était de 0.01 µm.

#### IV.3.2 La régulation thermique et l'alimentation en eau de mer.

L'ambiance de l'écloserie est thermorégulée par un climatiseur. Dans la salle d'élevage, les structures en ligne, sont thermorégulées par des échangeurs implantés dans le circuit d'eau. L'ensemble des appareils

de thermorégulation est raccordé sur le système de production thermique du bâtiment.

L'écloserie et la salle d'élevage sont alimentées par gravité en eau de mer. Cette eau est stockée, aérée et thermiquement régulée dans deux cuves en polyéthylènes de 5 m<sup>3</sup> chacune.

#### IV.3.3 Le matériel d'expérimentation.

L'objectif étant de définir les principaux paramètres biologiques, le matériel utilisé pour les expérimentations a été défini à l'époque en fonction du meilleur rapport connaissance/coût ; sachant que de nombreuses inconnues demeuraient.

Le matériel destiné aux travaux d'écloserie se compose de bacs cylindriques de 200l destinés à accueillir les larves, d'aquariums en plexiglas transparents de 30 litres servant de bacs de nurserie et du matériel nécessaire à la conduite de pontes et à la stabulation des juvéniles.

Les équipements chargés d'accueillir les animaux provenant du milieu naturel sont ceux mis en place pour le programme « stabulation » (cf § III.3.1). Une structure prévue pour les tests de croissance, mortalité et alimentation et un espace réservé à l'expérimentation ont été ajoutés. Ces deux derniers sont en place depuis 1999, tandis que tout le reste fut construit en 1993 (cf schéma 7).

### IV.4. Les paramètres d'élevage.

#### IV.4.1 Paramètres physico-chimiques et bactériens.

L'identification des facteurs abiotiques s'est appuyée sur les connaissances du centre expérimental du SMEL dans le domaine des

circuits fermés ou semi-fermés marins et sur l'analyse de la littérature scientifique disponible.

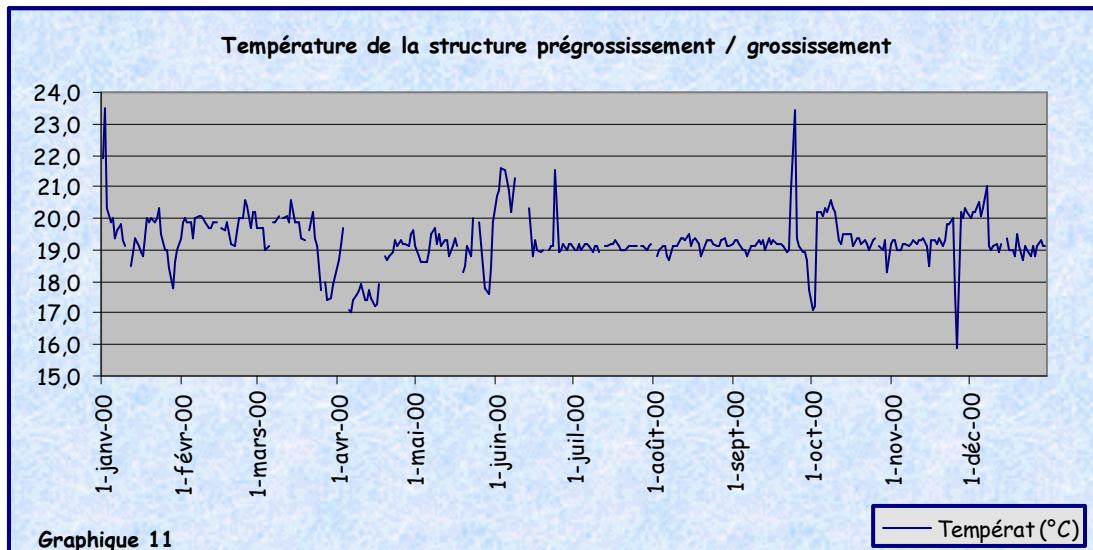
#### *Température, salinité et oxygène.*

Dans le but d'être au plus près des conditions abiotiques du milieu dans lequel vit la fissurellidé, la température et la salinité ont été définies sur la base des informations recueillies auprès du SCRIPP (Institut de recherche de San Diego, Californie, USA), informations affinées par les différents déplacements des agents du SMEL en Californie par la suite. Ces paramètres ont été mesurés chaque jour à l'aide d'un salinomètre WTW LF 197, dont la précision était de 0,1°C pour la température et 0,1‰ pour la salinité.

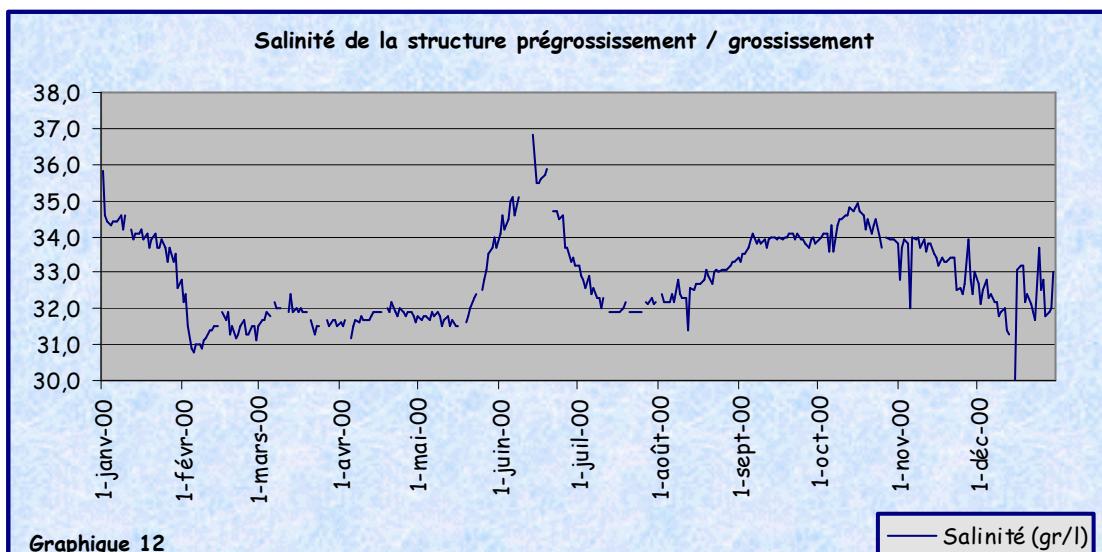
La température d'élevage a été fixée à 19°C compte tenu des températures observées dans le biotope du mollusque (14 à 21°C) et par la nécessité de limiter les développements bactériens (importants à partir de 20°C). Quant à la salinité, ces animaux étant océaniques, elle a été fixée à 33 g/l. Cependant, l'environnement technique ne facilitait pas le maintien à cette valeur dans les structures.

Les profils d'évolution de la température et de la salinité au cours des années 1994 à 2001 furent relativement similaires.

Les graphes 10 et 11 illustrent ce propos en présentant les données de température et de salinité sur l'année 2000. La température de l'eau d'élevage est restée relativement stable, autour de 19°C. Les écarts observés ont été provoqués par des dysfonctionnements temporaires survenus sur le système central de régulation thermique et sur le matériel installé dans la salle de confinement.



Quant à la salinité, les variations observées sont dues aux fluctuations parfois très importantes de l'eau de forage qui alimente le centre expérimental. Dans un premier temps, la salinité a été maintenue à une valeur acceptable en ajoutant du sel. Cette procédure ayant un impact négatif sur la condition des animaux, il fut ensuite décidé de réduire les renouvellements d'eau en cas de dessalure.



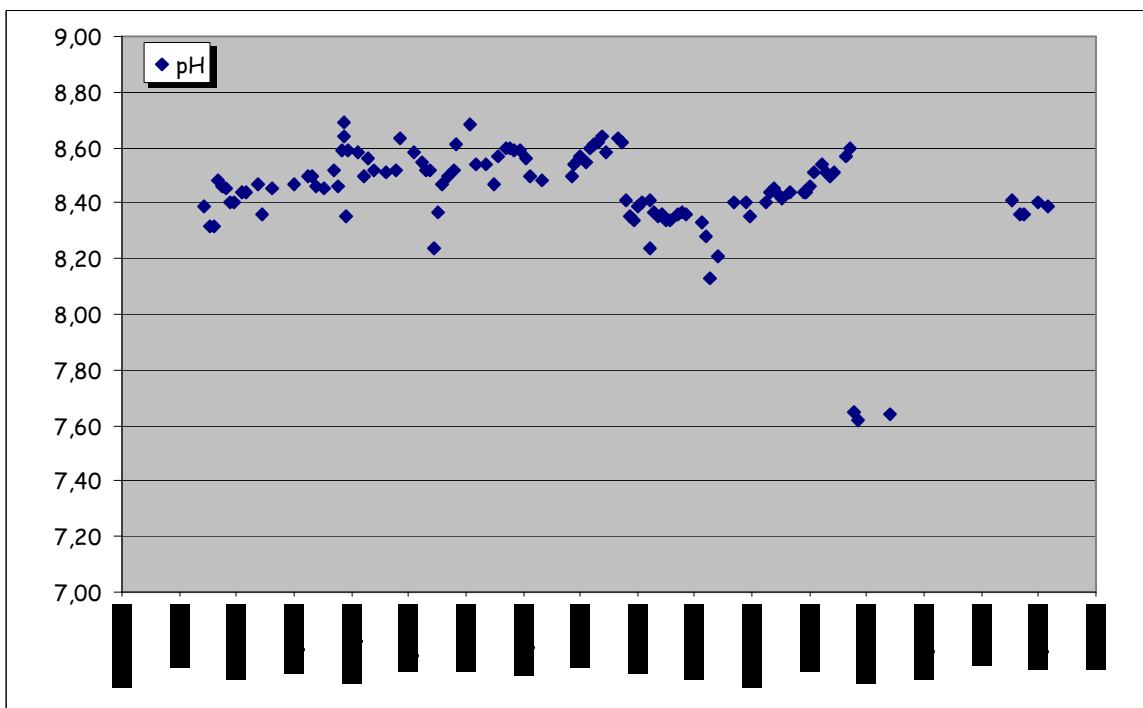
Enfin, le principe hydraulique utilisé au centre expérimental du SMEL permet généralement d'atteindre des taux de concentration en oxygène proches ou égaux à 100%, valeurs non mesurées mais probables dans le milieu naturel.

Il fut ainsi possible de s'affranchir du suivi routinier de ce paramètre.

### Flore bactérienne, composés azotés et pH.

Dans un circuit fermé ou semi-fermé, le suivi de la flore bactérienne et des composés azotés est indispensable à une bonne gestion de la matière organique. De même le contrôle du pH renseigne indirectement sur l'équilibre chimique carbonates/  $\text{CO}_2$ .

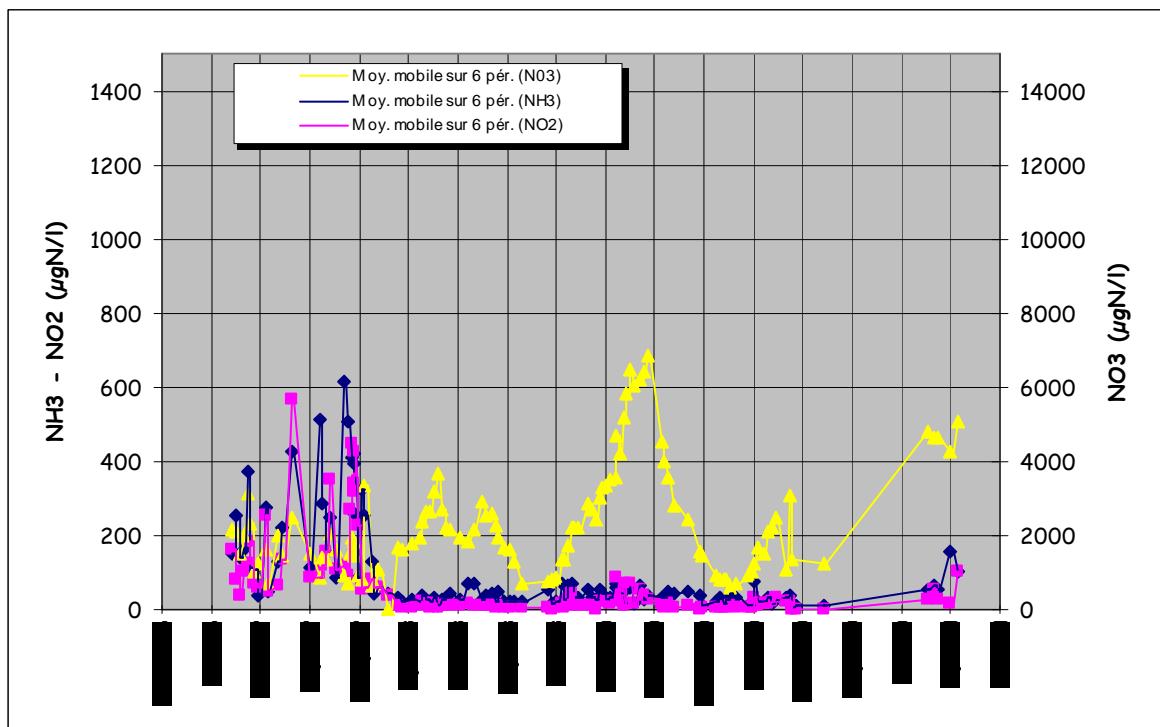
Ainsi, le potentiel hydrogène (pH), les composés azotés (nitrates, nitrites et ammoniaque) et la flore bactérienne (flore totale et vibrios) étaient suivis de façon hebdomadaire par le centre expérimental. Compte tenu des spécificités du circuit fermé, les méthodes



Graphique 13 : Suivi du potentiel hydrogène (pH) dans la structure de prégrossissement entre 1997 et 2001

analytiques, développées par le centre pour les élevages d'oursins, ont été utilisées dans le cadre de ce programme (Aminot & Chaussepied, 1983).

Les graphiques 12 et 13 montrent les résultats obtenus sur la structure de prégrossissement, par conséquent avec une biomasse faible. Toutefois, les valeurs sont similaires à celles obtenues dans les



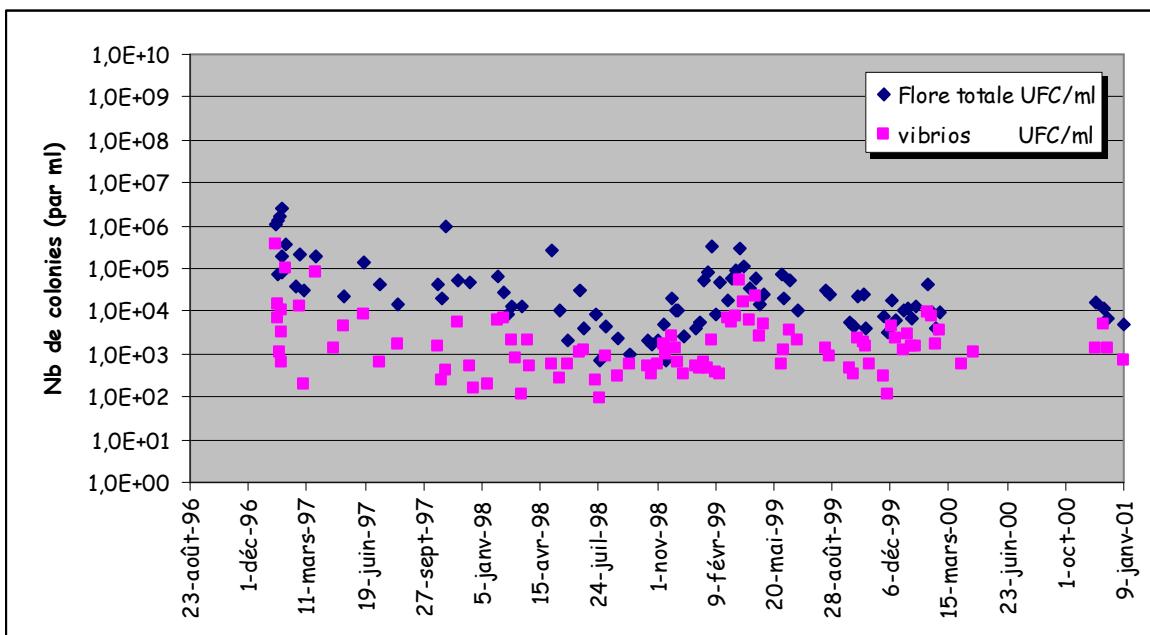
**Graphique 14 :** Suivi des composés azotés dans la structure de prégrossissement entre 1997 et 2001 autres structures.

Le pH reste stable durant le temps de ce suivi, très légèrement basique, autour de 8,5. Pour les haliotides (Basuya, 1997), dans une structure de même type, le pH est équivalent à celui rencontré lors du début de l'exploitation de la structure, puis les valeurs descendent progressivement autour de 8,1 et restent stables. Cependant, la différence entre les deux espèces porte sur l'alimentation. Composée d'algues fraîches et vivantes pour les ormeaux, elle est constituée pour *Megathura crenulata*, d'éponges stockées congelées et distribuées aux animaux juste après la décongélation.

Les composés azotés présentent un profil atypique, notamment au début de l'élevage. Les concentrations en ammoniacal ( $\text{NH}_3$ ) et nitrites ( $\text{NO}_2$ ) restent quantifiables ( $400 \mu\text{gN/l}$  en moyenne) avant de s'annuler par la suite. Les valeurs relevées en 1997 n'avaient pas soulevé d'interrogation particulière car elles correspondaient à une période de stabilisation biologique de la structure. Ce phénomène fut déjà observé

dans les structures expérimentales d'ormeaux (Basuyaix, 1997), à cette différence près que la période de « pic » était plus longue.

D'autre part, par comparaison avec l'ormeau et aux concentrations observées, la toxicité de l'ammoniaque et des nitrites a semblé peu probable, les valeurs sont très en deçà des valeurs critiques déterminées chez l'haliotide : (un ralentissement de croissance apparaît pour des valeurs en ammoniaque ou en nitrites égales à 5mgN/l. Pour les nitrates, les valeurs observées sont bien inférieures aux valeurs



Graphique 15 : Suivi de la flore bactérienne totale et des vibrios entre 1997 et 2001

critiques des ormeaux (Basuyaix, 1997) (on observe une diminution de l'alimentation à partir de 250 mgN/l) et même 5 fois moins importantes que les valeurs observées dans une structure similaire d'ormeaux (pic à 35000 µgN/l pour les ormeaux contre 7000 µgN/l pour *Megathura crenulata*). Il faut préciser que la biomasse est moins importante pour les *Megathura*.

Durant cette période, la flore bactérienne était également suivie. Cependant, aucune étude ne permet de donner des indications sur l'effet bactérien sur l'élevage de ces mollusques. Par contre, en comparant avec les données sur une structure d'ormeaux (Basuyaix, 1997), on voit que les concentrations moyennes sont du même ordre pour l'haliotide et la diodorine. Par contre, les pics relevés sont moins

importants pour la fissurelle (de l'ordre de 100 fois). C'est la raison pour laquelle ce paramètre ne semblait pas limitant dans le cadre d'un élevage.

#### IV.4.2 Les paramètres biotiques

##### IV.4.2.1 La reproduction

###### IV.4.2.1.1 La production de juvéniles.

Si le protocole d'obtention des juvéniles s'est affiné au cours des ans, les pontes furent couronnées de succès dès la première année. Au troisième essai, en octobre 1995, une ponte permit de produire 500 individus. L'année suivante, en respectant rigoureusement le protocole mis en place (cf § IV.3.2.2), deux autres pontes donnèrent 500 animaux chacune, en octobre et en novembre.

Puis, après deux années où les efforts se sont portés sur d'autres parties de l'étude et sur la modification du local, deux nouvelles pontes réalisées en 1999 donnèrent un millier d'animaux. À toutes ces réussites, il faut ajouter quelques pontes, considérées comme expérimentales, que ce soit sur la reproduction ou sur la vie larvaire, qui se sont avérées être une source précieuse de renseignements.

###### IV.4.2.1.2 Identification de la procédure d'induction des géniteurs.

Classiquement dans les élevages de mollusque, la première étape d'une ponte effectuée en écloserie, porte sur l'induction des géniteurs. Des tests d'induction furent donc réalisés, utilisant deux types de stress.

###### *Induction par assec.*

Les animaux étaient mis hors d'eau pendant 1 heure avant de retourner dans leur élément. Après plusieurs tentatives, il s'est avéré que ce procédé n'offrait pas le résultat espéré.

### *Induction par choc thermique.*

L'induction par choc thermique permet d'obtenir des larves. Le système utilisé est décrit par le schéma 8.

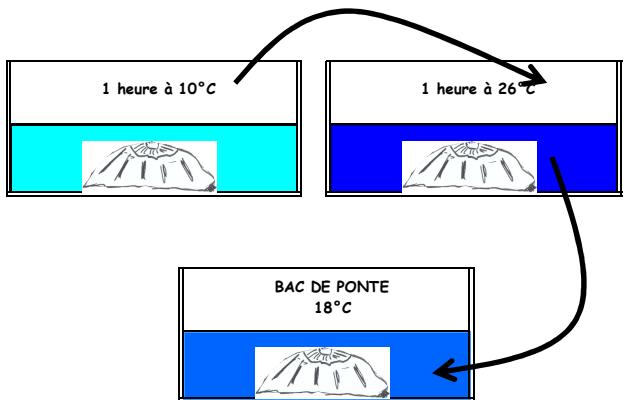


Schéma 8 : Protocole d'induction de ponte

IV.4.2.1.3

Après ce stress, les animaux peuvent émettre des gamètes au bout de 2 à 24 heures. Les larves obtenues à partir de cette fécondation ont survécu jusqu'au stade véligère, malheureusement et pour des raisons autres que celles liées à la fécondation (ponte hors période, problème de salinité), elles n'ont jamais dépassé ce stade.

### Protocole de ponte.

Le facteur temps, paramètre majeur dans le projet, obligeait à privilégier une stratégie permettant d'obtenir rapidement des juvéniles. N'ayant pas une maîtrise suffisante du processus de stimulation, les gamètes ont été obtenus par dissection des géniteurs ; des tests préliminaires ayant permis d'indiquer que le passage dans le tractus génital n'était pas nécessaire pour rendre les gamètes fertiles.

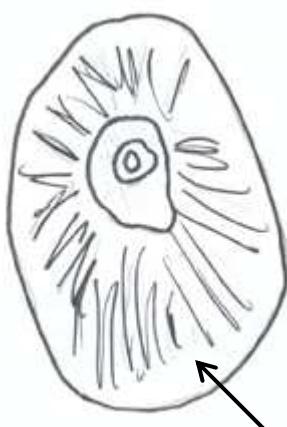


Schéma 9 : Zone d'introduction de la seringue

### *Reconnaissance du sexe de *Megathura crenulata*.*

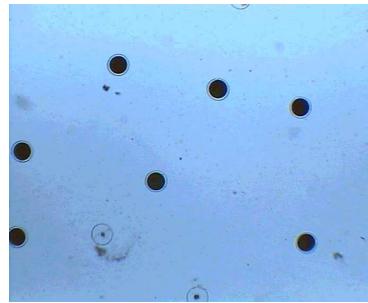
L'absence de dimorphisme sexuel et l'inaccessibilité des gonades à une observation visuelle, demandèrent la mise au point d'une méthode particulière d'identification des sexes.

Un fragment de gonade est prélevé en introduisant l'aiguille d'une seringue peu profondément dans le pied, juste sous la coquille, à l'arrière de l'animal. Si le matériel prélevé est jaune laiteux, il s'agit d'un mâle, et si le contenu est d'un gris granuleux, il s'agit d'une femelle.

Fréquemment, la seringue reste vide. Cela signifie généralement que le volume de la gonade (cf. chapitre II.3.2.2) n'est pas satisfaisant et que probablement la glande n'est pas mature.

### *Obtention des gamètes.*

*Megathura crenulata* : rapport final des études menées entre 1993 et 2001.



**Photo 41 :** exemple de visualisation de contrôle sous microscope des œufs de *Megathura crenulata*



**Photo 42 :** installation de l'écloserie au SMEL.

Une fois le sexage effectué, les animaux sont disséqués de façon à pouvoir entièrement récupérer les gonades tout en évitant une quelconque pollution par un autre organe. Les gonades sont ensuite mises séparément dans un faible volume d'eau de mer filtrée ( $à 1 \mu\text{m}$ ). Elles sont ensuite dilacérées, afin de libérer un maximum de gamètes.

Pour récupérer les spermatozoïdes, le matériel génital mâle dilacéré est rincé abondamment sur un filtre à  $60\mu\text{m}$  et les gamètes sont stockés après filtration. De leur côté, les ovaires sont tamisées à  $1000 \mu\text{m}$ , puis à  $300 \mu\text{m}$  et enfin à  $60 \mu\text{m}$ . Les ovules sont ensuite rincés dans ce dernier tamis ( $60\mu\text{m}$ ), puis transférés dans un récipient avec de l'eau de mer filtrée à  $1 \mu\text{m}$ .

#### *Fécondation.*

La fécondation nécessite à la fois des ovules bien ronds et une bonne mobilité des spermatozoïdes. Généralement, les ovules acquièrent cette morphologie une demi heure après la dilacération. Dès que ces conditions sont réunies, il est possible d'effectuer la fécondation en ajoutant un peu de sperme dans le récipient contenant les ovules.

#### *IV.4.2.1.4.*

#### *Développement larvaire.*

Après la fécondation, le cheminement classique de fin de méiose se met en place avec expulsion des deux globules polaires, puis les divisions et les transformations se succèdent comme décrit dans le tableau 8.

Une fois la fécondation réalisée, les larves sont nettoyées et transférées dans un nouveau bac. Environ 4 à 5 heures après, les larves sont soumises à un très léger bullage accentué dès le lendemain, alors que les larves sont au stade trophopore. Pendant 2 jours, seule une surveillance microscopique est opérée, afin de vérifier le déroulement du développement larvaire.

Le timing est décrit plus précisément en annexe 2.

| Stade de développement                       | Timing   | Numéro de photo |
|----------------------------------------------|----------|-----------------|
| Expulsion du 1 <sup>er</sup> globule polaire | 5 mn     | Xa              |
| Expulsion du 2 <sup>nd</sup> globule polaire | 2 heures | Xb              |
| 1 <sup>ère</sup> division                    | 3 heures | Xc              |
| Stade trophophore                            | Jour 1   | Xd              |
| Stade véligère non éclos                     | Jour 2   | Xe              |
| Stade véligère éclos                         | Jour 4   | Xf              |
| Apparition du pied                           | 1 mois   | Xg              |
| Apparition du siphon                         | 2 mois   | Xh              |
| Juvénile formé                               | 3 mois   | Xi              |

Tableau 7 : Timing du développement larvaire de la fécondation au stade juvénile formé.

Les larves véligères sont enveloppées dans un œuf à la paroi très épaisse et très résistante (cf. chapitre II.3.2. « Cycle de reproduction »). Pour cette raison, trois ou quatre jours après la fécondation, lorsque les larves étaient prêtes à sortir de leur enveloppe, elles étaient durant quelques heures, soumises à une très forte agitation par bullage. Cette action permet la rupture de l'enveloppe par abrasion et l'expulsion de la larve. Sans cette manipulation, la larve mettait jusqu'à 7 jours ou plus pour sortir de l'œuf et la survie était nettement moins importante. Il est à noter que le milieu naturel de *Megathura crenulata* présente un hydrodynamisme très agité avec une houle importante (océan Pacifique).

Les larves étant nageuses, il est possible de les récupérer en prélevant le surnageant dans un tamis de 60µm. Après un dernier rinçage, elles sont réparties dans les bacs d'écloséries, à raison de 1000 larves par litre.

#### IV.4.2.1.5.

#### Elevage larvaire.

Entre le cinquième et le septième jour après la fécondation, la larve nageuse se métamorphose et se fixe sur les parois du bac. À partir de cet instant et pendant deux mois, le contrôle visuel est très difficile voire impossible à effectuer. La surveillance se limite à un renouvellement d'eau hebdomadaire d'environ 10% et une alimentation phytoplanctonique hebdomadaire à base de *Nannochloropsis sp*. L'eau

est maintenue à 18/19°C, la salinité autour de 33 g.l<sup>-1</sup> et une photopériode de 12h de jour et 12h de nuit est activée à une faible intensité afin de maintenir le film de phytoplancton.

Au bout de deux mois, les juvéniles atteignent environ 0,1 mm et sont visibles à l'œil nu ce qui permet un comptage de départ. La maintenance reste la même durant le mois suivant.

A la fin du troisième mois, les animaux étaient transférés des bacs d'écloserie de 200 litres vers des structures plus petites composées d'aquariums en plexiglas transparents de 30 litres, à raison de 250 individus par aquarium. L'alimentation était assurée par le même phytoplancton, auquel étaient ajoutés des cailloux encroûtés en un premier temps, qui furent remplacés, en 2001, par de l'aliment artificiel réduit en poudre, facilitant la maintenance zootechnique et induisant une croissance plus importante (+33% sur la première année - cf. tableau 9)

Le tableau 9 résume en fonction de l'alimentation, les taux de survie et la croissance mesurés durant les six premiers mois :

|                                |            | 2 mois | 3 mois | 6 mois                         | 12 mois                        |
|--------------------------------|------------|--------|--------|--------------------------------|--------------------------------|
| GROUPE I<br>(données<br>1997)  | Alim.      | Phyto. | Phyto. | Phyto. +<br>Cailloux encroûtés | Phyto. +<br>Cailloux encroûtés |
|                                | Survie     | ---    | ---    | 90%                            | 65%                            |
|                                | Croissance | ---    | ---    | 3 mm                           | 8 mm                           |
| GROUPE II<br>(données<br>2001) | Alim.      | Phyto. | Phyto. | Phyto. +<br>Alim. artificiel   | Phyto. +<br>Alim. artificiel   |
|                                | Survie     | ---    | ---    | 90%                            | 65%                            |
|                                | Croissance | ---    | ---    | 4 mm                           | 10 mm                          |

Tableau 8 : Comparatif de croissance et mortalité entre deux pontes.

#### IV.4.2.2 Les facteurs de croissance

##### IV.4.2.2.1 Identification des facteurs de croissance

La croissance des animaux en élevage est un des facteurs déterminant la rentabilité économique d'un projet aquacole. Ce facteur



est lui-même dépendant de paramètres physico-chimiques et de paramètres biotiques comme l'alimentation. Les facteurs abiotiques étant définis par ailleurs (cf. § IV.4.1), l'approche, axée sur la mesure de l'incidence de l'alimentation, s'est voulue très pragmatique. C'est ainsi que dès l'automne 1995, un premier test était engagé sur des juvéniles issus de la nature.

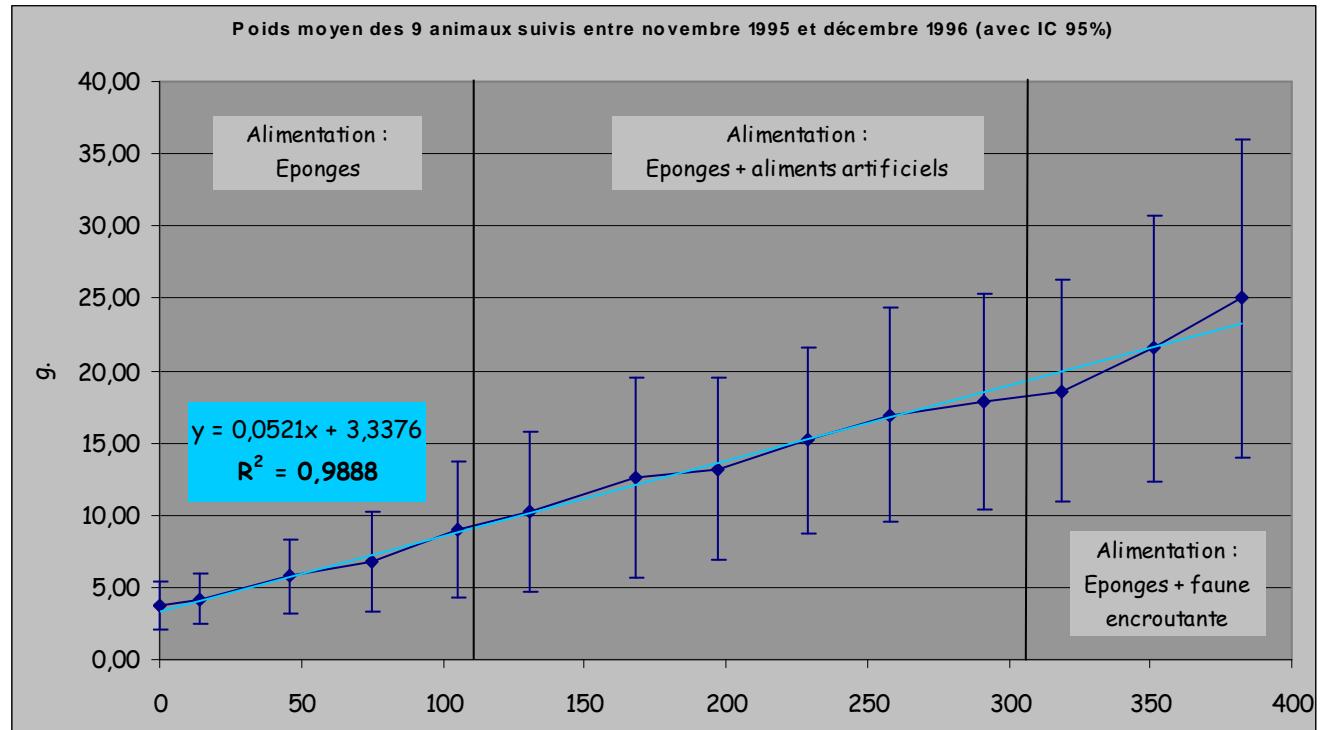
#### IV.4.2.2.2 Tests de croissance sur des juvéniles issus de la nature (lot N95.10)

La société Marinus<sup>2</sup> avait péché, durant l'automne 1995, onze mégathura juvéniles sur la côte californienne. Ces animaux envoyés au SMEL, permirent d'effectuer les premiers tests d'alimentation et de croissance sur des animaux jeunes. Pendant une année, la croissance de ces animaux fut suivie mensuellement. La faiblesse de l'effectif du lot ne permettant pas d'obtenir des conclusions représentatives (Pien, 1997), cette expérimentation avait pour objectif d'apprecier l'ordre de grandeur de la vitesse de croissance en élevage,

Deux animaux sont morts durant cette année de suivi, l'un peu après son arrivée au SMEL, et l'autre durant l'automne 1996. Le graphe 15 montre la croissance des 9 animaux.

---

<sup>2</sup> Société de pêche scientifique - Long Beach - Californie.



Graphique 16

L'alimentation durant cette année ne fut pas la même, il était impératif de tester différents scénarios. Mais, en un premier temps, les animaux étaient simplement nourris avec des éponges ramassées sur l'estran et stockées au congélateur. Mais, si l'approvisionnement en éponges est assez facile pour quelques dizaines d'animaux, les stocks semblaient épuisables dans l'optique d'un élevage plus important. Deux options se sont alors dessinées :

1. faire un état des lieux sur la spongiculture et tester sa potentialité tant à terre qu'en mer ouverte. Une étude bibliographique et technique fut menée au SMEL (Pelletier, 1997).
2. approfondir les tests sur l'alimentation de synthèse, de façon à apporter tous les éléments nécessaires à une bonne santé des animaux.

Par conséquent, de nouveaux tests furent effectués à base de granulés pour poissons moulus incorporés dans de l'alginate, et les juvéniles furent nourris avec cet aliment et des éponges en complément durant près de six mois. Si les résultats furent satisfaisants au début, il est apparu, après quelques semaines, un ralentissement de la

croissance. Cette option fut gelée, dans l'attente de progrès biotechnologiques.

Durant la dernière période, les animaux furent nourris avec des éponges mais également de la faune encroûtante, trouvée sur des cailloux récupérés au large. Si cette option est inenvisageable d'un point de vue logistique pour un élevage, elle fut choisie dans ce cas pour que les mollusques retrouvent une bonne croissance. Elle fut d'ailleurs la plus importante mesurée pour cette période. La pente de courbe de croissance est de  $0.111 \text{ g de poids frais par jour (gPF.j}^{-1}\text{)}$  du 07 octobre au 09 décembre contre  $0.052 \text{ gPF.j}^{-1}$  en moyenne sur l'année.

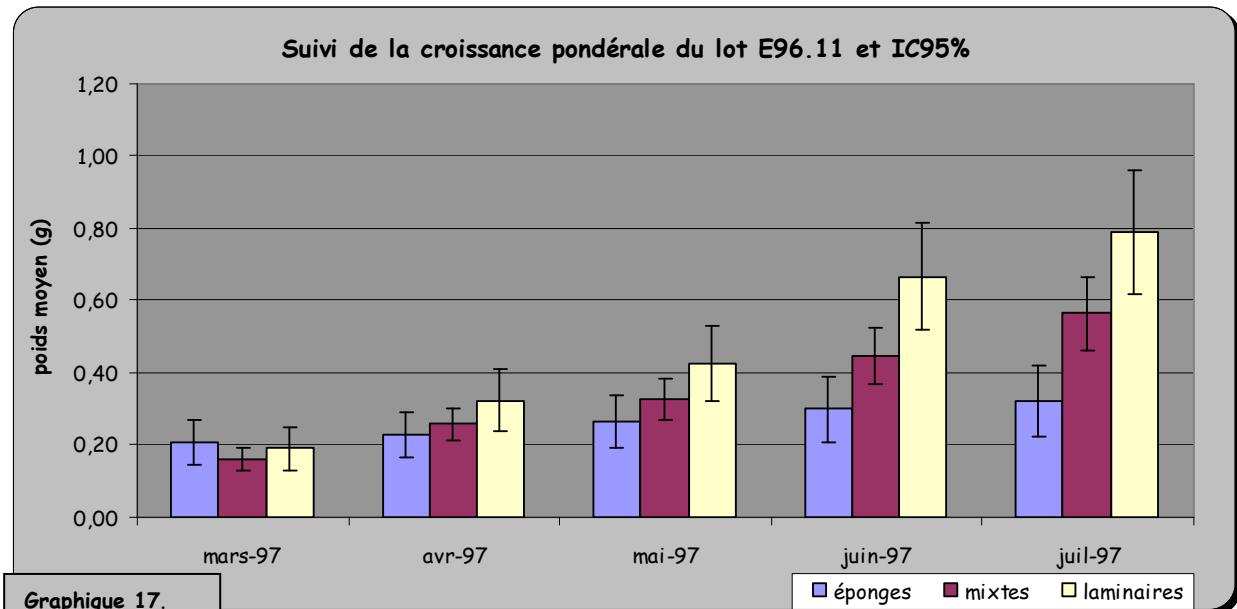
La manipulation de ces animaux a permis d'apprendre beaucoup sur la croissance de ces animaux qui peut être relativement importante, pour atteindre, la vitesse de croissance de *Haliotis tuberculata* en élevage ( $0.14 \text{ gPF.j}^{-1}$ , Basuyaix, 1997). Cependant, aucune conclusion n'est envisageable à partir d'un lot de 9 individus.

#### *IV.3.3.2. Le pré-grossissement : premières études sur l'alimentation*

En 1997, les animaux sortis d'écloserie étaient nourris, tout comme les adultes provenant du milieu naturel, avec des éponges récoltées sur l'estran puis stockées au congélateur, de la même manière que le lot N 11.95. Cependant, la vitesse de croissance était très insuffisante et d'autres solutions devaient être envisagées. Une expérience fut menée durant l'année 1998 (Pien, 1998) comparant une alimentation carnée référence avec des éponges, une alimentation algale avec *Laminaria digitata* qui donnait une réponse aux tests d'appétence menés précédemment (cf. chapitre III.2.) et une alimentation mixte mélangeant éponges et laminaires. Pendant cinq mois, les animaux étaient strictement soumis au mêmes conditions de stabulation, seule l'alimentation différait.



Le graphe 15 montre la croissance pondérale des animaux durant le temps de cette expérience.



Cette expérimentation montre de façon flagrante que l'éponge n'était un aliment adapté aux juvéniles alors que l'algue offre de meilleurs résultats. La croissance linéaire confirme ces résultats, avec un coefficient de 4 entre les croissances avec une alimentation éponges et laminaires.

| date       | 1 mars 1998 | 1 avril 1998 | 6 mai 1998 | 10 juin 1998 | 15 juillet 1998 | gain en 5 mois |
|------------|-------------|--------------|------------|--------------|-----------------|----------------|
| éponges    | 10,93       | 11,40        | 11,64      | 12,03        | 12,30           | <b>1,37</b>    |
| mixtes     | 10,37       | 11,74        | 12,54      | 13,68        | 14,63           | <b>4,26</b>    |
| laminaires | 10,77       | 12,31        | 13,30      | 14,76        | 15,94           | <b>5,16</b>    |

Tableau 9 : Gain de croissance en fonction de l'alimentation (lot E 96.11)

Cependant, il n'est pas possible de conclure que *Megathura crenulata* est un herbivore strict à cette période. En effet, il existe une micro-faune bactérienne ou fixée importante à la surface des lames de cette algue. Il est possible que cette faune soit une source importante pour des fissurelles de cette taille.

De plus, une alimentation algale donnait une croissance de 5 mm en 5 mois, alors que des ormeaux de même taille ont une croissance d'environ 1 mm par semaine (com. pers. O. Basuya). N'ayant aucune référence sur la croissance de *Megathura crenulata*, il n'était pas possible d'affirmer que ce taux de croissance était faible compte tenu de la capacité de croissance intrinsèque de ces animaux. Mais, si la

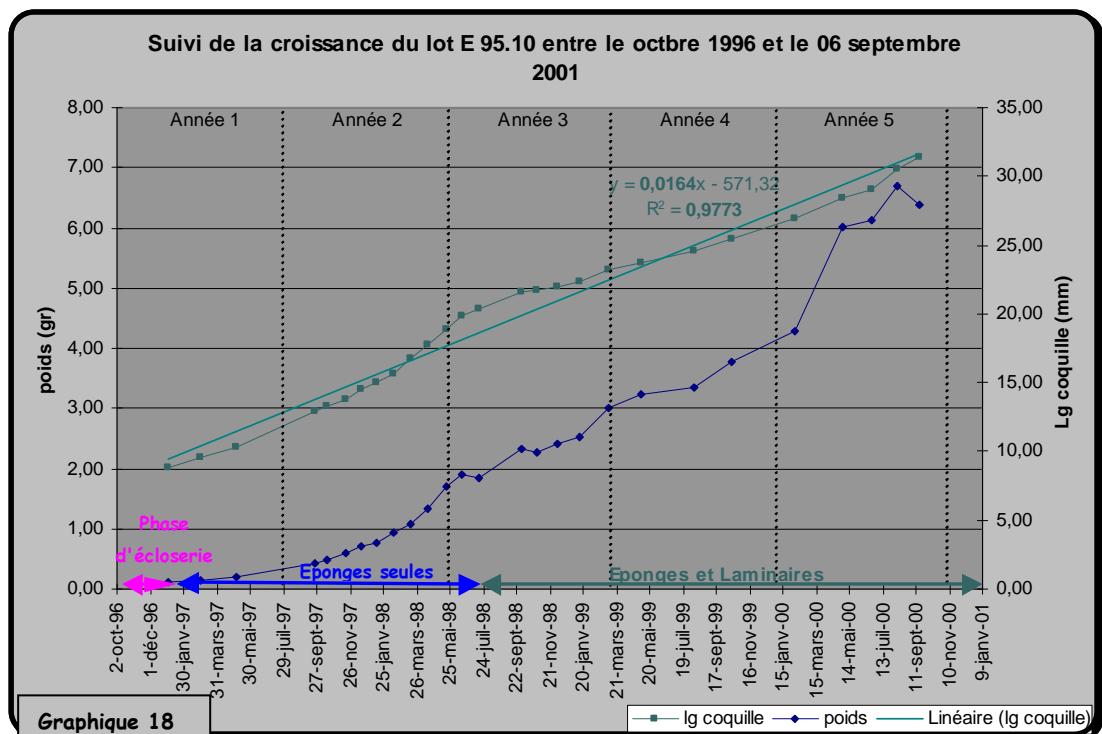
comparaison n'est pas possible avec les animaux du lot provenant du milieu naturel qui étaient beaucoup plus gros, il semble que les performances enregistrées lors de cette expérience soient bien en deçà de ce qu'il est possible d'obtenir.

#### IV.3.3.3. Le pré-grossissement : suivi de la première cohorte (Lot E 95.10)



**Photo 43 :** type de panier d'élevage de juvéniles

Suite aux observations effectuées sur les juvéniles du milieu naturel, la cohorte issue de la première ponte a permis, en un premier temps, d'effectuer un suivi de la croissance (en fonction de l'alimentation) et de la mortalité. Tout au long de ce suivi, les animaux étaient disposés dans des paniers (cf. photo 39), dans la structure de prégrossissement. La température de l'eau était d'environ 19°C, la salinité oscillait entre 33 et 35 g/l et l'obscurité totale était maintenue en permanence (sauf le temps de la maintenance quotidienne). Les animaux étaient disposés dans plusieurs paniers, en fonction de leur



taille. La biomasse dans chaque panier était équivalente mais évolutive dans le temps. L'alimentation a changé au cours de l'été 1998 au vu des résultats de l'expérience menée sur la croissance en fonction du régime

alimentaire (cf. IV.3.3.2. Le pré-grossissement : premières études sur l'alimentation, page 53)

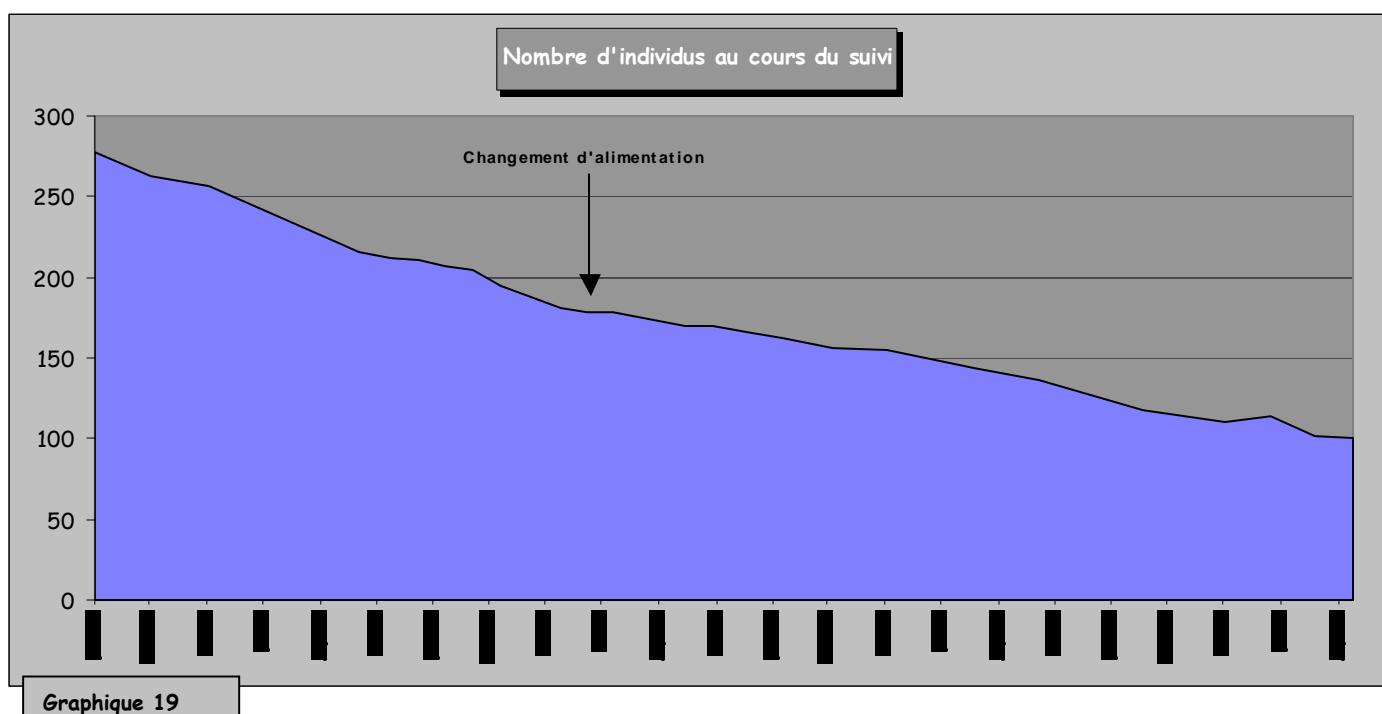
Après 5 années de suivi, la première constatation est que la vitesse de croissance est très lente, quelle que soit l'alimentation fournie. En ce qui concerne la longueur de coquille, la croissance est linéaire, quelle que soit les changements d'alimentation ou autre (le coefficient de détermination de cette courbe est de 0,977). Cette observation confirme les analyses effectuées lors de l'étude « Recherche en vue de l'évaluation de l'âge de coquilles de *Megathura crenulata* » (Cuif, 1998) affirmant que l'accroissement des coquilles était dépendant de la physiologie de *Megathura crenulata* et était parfaitement régulier tout au long de l'année.

|       | Pente de courbe |             |
|-------|-----------------|-------------|
| début | 02 janv. 97     | 15 juil. 98 |
| fin   | 15 juil. 98     | 18 sept. 01 |
| pente | 0,0033          | 0,0061      |

Tableau 10 : Pente de courbe sur deux périodes

Quant à la croissance pondérale, elle est assez irrégulière tout au long de ce suivi. Il s'avère que l'alimentation n'est pas le seul facteur limitant de la croissance, les problèmes techniques (problème de régulation thermique) ou biologiques (baisse de la salinité) interfèrent également. Toutefois, une rapide analyse permet de constater que l'alimentation mixte a permis d'améliorer la vitesse de croissance pondérale en la doublant (tableau 11).

Quant à la mortalité, elle fut régulière et surtout très importante



au cours de cette période (cf. graphe 15). Le taux calculé annuellement tournait autour de 25%. Le changement d'alimentation n'a pas infléchi le taux de mortalité.

En résumé, si l'obtention ne posait pas de problèmes, les deux principaux problèmes rencontrés au cours de cette étude jusqu'en 2000 étaient la vitesse de croissance et la mortalité des animaux. Un quart du cheptel disparaissait en un an et l'obtention d'animaux d'une centaine de grammes était prévue, par extrapolation mathématique, en une dizaine d'années. Ces résultats ne permettaient pas d'envisager un élevage viable. De plus, les premières données sur l'alimentation naturelle démontraient que *Megathura crenulata* avait un régime essentiellement carné, fait de multiples animaux fixés sur les rochers californiens mais qui excluait les spongiaires. Et ces animaux ont la particularité d'éliminer à la fois la piste du ramassage sur estran ou en plongée aux rendements misérables, tout comme son aquaculture qui en est à son balbutiement et par trop aléatoire. Cependant, et au vu des progrès biotechnologiques dans ce domaine, la priorité fut donnée à l'alimentation de synthèse.

#### *IV.3.3.4. Les aliments de synthèse.*

##### *IV.3.3.4.1 Tests sur la croissance.*

Les recherches se sont tournées sur des aliments de synthèse. Cependant, étant donné que l'aquaculture de fissurellides carnivores est inexistante, l'idée était de se tourner vers les aliments de synthèse destinés aux haliotides.

La culture des ormeaux a connu un essor important au cours de la décennie 1990 et des aliments de synthèse performants sont apparus au cours de cette période. Plusieurs d'entre eux sont testés au sein du SMEL dans le cadre de ses recherches sur l'élevage de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata*, et celui qui donnait le plus de



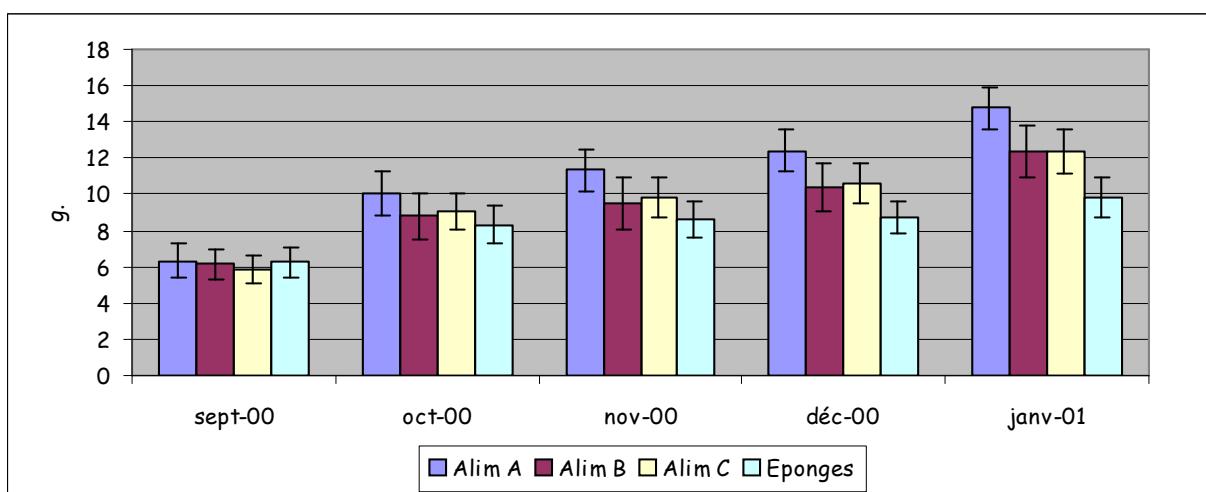
**Photo 44 :** présentation de l'aliment artificiel.

satisfaction fut un aliment provenant d'Australie, commercialisé par la société « Adam & Amos ».

Plusieurs produits de cette société sont donc donnés à *Megathura crenulata*. Leur composition est connue des seuls concepteurs, elle n'est disponible que dans les grandes lignes. Il est garanti que tous les aliments sont composés de produits naturels, basés essentiellement de céréales dans lesquelles ont été ajoutés des vitamines, des suppléments minéraux et de la farine de poisson (contrôlée et certifiée par « Allison laboratories », Triabunna, Australie).

Trois aliments différents (nommés A, B et C) ont été testés durant quatre mois, de septembre 2000 à janvier 2001. Un lot nourri avec de l'éponge a servi de témoin durant cette période (appelé lot D). L'alimentation de tous ces lots étaient complémentées avec de l'algue *Laminaria digitata*. Durant ces quatre mois, le poids frais et la longueur de coquille étaient suivis mensuellement et tous les aliments étaient fournis aux animaux *ad libitum*.

Afin de comprendre l'évolution des différents lots, l'analyse statistique utilisée est l'analyse de la variance à un facteur. Même si cette analyse est simple, elle permet de constater que les moyennes pondérales, équivalentes au début de l'expérience, ne le sont plus dès le



**Graphique 20:** évolution pondérale par représentation graphique et intervalles de confiances.

mois de Novembre, soit après deux mois d'expérience. Le calcul des intervalles de confiance confirme et visualise ce fait. Il permet de montrer que la différence s'effectue entre le lot A et le lot D.

Le tableau 14 donne le taux de croissance linéaire (pourcentage journalier) et fait le comparatif avec l'haliotide européen.

| Espèce étudiée | <i>Megathura crenulata</i> | <i>Haliotis tuberculata</i> | Rapport croissance Ormeau/fissurelle |
|----------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| Aliment A      | 0.67                       | 1.36                        | 2.03                                 |
| Aliment B      | 0.55                       | 1.18                        | 2.14                                 |
| Aliment C      | 0.59                       | 1.18                        | 2.00                                 |
| Palmaria       |                            | 1.37                        | /                                    |
| Eponges        | 0.35                       |                             | /                                    |

Tableau 11 : Comparatif des taux de croissance linéaire (en %/jour) entre la fissurelle américaine et l'ormeau européen.

Tous ces éléments indiquent très clairement que l'aliment artificiel donne des résultats supérieurs à ceux enregistrés avec le régime laminaires / éponges. En poids, le rapport entre l'aliment A, aliment qui donne les meilleurs résultats de croissance, et les éponges est de 2.35 en faveur de l'aliment artificiel. Entre les aliments et de même que pour les ormeaux, le plus performant reste le A alors que les B et C donnent des résultats équivalents. Il est à noter que le rapport des taux de croissance entre les deux espèces est toujours quasiment le même, quel que soit l'aliment considéré, compris entre 2 et 2.14 en faveur de l'ormeau.

En terme de maintenance, les aliments sont peu dégradés durant les deux premiers jours. Ensuite, la tenue dans l'eau des granulés est moins bonne, surtout pour l'aliment A qui est complètement dégradé au troisième jour.

#### IV.3.3.4.2 Influence de cette alimentation sur la qualité de l'hémocyanine.

Durant cette période, les aliments furent également fournis aux animaux issus du milieu naturel dans le but de vérifier l'influence de cet



alimentation sur la qualité de l'hémocyanine. 4 lots étaient constitués de la manière suivante :

- Le lot 1 constitué d'animaux déjà stabulés au SMEL et nourris à l'aliment artificiel depuis six mois. Ils sont ponctionnés dès le départ de l'expérience puis deux mois après.
- Le lot 2 constitué d'animaux pêchés une semaine auparavant et ponctionnés dès leur arrivée au SMEL. Ils seront ponctionnés une seconde fois après deux mois.
- Les lots 3 et 4 constitués d'animaux pêchés en même temps que ceux du lot 2, mais ponctionnés après respectivement un et deux mois de stabulation dans les locaux du SMEL.

Le calendrier de ponctions effectuées est résumé dans le tableau 15.

| Origine du lot                      | nombre | Mars 2001 | Avril 2001 | Mai 2001 |
|-------------------------------------|--------|-----------|------------|----------|
| Animaux déjà en place (lot 1)       | 10     | X         |            | X        |
| Animaux arrivés ponctionnés (lot 2) | 10     | X         |            | X        |
| Animaux du lot 3                    | 10     |           | X          |          |
| Animaux du lot 4                    | 10     |           |            | X        |

Tableau 12 : Calendrier des ponctions effectuées en 2001.

Dans le même temps, une dizaine de juvéniles fut également ponctionnées afin de vérifier sur de jeunes animaux la qualité de cette molécule.

Les ponctions et l'analyse des résultats sont réalisées par la société BIOSYN, et les résultats montrent, dans tous les cas de figure, une qualité de molécule **équivalente** à celle d'un mollusque issu de la nature. Même si l'hémocyanine se trouvait légèrement plus diluée chez un animal reponctionné, ces résultats démontrent que l'aliment artificiel permet une croissance très intéressante tout en conservant la qualité maximale de l'hémocyanine.

#### IV.3.3.5. Projet de poursuite du programme.

De ces derniers résultats sur la croissance et la qualité de la molécule, le SMEL, en collaboration avec la CCI de Granville, a proposé à Biosyn un projet d'implantation d'une unité qui devait permettre de définir les paramètres d'élevage, à partir des données acquises au cours des dernières années, et commencer une production d'hémocyanine en stabulant des animaux déjà ponctionnés pour être ponctionnés à nouveau d'une part et en débutant la production de juvéniles en grande quantité d'autre part (SMEL, 2001). Cette unité devait être implantée à Bréville sur Mer (Manche) afin de profiter des prestations de la station d'épuration d'eau de mer située sur la zone d'activités maritime de cette

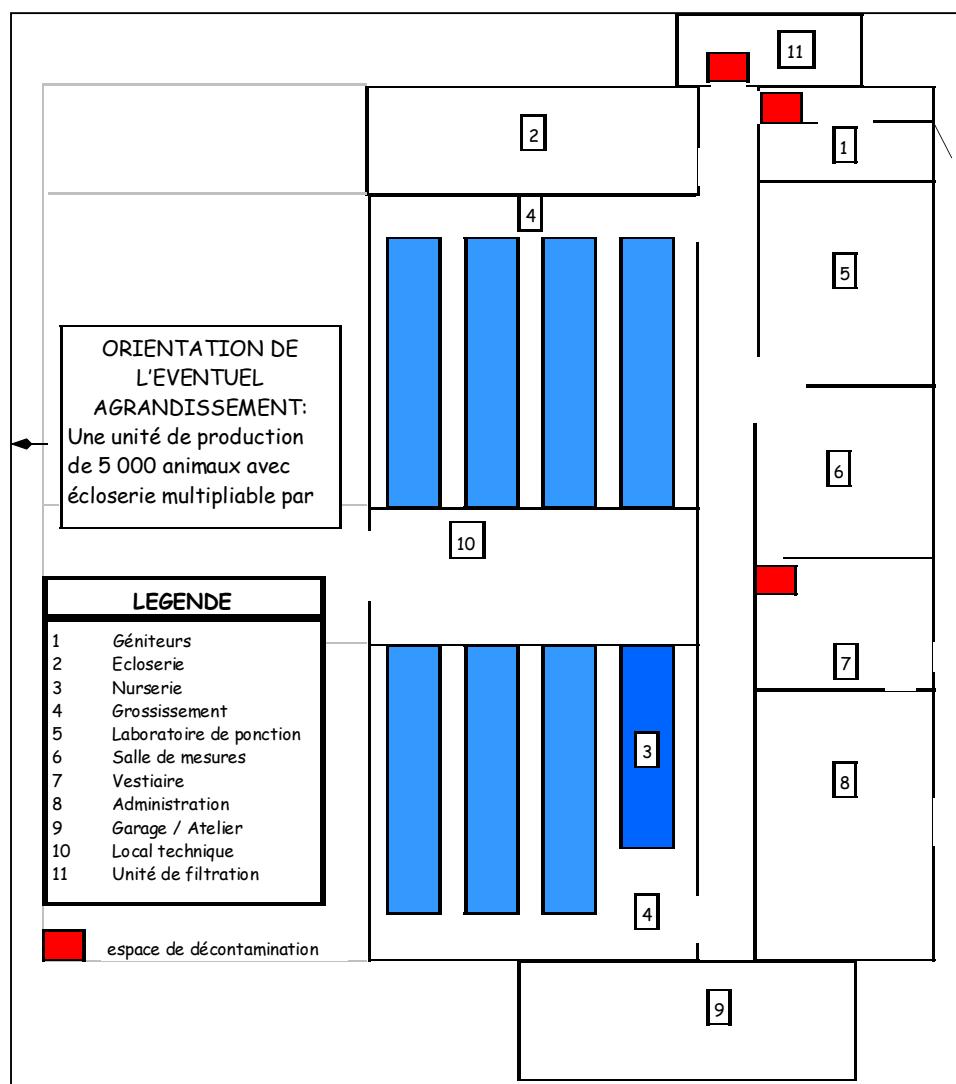


Schéma 9 : exemple d'implantation d'une ferme

commune. Cette unité était dimensionnée pour une ponction annuelle de

5000 individus, représentant deux litres d'hémocyanine native. La durée du cycle d'élevage était estimée à 6 ans.

Cette unité devait également permettre de définir les paramètres d'élevage en grande quantité, ce qui n'était pas possible dans les locaux du centre expérimental du SMEL devenu trop petit. Cette partie, plus scientifico-technique, intégrait la recherche de nouvelles techniques dans le but de raccourcir le temps d'élevage et d'améliorer les conditions zootechniques. Ce type de production imposait un cahier des charges strict, devant respecter par ordre de priorité les contraintes suivantes :

**1. Sécurité sanitaire** : elle s'imposait à toutes entrées et sorties de l'espace d'élevage, que ce soit du personnel, des fluides ou du matériel qui devaient être soumis à une décontamination préalable.

**2. Sécurité zootechnique** : en cas de problèmes techniques ou autres, il était impératif que la sécurité des animaux en élevage soit assurée.

**3. Gestion du personnel** : dépendant des choix pris par la société Biosyn (présence ou non d'une écloserie et/ou d'un laboratoire de ponction) et la prise en compte de certains paramètres ergonomiques.

**4. Gestion des fluides** : ils devaient être optimisés dans leur implantation et leur usage.

**5. Choix du site** : non pris en compte. (extrait du rapport « Pré-industrialisation de la production d'hémocyanine native », SMEL, 2001).

Cette étude a conduit à l'élaboration d'un exemple d'implantation de cette unité représentée sur le schéma 9 (page 71).

De ce rapport, le SMEL et la CCI ont estimer les prix d'installations, hors coût du bâtiment (la décision d'une création, d'une réfection de locaux existants ou d'une location n'ayant été prise) et de fonctionnement sur 6 ans. Le tableau 14 présente les résultats.

| Domaine d'investissement      | Coût (en €)   |
|-------------------------------|---------------|
| Estimatif du coût du mobilier | 293 000 € TTC |
| Coût de production sur 6 ans  | 507 000 € TTC |

Tableau 13 : Prévisionnel de coûts d'une unité expérimentale de production

Ce dossier fut transmis à la société Biosyn, qui après un an de réflexion, n'a pas souhaité s'investir davantage dans ce projet. La société était en proie à des difficultés économiques lui imposant de nouvelles orientations dans sa stratégie d'entreprise.

## CHAPITRE 5 / DEVELOPPEMENT ET CONSEIL A L'ENTREPRISE

### V.1. Objectifs.

Tout au long de cette étude, Biosyn a toujours cherché à diversifier ses apports en hémocyanine, et, par conséquent, en *Megathura crenulata*. Pour des questions de stratégie d'entreprise, les dirigeants de cette société ne pouvaient se baser uniquement sur l'élevage à terre en Europe. Les autres possibilités envisagées étaient la pêche, méthode déjà utilisée au début du projet et toujours d'actualité, l'élevage en mer, en Californie ou l'élevage à terre sur la Côte Ouest des Etats-Unis. L'objectif de l'entreprise était de faire un état des lieux, tant d'un point de vue écologique qu'économique, des possibilités de production. C'est dans ce cadre et en qualité d'expert en biologie marine et en techniques d'élevage que Biosyn a demandé l'aide du SMEL pour effectuer cette analyse.

### V.2. Calendrier et budget

Cette action s'est traduite tout au long de la collaboration par des actes ponctuels. Le plus souvent, cela se traduisait par des questions sur diverses domaines (biologie, technologie,...) lors de nos rencontres, tant en France qu'en Allemagne ou à l'occasion de communications téléphoniques ou par internet. Toutefois, Biosyn a demandé aux agents du SMEL de se déplacer en Californie afin de mieux cerner la situation sur place. Un premier voyage eut lieu en Août 1993, au tout début de ce programme, dont le but était de prendre connaissance de l'animal.

En 1999 et 2000, une série de quatre déplacements fut programmée afin de répondre à une problématique double :

- Approfondir la connaissance biologique de ce mollusque, notamment sur l'alimentation.
- Analyser le contexte scientifico-professionnel de l'aquaculture sur la côte californienne.

Il est difficile d'apprécier les frais engendrés par ces voyages qui furent pris en charge à 100% par la société BIOSYN. La charge du SMEL dans ce cadre se résume à du temps agent, qui représente, en terme de déplacement, à environ 100 jours sur les 9 années du programme.

### V.3. Résultats.

Cette aide s'est passé à plusieurs niveaux, de la simple question d'ordre scientifique ou technique à une présence physique des agents du SMEL sur certains lieux, comme, par exemple, la visite de fermes marines ou laboratoires aux Etats-Unis. Biosyn, dans ce cas, demandait l'avis du SMEL. Dans ce rapport, il est présenté deux exemples d'actions.

#### V.3.1. Pré-étude de stock.

Lors des déplacements de 1999/2000, la question se posait de l'état des stocks de *Megathura crenulata* dans le cadre d'une pêche en vue d'une production. Certes, la capture du moment était anecdotique (environ 1500 individus par an) et les prévisions sur les années suivantes (au maximum 5000 individus) ne présentaient pas, à priori, de danger pour l'espèce. Cependant, afin de prévoir un développement probable et souhaitable, Biosyn souhaitait acquérir des informations sur ce domaine, a demandé aux agents du SMEL de les aider dans cette tâche. Après interrogation des professionnels et des administrations sur place, il s'est très vite avéré qu'il n'existaient aucune donnée sur le sujet.

Lors des plongées effectuées *in situ* durant cette période, quelques cadrats ont permis d'apprécier la densité de la fissurelle aux endroits où elle semblait la plus importante.

| Lieu                                                                        | site              | date       | nb de cadrats | nb d'individus | individus / 10m <sup>2</sup> |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------|---------------|----------------|------------------------------|
| Los Angeles                                                                 | Point Vincente    | 25-juin-99 | 5             | 9              | 1,8                          |
| Channel Islands                                                             | Anacapa Island    | 29-juin-99 | 2             | 2              | 1                            |
| Channel Islands                                                             | Santa Cruz Island | 29-juin-99 | 4             | 8              | 2                            |
| Channel Islands                                                             | Santa Cruz Island | 29-juin-99 | 4             | 3              | 0,75                         |
| Channel Islands                                                             | Gull Island       | 30-juin-99 | 5             | 7              | 1,4                          |
| Los Angeles                                                                 | Point Vincente    | 8-déc-99   | 4             | 17             | 4,25                         |
| Los Angeles                                                                 | White Point       | 9-déc-99   | 4             | 5              | 1,25                         |
| Los Angeles                                                                 | Point Vincente    | 6-avr-00   | 1             | 5              | 5                            |
| Los Angeles                                                                 | White Point       | 6-avr-00   | 4             | 15             | 3,75                         |
| Tableau 14 : Détails des différents cadrats effectués au SMEL en Californie |                   | TOTAL      | 33            | 71             | 2,15                         |

Ce chiffre n'a aucune valeur, il a simplement pour but de confirmer l'impression qu'avaient les plongeurs du SMEL sur les densités observées. En effet, aux Iles Chausey, la densité d'ormeaux calculée dans les zones à plus forte densité va de 10 à 30 individus pour 10 m<sup>2</sup> (Richard, 1988), alors que l'archipel était déjà considéré comme un « Eldorado haliotique » perdu. Par contre, aucune estimation de surface n'a pu être effectuée, elle était bien trop importante à couvrir pour deux plongeurs français restant une semaine dans l'immensité californienne. Cependant, cette petite étude a permis de faire comprendre à Biosyn que la ressource était probablement fragile et en aucun cas inépuisable.

### V.3.2. Conseil technologique.

Au début du programme, Biosyn faisait venir les animaux pêchés jusqu'en Allemagne, pour les stocker avant la ponction dans des aquariums alimentés à l'eau de mer artificielle. Cette méthode n'offrait pas toutes les satisfactions, la molécule se scindait en deux et devenait inutilisable.

En 1997, après le succès de la stabulation au SMEL et les premiers résultats sur l'élevage, Biosyn a décidé de construire, avec l'appui technique des agents du SMEL, une unité de stabulation sur le schéma d'une structure en circuit fermé utilisé au SMEL. Les résultats sur la qualité de la molécule furent excellents.

En 2000, Biosyn a entrepris de monter une unité en Californie avec deux objectifs :

- Affirmer l'implantation de toute l'entreprise sur le continent nord américain.
- Etre à proximité de la source biologique de *Megathura crenulata*.

Cette unité fut conçue avec une partie technique qui contient trois unités de stabulation d'animaux en circuit fermé en ligne, sur le modèle de la technique utilisée au SMEL. Elle possède également un laboratoire de ponction. Cela leur permet de faire pêcher les animaux, de les stabuler deux ou trois semaines durant, de les ponctionner en partie, puis de les ramener dans leur milieu naturel.

## CHAPITRE 6 / CONCLUSION

Au terme de huit d'années d'études, il en ressort que *Megathura crenulata*, dont on ne connaissait biologiquement rien ou quasiment, est une espèce potentiellement possible à élever, à terre et à des milliers de kilomètres de son milieu naturel, de la larve à la ponction d'un animal d'élevage avec une hémocyanine de qualité. Pour cela, il a fallu maîtriser la reproduction et la vie larvaire, l'alimentation de ces animaux en élevage, que ce soit en prégrossissement comme en grossissement ou en stabulation, et la zootechnie appliquée à cette espèce. Ces données furent acquises par l'intermédiaire du centre expérimental du SMEL, et du local de confinement existant qui a permis d'accueillir cette espèce sans aucun risque pour le milieu extérieur et d'y élaborer nombre d'expérimentations.

Le résultat de ce travail est que le SMEL a pu définir, en un premier temps, les paramètres de stabulation de cet animal. Ceci a permis à la société Biosyn d'implanter aux Etats-Unis une unité de ponction opérationnelle à ce jour. En un second temps, les paramètres d'élevage en circuit fermé purent être en partie déterminés. Un projet de poursuite de ces études à plus grande échelle, permettant un début de production tout en poursuivant la partie recherche, fut élaboré en collaboration avec la Chambre d'Industrie et de Commerce du Centre et Sud Manche de Granville.

Le SMEL a également conseillé la société Biosyn durant ces sept années dans le domaine de la biologie marine et de ses applications biotechnologiques, domaine qui leur était inconnu. Certaines expertises ont pu être effectuées tant en Europe (France ou Allemagne) qu'aux Etats-Unis.

Cependant, cette société a décidé, courant 2002, de ne pas poursuivre cette collaboration plus en avant. Plusieurs paramètres

peuvent expliquer ce choix. Tout d'abord, l'entreprise était en proie à des difficultés financières depuis quelques mois. Il fut alors décidé d'arrêter certains programmes déficitaires et limiter les dépenses de projet à la balance budgétaire nulle. Le programme hémocyanine faisait partie de ce deuxième cas de figure et, après plusieurs discussions au sein de la direction de l'entreprise, il fut décidé de ne pas poursuivre la partie « recherche et développement » des projets à la rentabilité nulle, pour se concentrer sur la partie production. Cette décision fut appliquée à *Megathura crenulata*. Si le programme de recherche est stoppé, la production continuait en 2002, avec une pêche des animaux et une ponction partielle dans leur unité californienne à Carlsbad. Les animaux sont ensuite rapatriés dans leur endroit naturel.

L'autre point provient de la recherche scientifique. Au début du programme, en 1993, il semblait que la synthèse de la molécule d'hémocyanine était réalisable dans un futur très lointain. La grande taille de cette molécule ne permettait pas d'envisager cette biosynthèse avec les techniques du moment. Cependant, ces techniques ont énormément évolué en sept années, au delà des prévisions de départ. Et elles devaient permettre, en 2002, à l'équipe du Pr. Jorgen MARKL, collaborateur de Biosyn depuis de nombreuses années, de réaliser une biosynthèse de l'hémocyanine. Cette technique a, comparé à l'élevage, de nombreux avantages, comme la sécurisation de l'approvisionnement, une réactivité plus grande et une grande souplesse de production en relation avec la demande.

## BIBLIOGRAPHIE.

- AINSLIE, R.C.** 1980. The quantitative role of Haemocyanin in the respiration of Abalone (genus *Haliotis*). *The journal of experimental zoologie*. 211:87-89.
- AMINOT, A. & M. CHAUSSEPIED.** 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Édité par le Centre National pour l'Exploitation des Océans. France. 395p.
- ANDERSON, R.J., G.J. LEVITT, D.W. KEATS & R.H. SIMONS.** 1993. The role of herbivores in the collapse of the Gracilaria resource at Saldanha Bay, South Africa. *Hydrobiologia*. 260/261 : 285-290.
- ANTOLINI, R. & G. MENESTRINA.** 1979. Ion conductivity of the open keyhole limpet hemocyanin channel. *FEBS letters*. Vol 100, n° 2. 377-381.
- BASUYAUX, O.** 1997. Etude et modélisation des paramètres physico-chimiques en élevage en circuit fermé. *Thèse de l'Université de Caen*. 237pp.
- BENINGER, P.G. & R. CANNUEL.** 2000. Etude histologique du cycle reproducteur de l'archéogastéropode *Megathura crenulata*. *Université de Nantes, ISOMER*. 23pp.
- BIRAIIS, D., O. RICHARD & S. PACARY.** 1994. Etat d'avancement des travaux au 03 mars 1994. *Rapport SMEI*. 19pp.
- BLIN , J.L.** 1992. Ecloserie d'oursins et d'ormeaux. *Rapport de stage DESS « Exploitation des ressources cotières vivantes »*. 84pp.
- BLIN, J.L.** 2000. Etudes *in-situ*, compte-rendu du voyage d'avril 2000 (plongées, contacts,...). *Rapport SMEI*. 13pp.
- BOUTAN L.** 1885. L'anatomie et le développement de la fissurelle / Comparaison avec les types voisins. *Arch. De Zool. Exp. Et Gen. 2<sup>e</sup> série. TIII bis suppl.* 172 pp.
- BRETOS, M.** 1978. Growth in the keyhole limpet *Fissurella crassa* Lamark in nothern Chile. *The Veliger*. 21(2), 268-273.
- BRETOS, M.** 1979. Observaciones sobre *Fissurella bridgesii* Reeve, 1849, en Tarapaca, norte de Chile. *Cien. Y Tec. Del Mar. Cona 4* : 53-60.
- BRETOS, M.** 1980. Age determination in the keyhole limpet *Fissurella crassa* Lamark (archaeogastropoda, fissurellidae) based on shell growth rings. *Biol. Bull.* **159**, 606-612.
- BRETOS, M.** 1980. La formacion de anillos de crecimientos en *Fissurella crassa* en el norte de Chile. *Bolm Inst. Oceanogr., S. Paulo*. **26**(2), 69-71.
- BRETOS, M.** 1982. Biologica de *Fissurella maxima* Sowerby (mollusca : archaeogastropoda) en el norte de Chile. 1. caracteres generales, edad y crecimiento. *Cahiers de Biologie Marine*. Tome XXIII, 159-170.
- BRETOS, M., J. GUITERREZ & Z. ESPINOZA.** 1988. Estudios biologicos para el manejo de *Fissurella picta*. *Medio Ambiente*. **9**(1), 28-34.
- BRETOS, M., V. QUINTANA & V IBARROLA.** 1988. Estudios biologicos para el manejo de *Fissurella nigra*. *Medio Ambiente*. **9**(1), 55-62.
- BYRNE, M.** 1990. Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered habitat on the west coast of Ireland. *Marine Biology*. **104**, 275-289.

- CHANUT, B.** 1994. *Megathura crenulata*. Etat d'avancement des travaux au 28 juillet 1994. Rapport de stage SMEL. 25pp.
- CLAVIER, J. & O. RICHARD.** 1985. Etudes sur les ormeaux dans le région de Saint Malo. Association pour la mise en œuvre du littoral de la côte d'Emeraude. 285pp.
- COCHARD, J.C.** 1980. Recherches sur les facteurs déterminant la sexualité et la reproduction chez *Haliotis tuberculata L.* Thèse de l'université de Bretagne Occidentale. 157pp.
- CUIF, J.P. & Y. DAUPHIN.** 1998. Recherche en vue de l'évaluation de l'âge de coquilles de *Megathura crenulata* provenant de Californie à partir de juvéniles élevés en aquarium. Université Paris XI. 17pp.
- ENZO ACUÑA, S.** 1977. Estudio preliminar de edad y crecimiento de *Fissurella latemarginata* (Sowerby, 1834) en Tocopilla, Chile (mollusca, gastropoda, fissurellidae). *Rev. Biol. Mar. Dep. Oceanol. Chile.* 16(2), 117-124.
- FOX, R.** 1994. *Diodora cayenensis*. Lander University of Greenwood. 7pp.
- FRANZ, C.J.** 1990. Seasonal, diurnal and nocturnal activity patterns of three species of Caribbean intertidal keyhole limpets (mollusca: Gastropoda: *Fissurella*). *The Veliger.* 33(2), 155-165.
- FRANZ, C.J.** 1990. Differential algal consumption by three species of *fissurella* (mollusca: Gastropoda) at Isla de Marguerita, Venezuela. *Bulletin of Marine Science.* 46(3), 735-748.
- FRANZ, C.J.** 1990. Feeding patterns of *Fissurella* species on Isla de Marguerita, Venezuela : use of radulae and food passage rate. *J. Moll. Stud.* 56, 25-35.
- GIESE, A.C.** (1959). Comparative physiology : annual reproductive cycles of marine invertebrates. *Ann. Rev. Physiol.* 21, 547-576.
- GIORGI, A.E. & J.D. DEMARTINI.** 1976. A study of the reproductive biology of the red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson, near Mendocino, California. *Calif. Fish and Game.* 63(2), 80-94.
- GONZALES, S.A., W. STOTZ, P. TOLEDO, M. JORQUERA & M. ROMERO.** 1991. Utilizacion de diffrentes microambientes del intermareal como lugares de asentamientos por *Fissurella spp.* (Gastropoda : Prosobranchia) (Palo Colorado, Los Vilos, Chile). *Rev. Biol. Mar., Valparaíso.* 26(2), 325-338.
- HARRIS, J.R., Z. CEJKA, A. WEGENER-STRAKE, W. GEBAUER & J. MARK.** 1992. Two dimensional crystallization, transmission electron microscopy and image processing keyhole limpet haemocyanin (KLH). *Micron and Microscopia Acta.* Vol. 23, No 3, pp 287-301.
- HARRIS, J.R. & J. MARKL.** 1992. Electron microscopy of a double helical tubular filament in keyhole limpet (*Megathura crenulata*) hemolymph. *Cell Tissue Res.* 269: 411-420.
- HUGUES, R.N.** 1971. Ecological energetics of the keyhole limpet *Fissurella barbadensis* Gmelin. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 6, 167-178.
- LEIGHTON, D.L.** 1974. The influence of temperature on larval and juveniles growth in three species of southern California abalones. *Fish. Bull.* 72(4), 1137-1145.
- MANSOUR, M.M., P.O. ALI, Z. FARID, A.J.G. SIMPSON & J.W. WOODY.** 1989. Serological differentiation of acute and chroic schistosomiasis Mansonii by antibody responses to keyhole limpet hemocyanin. *Am. J. Med. Hyg.* 41(3), 338-344.
- MARGOLIN, A.S.** 1963. The mantle response of *Diodora aspera*. *Animal Behaviour.* XII(1), 187-194.
- MARKL, J., M. NOUR EL DIN, S. WINTER-SIMANOWSKI & U. A. SINAMOWSKI.** 1991. Specific IgG activity of sera from egyptian schistosomiasis patients to keyhole limpet hemocyanin (KLH). *Naturwissenschaften.* 78, 30-31.

- MARKL, J., A. SAVEL-NIEMANN, A. WEGENER-STRAKE, M. SÜLING, A. SCHNEIDER, W. GEBAUER & J.R.HARRIS.** 1991. The role of two distinct subunit types in the architecture of keyhole limpet hemocyanin (KLH). *Naturwissenschaften*. 78, 512-514.
- MARKL, J., B. LTEB, W. GEBAUER, B. ALTENHEIM, U. MAISSNER & J. ROBIN HARRIS.** 2001. Marine tumor vaccine carriers : structure of the molluscan hemocyanins KLH and HtH. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* 127 (suppl. 2). R3-R9.
- MENESTRINA, G. & R. ANTOLINI.** 1982. The dependence of the conductance of the hemocyanin channel on applied potential and ionic concentration with mono- and divalent cations. *Biochimica et Biophysica Acta*. 688, 673-684.
- MURDOCK, G.R. & S. VOGEL.** 1978. Hydrodynamic induction of water flow through a keyhole limpet (Gastropoda, Fissurellidae). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 61A, 227-231.
- NEWMAN, C.G.** 1967. Reproduction of the South African abalone, *Haliotis midae*. *S. Afr. Div. Of Sea Fish, Invest. Report.* 13. 227-233.
- OLIVA, D. & J.C. CASTILLA.** 1992. Guia para el reconocimiento y morfometria de diez especies del genero *fissurella* Bruguiere, 1789 (mollusca, gastropoda) comunes en la pesqueria y conchales indigenas de Chile central y sur. *Gayana, Zool.* 56(3-4), 77-108.
- OLIVARES, A., M. BRETOS, R. CHIHUAULAF & A. ZENIS.** 1998. Biometria, habitat y epibiontes en *Fissurella latimarginata* (mollusca : prosobranchia) en el norte de Chile. *Estud. Oceanol.* 17 : 95-103.
- ORTEGA, S.** 1985. Competitive interactions among tropical intertidal limpets. *J. Exp. Biol. Ecol.* Vol. 90, 11-25.
- PERRIN, B., A. HILY & F. POIRIER.** 2002. L'approche du régime alimentaire de *Megathura crenulata* dans son milieu naturel par l'étude du contenu stomacal. *Rapport SMEL/LAUBS*. Disp. sur CDrom.
- PIEN, S.** 1995. *Megathura crenulata*, alimentation crabes, aspects quantitatifs et comportementaux. *Rapport SMEL*. 15pp.
- PIEN, S.** 1996. Aliments de synthèse, tests d'appétence pour *Megathura crenulata*. *Rapport SMEL*. 12pp.
- PIEN, S & J.L. BLIN.** 1997. Suivi du lot N 11.95 durant l'année 1996, divers essais de stabulations, alimentation, observations et remarques. *Rapport SMEL*. 9pp.
- PIEN, S.** 1998a. Suivi du lot 95.10 sur les deux premières années. *Rapport SMEL*. 21pp.
- PIEN, S.** 1998b. Comparaison entre trois différents régimes alimentaires chez des juvéniles (de 12 mois). *Rapport SMEL*. 11pp.
- PIEN S. & J.L. BLIN.** 1999. *Megathura crenulata*, activités 1998, projets 1999 (rapport d'activités destinés à Biosyn). *Rapport SMEL*. 7pp.
- PIEN S & J.L. BLIN.** 1999. Etudes *in-situ*, Partie 1 : compte-rendu du voyage (plongées, contacts...). *Rapport SMEL*. 33pp.
- PIEN S. & J.L. BLIN.** 2000. *Megathura crenulata*, activités 1999, projets 2000 (rapport d'activités destinés à Biosyn). *Rapport SMEL*. 7pp.
- PIEN, S.** 2000. Etudes *in-situ*. Compte-rendu du voyage d'octobre 2000 (plongées, contacts,...). *Rapport SMEL*. 7pp.
- PIEN, S.** 2000. Suivis mensuels de l'indice gonadique chez la fissurellide *Megathura crenulata*. *Rapport SMEL*. 11pp.
- PIEN , S.** 2001. *Megathura crenulata*. Tests de croissance avec différents aliments artificiels (Adam & Amos). *Rapport SMEL*. 6pp.

**PIEN, S. & O. RICHARD.** 2001. Rapport technique. Pré-industrialisation de la production d'hémocyanine. Faisabilité technique et dimensionnement. *Rapport SMEL*. 11pp.

**PIEN, S.** 2003. Programme *Megathura crenulata*. Bilan synthétique 1993-2002. *Rapport SMEL*. 8pp.

**PRICE, P.** 1974. Aspects of the reproductive cycle of the red abalone, *Haliotis rufescens*. *Masters thesis, San Diego State Univ.* 64pp.

**RICHARD, O.** 1988. Reconnaissance des populations naturelles d'ormeaux de l'Archipel de Chausey. *Rapport SMEL*. 41pp.

**RICHARD, O.** 1995. Etat des travaux au 25 mars 1995. *Rapport SMEL*. 3pp.

**RUNHAM, N.W.** 1961. The histochemistry of the radula of *Patella vulgata*. *Journal of Microscopical Science*. Vol. 102, part. 3, 371-381.

**SAVEL-NIEMANN, A., A. WEGENER-STRAKE & J. MARKL.** 1990. Keyhole limpet hemocyanin : on the structure of a widely used immunological tool. *Invertabrate Dioxygen Carriers*. 351-355.

**SENOZAN, N.M. & M. BRIGGS.** 1989. Hemocyanin levels in the giant keyhole limpet, *Megathura crenulata*, from the coast of California. *Biochem. Physiol.* Vol 94a, No 2, pp 195-199.

**SHIBUI, T.** 1971. Studies of the transplantation of the red abalone and its growth and development. *Jap. Soc. Sci. Fish. Bull.* 37(12), 1168-1172.

**SUNG CO, M. & K.O. HODGSON.** 1981. Copper site of deoxyhemocyanin. Structural evidence from X-ray absorption spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 3200-3201.

**VERWEIJ, J.J., A.M. POLDERMAN, L.G. VISSER & A.M. DEELDER.** 1995. Measurement of antibody response to keyhole limpet haemocyanin was not adequate for early diagnosis of shistosomiasis in a group of Dutch visitors to Mali. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 89, 48-50.

**WEIGLE, W.O.** 1965. Immunochemical properties of hemocyanin. *Immunochemistry*. Vol. 1, pp 295-302.

**WEIGLE, W.O.** 1966. The induction of a hyporesponsive state to hemocyanin. *The Journal of Immunology*. Vol. 96, No 2, pp 319-323.

**YOUNG, J.S. & J.D. DEMARTINI.** 1970. The reproductive cycle, gonadal histology in the balck abalone *Haliotis cracherodii* (Swainson). *Calif Fish. & Game*. 56(4), 298-309.

# ANNEXE

TIMING DE LA PHASE DE  
REPRODUCTION DE  
*MEGATHURA CRENULATA* :  
DE L'ŒUF AU JUVENILE DE 3  
MOIS

