



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Facultad de Biología

Valorización de la Macroalga Proliferante *Grateloupia*
Turuturu en la Cría en Cautividad de la Oreja de Mar
Europea *Haliotis Tuberculata*

NURIA GARCÍA BUENO

2015

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE
VEGETAL, ENVIRONNEMENT, NUTRITION
AGROALIMENTAIRE, MER (VENAM)

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Année 2015

**Valorisation de la macroalgue proliférante
Grateloupia turuturu dans l'élevage de
l'ormeau européen *Haliotis tuberculata***

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie Marine

Spécialité : Aquaculture

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Nuria GARCÍA BUENO

Le 19 janvier 2015, devant le jury ci-dessous

Président M. **RICO ORDÁS** Jose Manuel, Professeur • Universidad de Oviedo
Rapporteurs M. **AR GALL** Erwan, Maître de Conférences • Université de Bretagne Occidentale
Mme **COURTOIS DE VIÇOISE** Gercende, Chargé de Recherché • Universidad de Las Palmas de Gran Canarias
Invité Mme **DUMAY** Justine, Maître de Conférences • Université de Nantes

*Directeurs de thèse M. **FLEURENCE** Joël, Professeur • Université de Nantes
M. **MARIN ATUCHA** Arnaldo Aitor, Professeur • Universidad de Murcia*

*Co-encadrants Mme **DECOTTIGNIES** Priscilla et M. **TURPIN** Vincent, Maîtres de Conférences • Université de Nantes*

Remerciements

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han estado a mi lado y me han ayudado de una u otra forma durante la realización de mi Tesis Doctoral, en especial:

Tout d'abord, je souhaite remercier mon directeur français Joël Fleurence, Professeur à l'Université de Nantes, d'avoir accepté de diriger mon travail de thèse en co-tutelle. Je le remercie pour ses conseils et les encouragements qu'il a su me prodiguer au cours de ces années d'encadrement. Toute ma reconnaissance pour son aide et son soutien tout le long de ma thèse.

A mi director español, Arnaldo Aitor Marin Atucha, por haber aceptado la dirección de esta tesis en co-tutela, por sus útiles consejos e inestimable ayuda tanto dentro como fuera del laboratorio, en especial en nuestras salidas de buceo a La Azohía. Agradecerle también todo su apoyo en los difíciles trámites para conseguir la realización de la misma.

Un énorme GRACIAS à mes encadrants de thèse. Tout ma reconnaissance à Priscilla Decotignies-Cognies, Maître de Conférences à l'Université de Nantes, de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce doctorat (no lo olvidaré nunca). Je la remercie pour sa patience, ses précieux conseils tant en recherche qu'en enseignement, son écoute, son enthousiasme, son ouverture d'esprit, son encouragement, son soutien inconditionnel et pour m'avoir fait garder confiance jusqu'à la fin et me transmettre tout son optimisme. Merci également à Vincent Turpin, Maître de Conférences à l'Université de Nantes, d'avoir accepté d'encadrer ce travail. Je le remercie pour ses remarques constructives, son soutien inconditionnel, son encouragement, sa patience et de m'avoir transmis ses connaissances. Merci aussi por ton infaillible bonne humeur ;-).

J'adresse mes sincères remerciements à Justine Dumay, Maître de Conférences à l'Université de Nantes, pour toute son aide dans ce travail. Son enthousiasme et son infaillible confiance m'ont été d'une grande aide durant ces années. Merci d'avoir bien

voulu apprendre la biochimie à une environmentaliste ;-), merci pour ton écoute et ta patience.

Je souhaite aussi remercier Bruno Cognie, de m'avoir accepté comme étudiante Erasmus Practicum en me permettant de retourner en France et d'intégrer ainsi le laboratoire MMS. Merci également pour son aide tout au long de ce travail.

Je remercie le Docteur Erwan Ar Gall et le Docteur Gercende Courtois de Viçoise d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Je remercie également Isabelle Mussio et Valérie Stiger-Pouvreau d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse et me soutenir pendant ces années.

Muchísimas gracias al Profesor José Manuel Rico Ordás por haber aceptado formar parte de mi tribunal de tesis como presidente del mismo. Espero que sea el inicio de muchas colaboraciones con Grateloupia turuturu ;-).

Je tiens à remercier toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

Merci à toutes les personnes avec lesquelles j'ai été amenée à travailler au cours de ces quatre années : Christine Paillard pour sa rigueur scientifique, son aide et son encadrement lors de mon passage au LEMAR, à Marion Cardinaud pour son aide et son accueil lors de mes manips au LEMAR, un énorme merci à Denise Jahan pour son aide dans mes interminables manips de microbiologie mais surtout pour sa bonne humeur, son amabilité et son soutien.

Un grand MERCI à Agnès Travers de m'avoir permis d'effectuer les manips in vivo avec mes petits ormeaux à La Tremblade. Je voudrais la remercier pour son accueil, sa gentillesse, son ouverture d'esprit et pour ses encouragements à persévérer dans le monde de la recherche.

Je voudrais remercier tous les occupants du bâtiment ISOMER. Merci à Alexandra, Richard, Joseph, Christophe, Peter, Véronique, Vona, Fanny, Pierre et Laurent. Merci à Michèle Morançais pour ses conseils en chimie et sa bonne humeur. Merci à Philippe Rosa pour me faire sentir un peu plus chez moi grâce à son esprit méditerranéen et pour avoir partagé une magnifique semaine de plongée en Espagne et ne jamais avoir baissé les bras malgré une organisation pas toujours évidente ;-). Un énorme merci aux nouveaux arrivants Paul et Carol pour m'avoir rendue plus facile la fin de ma thèse, merci pour votre bonne humeur et soutien ;-). Merci également à mes collègues de BA : Olivier, Tanguy, Pascal et Odile avec qui j'ai passé de très bons moments en enseignements et qui m'ont toujours encouragée dans mes travaux.

Un ENORME merci à mes loulous « doctorants » et « contractuels » avec qui j'ai partagé beaucoup de moments de détente et de légèreté autour de petits déjeuners : à Trang pour son sourire à perpétuité et sa gentillesse infinie (merci de nous faire connaître ta culture), à Toutoun pour être toujours là, pour savoir écouter et donner de bons conseils, pour avoir partagé des super moments ensemble aussi bien en France qu'en Espagne, à Astrid pour son soutien inconditionnel, sa bonne humeur et toutes nos heures à refaire « le monde », à Cécile pour tous les bons moments qu'on a partagé ensemble de Nantes en Allemagne en passant par la Bretagne, à Lolo pour son aide, son écoute et ses encouragements à la fin de ma thèse et surtout pour ce souffle d'air frais qu'il a apporté dans notre bureau, à Alexandra pour son soutien et patience avec les espagnoles et à mi Martita, gracias por tu apoyo, por tu ayuda, por todos los buenos momentos que pasamos juntas, por tu alegría de vivir y por traer al laboratorio un poquito de nuestra tierra.

Je ne peux pas oublier mes trois « loulous » du premier étage Bruno, Hansy et Thierry merci d'avoir toujours été à mon écoute et surtout de m'avoir fait passer tant de bons moments...Je pense également aux stagiaires, qui ont contribué activement à ce travail : merci à Thomas, Simon, Katia et Pablo.

Shoukran à mes deux petits fous de microbiologie Nizar et Rodolphe pour ces moments de détente à la cafeteria et leur bonne humeur perpétuelle ;-).

Le plus grand merci à ma famille Nantaise et Brestoïse qui ma soutenue tous les jours de cette aventure, sans lesquelles je n'aurai pas pu arriver jusque-là. MERCI pour les repas en famille, les vacances de folies, les weekends à la mer, les soirées sans fin, les promenades en bateau, les apéros, les barbecues...MERCI de me faire me sentir en famille et chez moi malgré la distance...Merci à Kelvin, Francesca, Inma, Marta, Sergi, Ara, Aurélien, Mathilde, Mario, Lysiane, Juanita, Julieta, Clémence, Glennou, Amelie, Manu, Estelle, Fred..

Gracias a mis amigos Cartageneros por esos buenos momentos que pasamos juntos en nuestra tierra y por vuestro apoyo incondicional..en especial gracias a Sergio, David, Nacho y Jose ;-).

A mis tres soles Adri, Pepa y Mat darles las gracias por estar siempre ahí, en los buenos y los malos momentos..Gracias por vuestro apoyo, vuestros consejos y por tantas y tantas horas de conversaciones para no perder el rumbo de la vida..Gracias por ser como sois..

Y para finalizar un inmenso MERCI a mi familia. Gracias a mis queridas abuelas, tíos, tías, primos y primas, y a mi madrina por estar siempre ahí y alegrarme la vida, gracias por vuestro apoyo. A Vero y a mi hermana por confiar siempre en mí, por apoyarme y estar siempre presentes. Gracias por mostrarme que siempre puedo contar vosotras (vuelvo pronto a vivir a Murcia nenicas, vuelvo pronto ;-)). Y sobre todo GRACIAS a mis padres, por creer en mí y hacer que yo también crea, por ser el mayor apoyo de mi vida, por obligarme a entrar en el Bilingüe de Francés del Ben Arabí ;-) (sin lo cual probablemente no estaría hoy aquí), gracias por darme todo lo que me habéis dado en la vida..Os quiero

Et puis un merci/gracias à tous les autres de Nantes, de Murcia, de Cartagena et de Mexico qui se reconnaîtront.

Avant-propos

Ce travail de thèse a été réalisé en co-tutelle : en France, au sein du Laboratoire Mer Molécules Santé (MMS) de l'Université de Nantes, dirigé par le Professeur Yves-François Pouchus et codirigé par le Professeur Joël Fleurence ; et en Espagne, au sein du Département d'Écologie et d'Hydrologie de l'Université de Murcia, dirigé par le Professeur Miguel Ángel Esteve Selma.

Este trabajo de tesis en cotutela ha sido realizado: en Francia, en el Laboratorio Mer-Moléculas-Santé de la Universidad de Nantes, dirigido por el Profesor Yves-François Pouchus y codirigido por el Profesor Joël Fleurence ; y en España, en el Departamento de Ecología e Hidrología de la Universidad de Murcia, dirigido por el Profesor Miguel Ángel Esteve Selma.

Cette thèse a été financée par une bourse de l'Ambassade de France en Espagne et La Caixa (banque espagnole) d'une durée de deux ans destinée à financer des études supérieures (Master, Doctorat et Post Doctorat). La dernière année de ce doctorat a été financée par le biais d'un contrat d'Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche à l'Université de Nantes.

Esta tesis ha sido financiada con una beca de La Caixa y de la Embajada de Francia en España de una duración de dos años y destinada a financiar estudios superiores en el extranjero (Máster, Doctorado y Post Doctorado). El último año de este doctorado ha sido financiado con un contrato de Profesor Adjunto en la Universidad de Nantes.

Publications

Articles:

2014: "Comparison of the nutritional value of two red macroalgae: the introduced *Grateloupia turuturu* and the native *Palmaria palmata* for the European abalone *Haliotis tuberculata*". Nuria García-Bueno, Vincent Turpin, Bruno Cognie, Justine Dumay, Michelle Morançais, Mireille Amat, Jean-Marie Pédrón, Arnaldo Marín Atucha, Joël Fleurence, Priscilla Decottignies. *Aquaculture*, Soumis le 21 Novembre 2014. (**Chapitre II**).

2014: "Seasonal variation activity of two red seaweeds, the native *Palmaria palmata* and the introduced *Grateloupia turuturu*, against *Haliotis tuberculata*'s pathogen *Vibrio harveyi*". Nuria García-Bueno, Priscilla Decottignies, Vincent Turpin, Justine Dumay, Christine Paillard, Valérie Stiger-Pouvreau, Nelly Kervarec, Yves-François Pouchus, Arnaldo Aitor Marín-Atucha, Joël Fleurence. Accepté pour publication dans *Aquatic Living Resources* vol. 27 - 2014. (**Chapitre III**).

2014: "Seasonal variation in the antivibrio activity of two organic extracts from two red macroalgae: *Palmaria palmata* and *Grateloupia turuturu* against the abalone pathogen *Vibrio harveyi*". Nuria García-Bueno, Priscilla Decottignies, Vincent Turpin, Justine Dumay, Thomas Guerin, Christine Paillard, Valérie Stiger-Pouvreau, Nelly Kervarec, Yves-François Pouchus, Arnaldo Aitor Marín-Atucha, Joël Fleurence. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. Soumis le 21 Octobre 2014. (**Chapitre III**).

2012: "What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture?" Fleurence J., Morançais M., Dumay J., Decottignies P., Turpin V., Munier M., Garcia-Bueno N., & Jaouen P. (2012). *Trends in Food Science and Technology*, 27, 57-61. (**Annexe 1**)

Congrès Internationaux:

2014, Communication orale: "INHIBITION OF *Haliotis tuberculata* PATHOGEN, *Vibrio harveyi*, FROM EXTRACTS OF RED MACROALGAE *Grateloupia turuturu*". Nuria García-Bueno*, Priscilla Decottignies, Vincent Turpin, Justine Dumay, Christine Paillard, Arnaldo Aitor Marín-Atucha, Joël Fleurence. **AQUA 2014**, 14-17 Octobre 2014 à Donostia-San Sébastian, Espagne. (**Annexe 2**)

Proceedings : <https://www.was.org/easOnline/AbstractDetail.aspx?i=3298>

2012, Communication orale: "SUITABILITY OF TWO RED MACROALGAE *Grateloupia turuturu* AND *Palmaria palmata* FOR THE CULTURE OF THE EUROPEAN ABALONE *Haliotis tuberculata*". Nuria García-Bueno*, Priscilla Decottignies, Vincent Turpin, Justine Dumay, Marion Cardinaud, Christine Paillard, Valérie Stiger-Pouvreau, Arnaldo Aitor Marín-Atucha, Joël Fleurence. **AQUA 2012**, 1-5 Septembre 2012 à Prague, République Tchèque. (**Annexe 3**)

Proceedings : <https://www.was.org/meetingabstracts/ShowAbstract.aspx?Id=26528>



Sommaire

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES.....	i
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	ix
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I : Étude bibliographique.....	15
1. Présentation des ormeaux.....	15
1.1. Éléments de classification.....	15
1.2. Répartition géographique.....	18
1.3. Habitat d' <i>Haliotis tuberculata</i>	19
1.4. Morpho-anatomie.....	19
1.5. Reproduction et développement.....	24
1.6. Alimentation.....	27
1.7. Mortalité.....	29
1.8. Pathologies.....	30
1.9. Exploitation des ormeaux.....	32
2. Présentation des Rhodophyta.....	38
2.1. Éléments de classification.....	38
2.2. Organisation cellulaire.....	39
2.3. Valeur nutritive.....	40
2.4. Valorisation des Rhodophyta.....	42
2.5. Les modèles d'étude.....	43
3. Présentation de la famille des Vibrionaceae.....	56
3.1. Historique sur les vibrions.....	56

3.2. Écologie du genre <i>Vibrio</i>	59
3.3. Le modèle d'étude <i>Vibrio harveyi</i>	60
3.4. La vibriose chez <i>Haliotis tuberculata</i>	62

CHAPITRE II : Étude comparative de l'intérêt nutritionnel de deux macroalgues rouges, *Grateloupia turuturu* et *Palmaria palmata* pour la croissance de l'ormeau européen, *Haliotis tuberculata tuberculata*..... 68

1. Contexte de l'étude.....	68
2. Comparison of the nutritional value of two red macroalgae, the introduced <i>Grateloupia turuturu</i> and the native <i>Palmaria palmata</i> , for the European abalone <i>Haliotis tuberculata</i>	72
2.1. Abstract	72
2.2. Introduction.....	73
2.3. Materials and methods.....	75
2.4. Results	77
2.5. Discussion	81
2.6. Acknowledgements.....	84
3. Conclusion.....	87

CHAPITRE III : Étude de l'effet de différents extraits de *Grateloupia turuturu* et *Palmaria palmata* sur la croissance de la bactérie *Vibrio harveyi*, pathogène de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata tuberculata*..... 92

1. Contexte de l'étude.....	92
2. Seasonal antibacterial activity of two red seaweeds, <i>Palmaria palmata</i> and <i>Grateloupia turuturu</i> , on European abalone pathogen <i>Vibrio harveyi</i>	96
2.1. Abstract	96
2.2. Introduction.....	97
2.3. Materials and methods.....	98

2.4. Results	101
2.5. Discussion	110
2.6. Acknowledgments.....	112
3. Seasonal variation in the antivibrio activity of two organic extracts from two red seaweed: <i>Palmaria palmata</i> and the introduced <i>Grateloupia turuturu</i> against the abalone pathogen <i>Vibrio harveyi</i>	114
3.1. Abstract	114
3.2. Introduction.....	115
3.3. Materials and methods.....	117
3.4. Results	121
3.5. Discussion	129
3.6. Acknowledgments.....	131
4. Conclusion.....	132
CHAPITRE IV : Test d'infection par balnéation de deux sous-espèces d'ormeaux européens, <i>Haliotis tuberculata tuberculata</i> et <i>Haliotis tuberculata lamellosa</i> , par la souche pathogène ORM4 de <i>Vibrio harveyi</i>	138
1. Contexte de l'étude.....	138
2. Effet d'un extrait hydrosoluble de <i>Grateloupia turuturu</i> sur l'infection par balnéation de l'ormeau européen <i>Haliotis tuberculata tuberculata</i> avec la souche pathogène ORM4 de <i>Vibrio harveyi</i>	143
2.1. Introduction.....	143
2.2. Matériel et méthodes	144
2.3. Résultats	148
2.4. Discussion	152
3. La sous-espèce d'ormeaux européens <i>Haliotis tuberculata lamellosa</i> est-elle sensible à la souche pathogène ORM4 de <i>Vibrio harveyi</i> ?	155
3.1. Introduction.....	155

3.2. Matériel et méthodes	157
3.3. Résultats	160
3.4. Discussion	162
4. Conclusion.....	164
CONCLUSION GENERALE.....	171
<i>CONCLUSIÓN GENERAL.....</i>	<i>174</i>
BIBLIOGRAPHIE	182
ANNEXES.....	215

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Évolution de la production internationale d'ormeaux (toutes espèces confondues) entre 1990 et 2012 (FAO 2014).....	3
Figure 2. Fossile d' <i>Haliotis tuberculata</i> de la ville de Ceutí. Source : Association culturelle de paléontologique de Murcie (Espagne).	16
Figure 3. Coquilles des trois sous-espèces d'ormeau européen <i>Haliotis tuberculata</i> . D'après http://www.idscaro.net	17
Figure 4. Répartition mondiale de la famille des <i>Haliotidae</i>	18
Figure 5. Vue ventrale d' <i>Haliotis tuberculata</i> . D'après Travers (2008).....	20
Figure 6. Vue dorsale d' <i>Haliotis tuberculata</i> sans sa coquille. Observation des branchies. D'après http://www.marinebio.net	21
Figure 7. Anatomie du système digestif de l'ormeau.	22
Figure 8. Vues dorsales de la zone fonctionnelle de la radula d' <i>Haliotis tuberculata tuberculata</i> provenant de la côte Atlantique ouest française. 7.1 Vue générale. 7.2 Détail. M (dents marginales), L (dents latérales) et Md (dents médianes).	23
Figure 9. Coloration de la gonade chez les femelles (grise - F) et chez les mâles (beige - M).	24
Figure 10. Développement des ormeaux (Cardinaud, 2013). Étape 1 : passage de la phase embryonnaire à la phase larvaire ; Étape 2 : transformation de la larve trochophore en larve véligère ; Étape 3 : passage de la phase planctonique à la phase benthique par fixation de la larve véligère ; Étape 4 : fin de la phase larvaire et passage au stade juvénile.....	26
Figure 11. Surface interne de la coquille d'un ormeau sévèrement infecté par un polychète. D'après Travers (2008).	30

Figure 12, Vacuole intracytoplasmique (v) contenant de nombreuses bactéries de <i>Xenohaliotis californiensis</i> dans l'épithélium intestinal de l'ormeau <i>Haliotis rubra</i> . D'après B. Cholet (IFREMER-2013).	32
Figure 13. Production mondiale d'ormeaux entre 1970-2011 (Fishtech, 2012).	34
Figure 14. Pêche légale (en bleu) et illégale (en vert) d'ormeaux par pays en 2010 (Fishtech, 2012).	35
Figure 15. Production aquacole d'ormeaux par pays en 2010 (Gordon et Cook, 2013).	36
Figure 16. Schéma de la structure du phycobilisome. D'après Munier (2013).	40
Figure 17. Composition moyenne des algues (% de matière sèche).	42
Figure 18. <i>Grateloupia turuturu</i> (Yamada 1941) parmi d'autres macroalgues dans le milieu naturel.	44
Figure 19. Pays de distribution naturelle (en bleu) et de prolifération ou d'invasion (en rouge) de <i>Grateloupia turuturu</i>	45
Figure 20. <i>Grateloupia turuturu</i> (Yamada 1941) dans le milieu naturel.	46
Figure 21. Cycle de reproduction de <i>Grateloupia turuturu</i> . D'après Simon-Colin (2001).	47
Figure 22. <i>Palmaria palmata</i> (Linné 1981) dans le milieu naturel.	50
Figure 23. Pays de distribution de <i>Palmaria palmata</i> (en bleu).	51
Figure 24. <i>Palmaria palmata</i> (Linné 1981) parmi d'autres macroalgues dans le milieu naturel.	52
Figure 25. Cycle de reproduction de <i>Palmaria palmata</i> . D'après Van der Meer et Todd, (1980) et Magne, (1987). CA= carpogone, CMOR= cellule mère de l'organe reproducteur, Cp= celphyte femelle plus observable, GF= gamétophyte femelle, GM= gamétophyte male, RC= réduction chromatique, RTR= reste du trichogyne, T= tétraspores, TPT= thalle produisant des tétraspores, Tr= trichogyne et TS= tétrasporocyste.	54

Figure 26. Vue interne d'une palourde atteinte par la maladie de l'anneau brun. D'après http://sfbtm.univ-littoral.fr .	58
Figure 27. <i>Vibrio harveyi</i> souche ORM4 en microscopie électronique à transmission. D'après Travers (2008).	60
Figure 28. Maladie lumineuse chez la crevette géante tigrée <i>Penaeus monodon</i> causée par <i>V. harveyi</i> . D'après Defoirdt (2007).	61
Figure 29. Observations microscopiques de tissus d'ormeaux moribonds, infectés par la souche ORM4-GFP de <i>V. harveyi</i> (Travers et al., 2008).	63
Figure 30. Abalone weight/length relationship depending on the type of feed.	80
Figure 31. Monthly mean water-soluble protein (a) and water-soluble carbohydrate (b) contents (\pm standard deviation n=3) in <i>Grateloupia turuturu</i> and <i>Palmaria palmata</i> extracts. *: indicates a significant difference (p-value<0.05) between the two seaweeds obtained with the Holm-Sidak procedure after a two-way ANOVA.	102
Figure 32. Growth of <i>Vibrio harveyi</i> ORM4 strain at three different temperatures (16, 20 and 28 °C).	103
Figure 33. Growth rate (a), EPSV rate (b) and delay rate (c) of <i>Vibrio harveyi</i> strain ORM4 at 20 °C induced by <i>Grateloupia turuturu</i> and <i>Palmaria palmata</i> water-soluble extracts at 10 μ L-1. Data are expressed as mean \pm SD (n=6). *: indicates a significant difference (p-value<0.05) between the two seaweeds obtained with the Holm-Sidak procedure after a two-way ANOVA.	106
Figure 34. Monthly <i>Grateloupia turuturu</i> (a) and <i>Palmaria palmata</i> (b) water-soluble extracts analyzed using ¹ H NMR. Letters F, I, M and D ₂ O refer to the resonances of floridoside (α -D-galacto-pyranosyl-(1-2)-glycerol), isethionic acid (2-hydroxyethane sulfonic acid (2-hydroxyethane sulfonic acid), N-methyl-L-methionine sulfoxide (4-methane sulfinyl-2-methylamino butyric acid) and deuterium oxide, respectively.	109

Figure 35. Percentages of growth rate of <i>Vibrio harveyi</i> strain ORM4 at 20 °C induced by PE and WPE of <i>Grateloupia turuturu</i> (a) and <i>Palmaria palmata</i> (b).....	123
Figure 36. Percentages of EPSV rate of <i>Vibrio harveyi</i> strain ORM4 at 20 °C induced by PE and WPE of <i>Grateloupia turuturu</i> (a) and <i>Palmaria palmata</i> (b).....	124
Figure 37. Percentages of delay rate of <i>Vibrio harveyi</i> strain ORM4 at 20 °C induced by PE and WPE of <i>Grateloupia turuturu</i> (a) and <i>Palmaria palmata</i> (b).....	126
Figure 38. PE and WPE inhibitor, activator and neutral extracts of <i>Grateloupia turuturu</i> analyzed using ¹ H NMR.....	127
Figure 39. PE and WPE inhibitor, activator and neutral extracts of <i>Palmaria palmata</i> analyzed using ¹ H NMR.....	128
Figure 40. Extraction de l'hémolymphe du sinus céphalique d'un ormeau moribond.	147
Figure 41. Colonies bactériennes développées après étalement de l'hémolymphe extraite du sinus d'un ormeau moribond.	147
Figure 42. Pourcentage de mortalité des ormeaux après cinq jours d'expérience. Les moyennes sont présentées avec leur écart-type.....	149
Figure 43. Suivi de la mortalité des ormeaux de la sous-espèce <i>Haliotis tuberculata tuberculata</i> à partir de la balnéation pendant 24 h (J0) avec <i>V. harveyi</i> . Les moyennes sont présentées avec leur écart-type, * = différence significative.	150
Figure 44. Ormeau moribond présentant des pustules blanches (P) caractéristiques de l'infection par <i>V. harveyi</i>	150
Figure 45. Quantité de <i>Vibrio</i> totaux présente dans l'eau à J2 et J3, exprimée en log10 de la concentration, en présence ou non de l'extrait hydrosoluble de <i>Grateloupia turuturu</i> . Les moyennes sont présentées avec leur écart-type, * = différence significative.....	151

Figure 46. Quantité de <i>Vibrio harveyi</i> présente dans l'eau à J2 et J3, exprimée en log10 de la concentration, en présence ou non de l'extrait hydrosoluble de <i>Grateloupia turuturu</i> . Les moyennes sont présentées avec leur écart-type, * = différence significative.....	152
Figure 47. Schéma du déroulement de l'expérience.....	159
Figure 48. Extraction de l'hémolymphe du sinus céphalique d'un ormeau moribond.	160
Figure 49. Colonies bactériennes développées après étalement de l'hémolymphe extraite du sinus d'un ormeau moribond.	160
Figure 50. Suivi de la mortalité des ormeaux de la sous-espèce <i>Haliotis tuberculata tuberculata</i> à partir de la balnéation pendant 24 h (J0) avec <i>V. harveyi</i> . Les moyennes sont présentées avec leur écart-type.	161
Figure 51. Ormeau moribond présentant des pustules blanches (P) caractéristiques de l'infection par <i>V. harveyi</i>	162

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Composition en acides aminées de certaines macroalgues. D'après Fleurence (1999).....	41
Tableau 2. Composition biochimique de <i>Grateloupia turuturu</i> et exigences alimentaires de l'ormeau européen <i>Haliotis tuberculata</i> (MS : matière sèche).....	48
Tableau 3. Exemple de composition biochimique de <i>Palmaria palmata</i> (MS : matière sèche).	56
Tableau 4. Biochemical composition of the two macroalgae provided to abalones throughout experiment. Data are expressed as mean \pm SD (n=12). <i>p</i> -value obtained after a t-test. dw: dry weight; ns: not significant.....	78
Tableau 5. Biometrics of the European abalone (<i>H. tuberculata</i>) fed with the three macroalgae diets for 5 months. Data are expressed as mean \pm SD (n=3 for biomass and n=90 for length and weight). Statistical results were analyzed after a one-way ANOVA followed by an Holm-Sidak test. Values in the same row with different letters are significantly different (<i>p</i> < 0.05).....	79
Tableau 6. Growth and survival of juvenile European abalone (<i>H. tuberculata</i>) fed with the three macroalgae diets for 5 months. Data are expressed as mean \pm SD (n=3). Statistical results were analyzed after a one-way ANOVA followed by a Holm-Sidak test. Values in the same row with different letters are significantly different (<i>p</i> < 0.05). SGR: shell growth rate; Δ L: length difference.	80
Tableau 7. Biochemical composition of abalone fed with three different diets throughout experiment. Data are expressed as mean \pm SD (n=3). <i>p</i> -value obtained after a t-test (ns: not significant). Statistical results were analyzed after a one-way ANOVA followed by a Holm-Sidak test. Values in the same row with different letters are significantly different (<i>p</i> < 0.05). dw: dry weight.	81

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

1D ¹H NMR : One-Dimensional Proton Nuclear Magnetic Resonance

AbHV-1 : *Haliotid herpesvirus 1*

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

CE : Crude Extract

DO : Densité Optique

EMFS : Eau de Mer Filtrée et Stérile

EPA : Acide EicosaPentaénoïque

FAO : Food and Agriculture Organization

GFP : Green Fluorescent Protein

GIPBE : Groupement d'Intérêt Public de la Bretagne

ITS1 : Internal Transcribed Spacer 1

ITS2 : Internal Transcribed Spacer 2

IUEM : Institut Universitaire Européen de la Mer

LBS : Luria Bertani Salt

LB : Luria Bertani

LEMAR : Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin

OD : Optical Density

PE : Polar extract

PSP : Paralytic Shellfish Poisoning

QPCR : Réaction en Chaîne par Polymérase Quantitative

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SD : Standard Deviation

SGR : Shell Growth Rate

SMEL : Syndicat Mixte pour l'Équipement du Littoral

SMIDAP : Syndicat Mixte pour le Développement de l'Aquaculture et de la Pêche en

Pays de la Loire

UBO : Université de Bretagne Occidentale

UFC : Unité Formant Colonie

WPE: Wilde Polar Extract

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Les océans et les mers, qui représentent plus de 72% de la surface de la Terre, sont indispensables pour l'humanité. Ils constituent une source d'organismes, de matières premières, ainsi qu'une source importante d'énergie. Actuellement, plus de 50% de la population mondiale vit le long des côtes. Il est estimé que ce chiffre augmentera jusqu'à 75% en 2025 (World Ocean Network, 2014). Les zones côtières sont parmi les écosystèmes les plus productifs et biologiquement diversifiés sur la planète. Tous les êtres humains dépendent de la mer pour son rôle dans l'équilibre environnemental, économique et social de tous les pays du monde.

Aujourd'hui, la communauté mondiale doit faire face à une multitude de défis interdépendants, qui vont des impacts de la crise financière et économique actuelle à une vulnérabilité accrue face au changement climatique. Elle doit en parallèle concilier la nécessité de répondre aux besoins alimentaires et nutritionnels urgents d'une population en expansion avec le caractère limité des ressources naturelles. La pêche et l'aquaculture contribuent de façon déterminante au bien-être et à la prospérité des êtres humains. Si les pêches de capture demeurent stables, la production de l'aquaculture ne cesse d'augmenter (FAO 2014). Parmi tous les secteurs qui produisent des aliments d'origine animale, l'aquaculture devrait continuer d'afficher une des croissances les plus rapides et, au cours des dix prochaines années, la production totale issue des pêches de capture et de l'aquaculture dépassera celle du bœuf, du porc ou des volailles. Selon les dernières statistiques disponibles recueillies à l'échelle mondiale par la FAO, la production mondiale de l'aquaculture a atteint un nouveau niveau record de 90,4 millions de tonnes en 2012 (soit 144,4 milliards de dollars US), comprenant 23,8 millions de tonnes d'algues (soit 6,4 milliards de dollars US). Selon les dernières informations, la FAO estime que la production alimentaire mondiale aquacole a augmenté de 5,8% pour atteindre 70,5 millions de tonnes

en 2013. En 2013, la Chine a produit à elle seule 43,5 millions de tonnes de poisson de consommation et 13,5 millions de tonnes d'algues (FAO 2014).

En France, l'aquaculture est une activité ancienne bien établie pour ce qui concerne les secteurs traditionnels d'élevage des mollusques (huîtres et moules principalement). Elle s'est développée depuis l'Antiquité sur les façades Méditerranéenne et Atlantique (FAO 2007). La production aquacole française occupe, en volume, la seconde place au sein de l'Union Européenne, après l'Espagne. Bien qu'en baisse, elle était en 2012 d'environ 200000 tonnes de coquillages, poissons, algues et caviar, générant un chiffre d'affaires global d'un peu moins de 700 millions d'euros (FAO 2014). La conchyliculture, premier secteur de production aquacole français, voit sa croissance diminuer depuis plusieurs années en raison d'épisodes d'épizooties affectant la principale espèce produite, l'huître creuse *Crassostrea gigas*. À l'instar de sa situation à l'échelle nationale où la filière ostréicole réalise plus de 80% du chiffre d'affaire de la conchyliculture, l'élevage de mollusques en Pays de la Loire est largement dominé par la production d'huîtres, avec environ 13000 tonnes produites par an grâce à 259 entreprises (ETP - Agreste 2012, FAO 2014). Cette production ostréicole régionale représente environ 10% de la production nationale, malgré une diminution des performances des élevages d'huîtres observée depuis les années 80. Avec plus de 90% du tonnage pour l'huître creuse *Crassostrea gigas*, la filière ostréicole est dans une situation de culture quasi monospécifique, qui rend les entreprises particulièrement vulnérables aux pathogènes qui pourraient décimer l'espèce comme ce fut le cas par le passé pour l'huître plate *Ostrea edulis* puis l'huître portugaise *Crassostrea angulata*. Ainsi, les épisodes de mortalités massives qui ont touché jusqu'à 100% des juvéniles des cheptels ostréicoles ces dernières années mettent en péril tout un pan de l'économie, non seulement régional mais aussi national, en affectant rapidement la pérennité des entreprises. Ceci est accentué par l'inquiétude du consommateur vis-à-vis de la sécurité alimentaire.

L'ormeau, dont la pêche de loisir et commerciale de l'espèce européenne *Haliotis tuberculata* est strictement réglementée en France en raison de la fragilité des populations sauvages

(Huchette et Clavier 2004), apparaît comme un candidat potentiel pour la diversification des élevages conchylicoles. La saveur de sa chair et l'originalité de sa coquille nacrée délicatement perforée font de ce mollusque un mets raffiné à haute valeur commerciale (entre 50 et 85 € le kg chez France Haliotis), prisé internationalement, particulièrement par les restaurateurs européens et les populations asiatiques. L'halioticulture s'est remarquablement développée depuis 25 ans à travers le monde (Figure 1), faisant face à la diminution des stocks sauvages surexploités (Gordon et Cook 2001). L'effort de recherche déployé a ainsi permis à certains pays comme l'Australie ou la Chine de maîtriser les différentes étapes de sa culture et d'en faire une activité économique rentable. Elle a atteint une production de 100352 tonnes et 785799 millions de dollars US en 2012 (FAO 2014). En France, après des essais en mer menés par Ifremer à la fin des années 1970 et au début des années 1980, l'élevage de l'ormeau avait été abandonné pour des arguments de rentabilité. Il a été relancé par le SMEL (Syndicat Mixte de l'Équipement du Littoral) en Manche dix ans plus tard, permettant à la France de commencer à combler son retard.

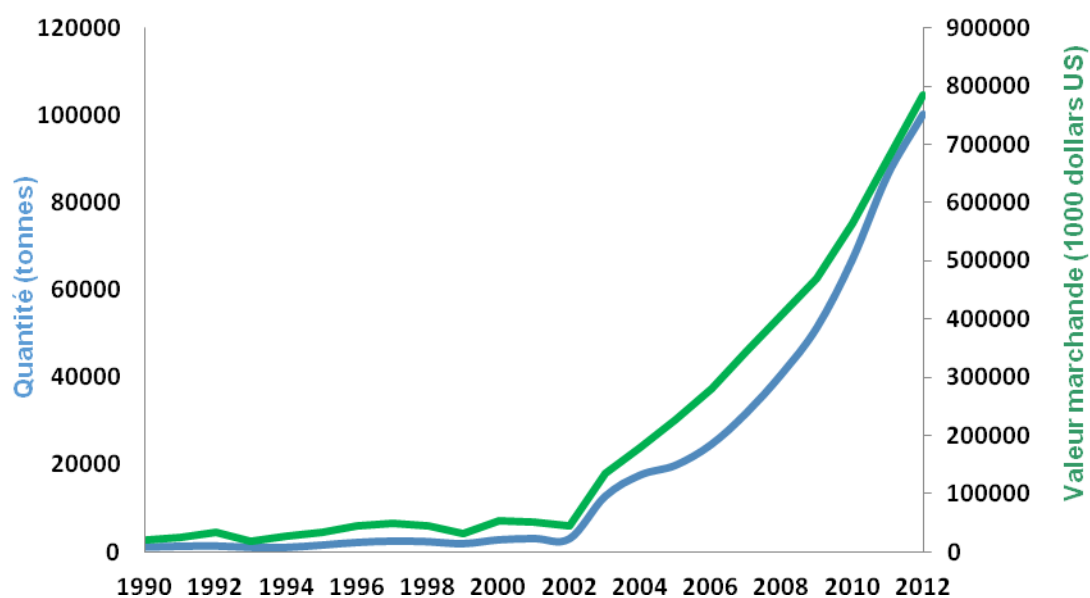


Figure 1. Évolution de la production internationale d'ormeaux (toutes espèces confondues) entre 1990 et 2012 (FAO 2014).

Aujourd'hui, l'halioticulture française ne représente qu'un volume de production anecdotique de 10 tonnes et 193000 dollars US en 2012 (FAO 2014). Les principaux freins à la production et la réussite économique de l'élevage de ces mollusques gastéropodes sont leur croissance lente et les maladies. Ces dernières sont influencées par de nombreux facteurs liés au système d'élevage (qualité de l'eau, structures d'élevage, densité, alimentation... - Basuyaux 1997; Huchette *et al.* 2003). Parmi ces facteurs, l'alimentation revêt une importance toute particulière en constituant une dépense majeure des entreprises et en limitant leur nombre. En effet, l'ormeau est un herbivore brouteur de macroalgues qui montre une préférence alimentaire pour les algues rouges (Mercer *et al.* 1993). La récolte de ces algues est coûteuse en main d'œuvre et, en région Pays de la Loire, quantitativement limitée, particulièrement pour *Palmaria palmata* qui permet une croissance supérieure à celles obtenues chez l'ormeau européen avec d'autres macroalgues ou aliments artificiels (Mercer *et al.* 1993; Mai *et al.* 1995a; Basuyaux 1997).

Cependant, des travaux réalisés au sein de l'équipe Mer Molécules Santé (Denis 2009), sur *Grateloupia turuturu*, une macroalgue rouge proliférante en pleine expansion sur les côtes de la Bretagne et des Pays de la Loire, ouvrent de nouvelles perspectives de développement de l'halioticulture. Cette macroalgue présente une composition biochimique plus stable au fil des saisons que *Palmaria palmata* (Galland-Irmouli *et al.* 1999; Denis 2009). Sa richesse en protéines et son faible contenu en lipides (respectivement 23 et 2,6% en poids sec), comparables à ceux de *Palmaria palmata*, correspondent aux exigences alimentaires de l'ormeau européen qui se situent en dessous de 5% de lipides (Mai *et al.* 1995a), entre 24 et 34,5% de protéines (Mai *et al.* 1995b) combinés à un taux élevé en carbohydrates de 40 à 60% (Fleming *et al.* 1996; Thongrod *et al.* 2003). *Grateloupia turuturu* est d'autant plus intéressante que son caractère proliférant (GIPBE-OBPNB 2011) lui confère la particularité d'être disponible en biomasse importante naturellement et localement, favorisant un développement durable des activités d'élevage. De plus, *Grateloupia turuturu* présente une

activité antibactérienne (Pang *et al.* 2006) qui pourrait être intéressante lors de possibles infestations par le *Vibrio harveyi*, pathogène spécifique de l'orveau.

Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse a été de faciliter le développement de la filière halioticole en Pays de la Loire, celle-ci pouvant permettre la diversification des activités conchylicoles. Une attention particulière a été portée à la problématique concernant l'alimentation et la maladie dans les systèmes d'élevages de l'orveau européen *Haliotis tuberculata*.

Le **Chapitre I** du mémoire est consacré à une synthèse bibliographique centrée sur l'orveau européen *Haliotis tuberculata*. Les algues rouges constituant l'alimentation principale de celui-ci, un état des lieux des connaissances sur ces organismes et plus particulièrement sur *Palmaria palmata* et *Grateloupia turuturu* a été dressé, l'espèce *Palmaria palmata* correspondant à l'aliment de référence et *Grateloupia turuturu* à une espèce à valoriser. L'aspect pathogénicité est également développé dans cette partie avec un focus particulier sur la bactérie pathogène de l'orveau, *Vibrio harveyi*.

Le **Chapitre II** présente l'étude de l'intérêt nutritionnel des macroalgues rouges *Grateloupia turuturu* et *Palmaria palmata* pour la croissance de l'orveau européen, *Haliotis tuberculata*. Trois régimes alimentaires ont été testés pour comparer la croissance et la composition biochimique d'orveaux nourris *ad libitum* avec *Grateloupia turuturu* à celle obtenue avec *Palmaria palmata*. Ce travail a fait l'objet d'un article scientifique soumis pour publication dans la revue *Aquaculture*.

Dans le **Chapitre III**, ont été évalués *in vitro* les effets d'extraits solubles, polaires et apolaires des deux espèces de macroalgues rouges, *Grateloupia turuturu* et *Palmaria palmata*, sur la croissance de la bactérie pathogène *Vibrio harveyi*. Cette étude a été valorisée par deux articles : le premier, concernant les extraits hydrosolubles, a fait l'objet d'un article scientifique accepté pour publication dans le journal *Aquatic Living Resources* et

le second, concernant les extraits polaires et apolaires, a fait l'objet d'un article scientifique soumis pour publication dans le *Journal of Aquatic Food Product Technology*.

Dans le **Chapitre IV**, des études d'infection par baignade de deux sous-espèces d'ormeaux européens, *Haliotis tuberculata tuberculata* de l'Atlantique Nord et *Haliotis tuberculata lamellosa* de la Méditerranée, par la souche pathogène *Vibrio harveyi* ORM4 ont été évaluées. Pour cela, des infections expérimentales ont été effectuées sur des ormeaux soumis à différentes températures. Cette partie du manuscrit est préliminaire. Après des expérimentations complémentaires, elle fera également l'objet de deux articles.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los océanos y mares, que representan más del 72% de la superficie de la Tierra, son indispensables para la humanidad ya que constituyen una importante fuente de organismos, materias primas y energía. Actualmente, más del 50% de la población mundial vive en zonas costeras y se estima que esta cifra aumentará hasta el 75% en 2025 (World Ocean Network, 2014). Las zonas costeras se sitúan además entre los ecosistemas más productivos y con más diversidad biológica del planeta. Debido a esto y al papel que desempeñan en el equilibrio ambiental, económico y social de todos los países del mundo, los seres humanos dependen enormemente de los mares y océanos.

Hoy en día, la comunidad mundial debe hacer frente a una multitud de desafíos interdependientes entre sí, que van desde los impactos de la crisis financiera y económica actual al incremento de la vulnerabilidad frente al cambio climático. Así mismo, debe responder a las necesidades alimentarias y nutricionales urgentes de una población en expansión con unos recursos naturales disponibles limitados. La pesca y la acuicultura, por su parte, contribuyen de una manera determinante al bienestar y a la prosperidad de las comunidades y aunque las extracciones pesqueras se mantienen estables, la producción

acuícola no cesa de aumentar (FAO 2014). De entre todos los sectores productores de alimentos de origen animal, la acuicultura posee uno de crecimientos más rápidos y, en el periodo de los próximos diez años, la producción total englobando la pesca y la acuicultura, será superior a aquella de la industria vacuna, porcina o de aves de corral. Según las últimas estadísticas mundiales facilitadas por la FAO, la producción mundial de la acuicultura ha alcanzado un nivel record de 90,4 millones de toneladas en 2012 (es decir, 144,4 millones de dólares US), de las cuales 23,8 millones de toneladas de algas (es decir, 6,4 millones de dólares US). Además, la FAO estima que la producción alimentaria mundial procedente de la acuicultura ha aumentado un 5,8% para alcanzar los 70,5 millones de toneladas en 2013. En este año, solo China produjo 43,5 millones de toneladas de pescado para consumo humano y 13,5 millones de toneladas de algas (FAO 2014).

En Francia, la acuicultura es una actividad bien establecida en lo que concierne a los sectores más tradicionales de cría de moluscos (ostras y mejillones principalmente). Esta actividad se desarrolla desde la antigüedad tanto en la costa mediterránea como atlántica (FAO 2007). La producción acuícola francesa ocupa, en volumen, la segunda posición en la Unión Europea, después de España. En 2012 contaba con una cifra de aproximadamente 200000 toneladas de moluscos, pescado, algas y caviar, generando unos beneficios globales de poco menos de 700 millones de euros (FAO 2014). La conchicultura, primer sector de producción acuícola francés, ha visto mermado su crecimiento desde hace varios años debido a los frecuentes episodios de epizootias que han afectado sobre todo a la principal especie producida, la ostra rizada Crassostrea gigas. Al igual que su situación a escala nacional, en la que el sector ostrícola engloba más del 80% de la conchicultura, la cría de moluscos en la región francesa de Países del Loira está fuertemente dominada por la producción de ostras, con aproximadamente 13000 toneladas producidas al año por 259 empresas (ETP - Agreste 2012, (FAO 2014). Esta producción ostrícola regional representa alrededor del 10% de la producción nacional, a pesar de una disminución del rendimiento de los criaderos desde los años 80. Consistiendo más del 90% del tonelaje producido en ostra

rizada Crassostrea gigas, podemos decir que el sector ostrícola desarrolla un tipo de producción prácticamente monoespecífica, la cual vuelve las empresas particularmente vulnerables frente a los patógenos, que pueden diezmar la especie tal y como ya ocurrió en el pasado con la ostra plana Ostrea edulis o la ostra portuguesa Crassostrea angulata. De este modo, los episodios de mortandad masiva que han afectado hasta el 100% de los juveniles en instalaciones ostrícolas en los últimos años ponen en riesgo una buena parte de la economía, tanto regional como nacional, afectando en gran medida la perdurabilidad de las empresas. Este hecho se encuentra además acentuado por la preocupación de los consumidores ante cuestiones de seguridad alimentaria.

La oreja de mar, cuya pesca de recreo y comercial de la especie europea Haliotis tuberculata está estrictamente reglamentada en Francia debido a la fragilidad de las poblaciones salvajes (Huchette et Clavier 2004), resulta ser una especie potencial para la diversificación de la acuicultura de moluscos. El sabor de su carne y la originalidad de su concha nacarada delicadamente perforada hacen de este molusco un manjar refinado y de alto valor comercial (entre 50 y 85 € el Kg en France Haliotis), muy apreciado internacionalmente, particularmente por los restaurantes europeos y las poblaciones asiáticas. La cría de la oreja de mar se desarrolla desde hace 25 años por todo el mundo (Figura 1), haciendo frente a la disminución de los stocks salvajes sobreexplotados (Gordon et Cook 2001). Todo el esfuerzo invertido en la investigación sobre esta especie ha permitido, a ciertos países como Australia o China, dominar las diferentes etapas de su producción y desarrollar una actividad productiva económicamente rentable. Esta actividad ha llegado a alcanzar cifras de 100352 toneladas y 785799 millones de dólares US en 2012 (FAO 2014). En Francia, tras diferentes ensayos en mar llevados a cabo por el Ifremer a finales de los 70 y principios de los 80, la producción de oreja de mar fue abandonada por razones de rentabilidad. Diez años más tarde sería retomada por el SMEL (en español, Sindicato Mixto para el Equipamiento del Litoral) en el departamento de la Mancha, permitiendo a Francia subsanar este retraso.

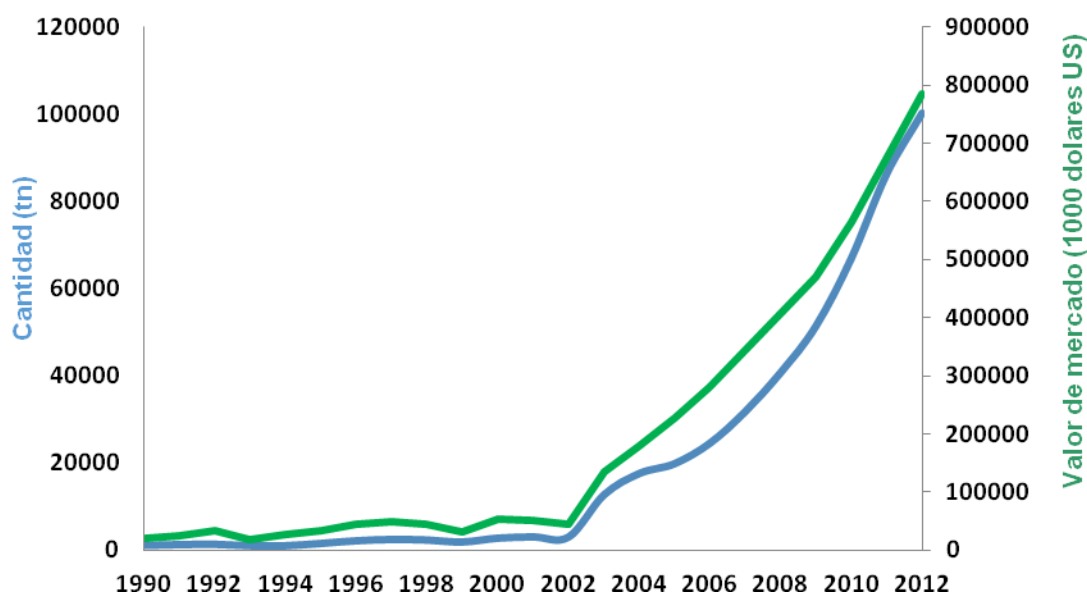


Figura 1. Evolución de la producción internacional de oreja de mar (todas las especies) entre 1990 y 2012 (FAO 2014).

Actualmente, la cría de oreja de mar en Francia representa solo un volumen de producción anecdótico de 10 toneladas y 193000 dólares US en 2012 (FAO 2014). Los principales obstáculos al éxito productivo y económico de la cría de estos moluscos gasterópodos son su crecimiento lento y las enfermedades, cuyas apariciones están influenciadas por numerosos factores ligados a los sistemas de producción (calidad del agua, instalaciones productivas, densidad, alimentación, etc... Basuyaux 1997; Huchette et al. 2003). Entre estos factores, la alimentación representa una importancia particular, ya que constituye un gasto económico significativo, limitando así el número de empresas que pueden hacerle frente. La oreja de mar es un herbívoro que se alimenta de las macroalgas que ramonea del fondo y que muestra una preferencia alimentaria por las algas rojas (Mercer et al. 1993). La recolección de estas algas es costosa en mano de obra y, en la región de Países del Loira, cuantitativamente limitada por la presencia de Palmaria palmata, la cual permite un crecimiento de la oreja de mar europea superior al obtenido con otras macroalgas o alimentos artificiales (Mercer et al. 1993; Mai et al. 1995a; Basuyaux 1997).

No obstante, las investigaciones realizadas en el seno del equipo Mer Molécules Santé (Denis 2009) sobre Grateloupia turuturu, una macroalga roja proliferante en plena expansión en las costas de la Bretaña francesa y los Países del Loira, abren nuevas perspectivas de desarrollo para la acuicultura de Haliotis. Esta macroalga presenta una composición bioquímica más estable a lo largo de las diferentes estaciones del año que Palmaria palmata (Galland-Irmouli et al. 1999; Denis 2009). Su riqueza proteica y su bajo contenido en lípidos (23% y 2,6% en peso seco, respectivamente), comparables a los de Palmaria palmata, corresponden a las exigencias nutricionales de la oreja de mar europea, que se sitúan por debajo de un 5% en lípidos (Mai et al. 1995a), entre un 24% y un 34,5% en proteínas (Mai et al. 1995b) y entre un 40% y un 60% en carbohidratos (Fleming et al. 1996; Thongrod et al. 2003). Grateloupia turuturu es aún más interesante por su carácter proliferante (GIPBE-OBPNB 2011), lo que pone a disposición grandes biomasas naturales y locales de esta alga, favoreciendo al mismo tiempo un desarrollo sostenible de las actividades productivas. Además, Grateloupia turuturu presenta una actividad antibacteriana (Pang et al. 2006) que podría ser interesante de cara a posibles infecciones por el Vibrio harveyi, patógeno específico de la oreja de mar.

En este contexto, el objetivo principal de la presente tesis ha sido el de facilitar el desarrollo del sector productivo de oreja de mar en la región de Países del Loira pudiendo permitir la diversificación de la conchicultura. Durante esta investigación, se ha prestado especial atención a la problemática que comportan la alimentación y las enfermedades durante el proceso de cría de la oreja de mar europea Haliotis tuberculata.

El **Capítulo I** de esta memoria ha sido destinado principalmente a una síntesis bibliográfica centrada en la oreja de mar europea Haliotis tuberculata. Siendo las algas rojas el principal alimento de esta especie, se ha llevado a cabo un estudio sobre estos organismos, particularmente sobre Palmaria palmata y Grateloupia turuturu, constituyendo la primera el alimento de referencia para la oreja de mar, y la segunda una especie a valorizar. El aspecto

de la patogenicidad ha sido igualmente abordado en esta parte haciendo especial consideración a la bacteria patógena de la oreja de mar, Vibrio harveyi.

El **Capítulo II** presenta un estudio sobre el interés nutricional de las macroalgas rojas Grateloupia turuturu y Palmaria palmata para el crecimiento de la oreja de mar europea Haliotis tuberculata. Tres dietas han sido testadas para comparar el crecimiento y la composición bioquímica del molusco alimentado ad libitum con Grateloupia turuturu o con Palmaria palmata. Esta investigación ha dado como resultado la redacción de un artículo científico enviado para su publicación en la revista *Aquaculture*.

En el **Capítulo III**, han sido evaluados *in vitro* los efectos de extractos solubles, polares y apolares de dos especies de macroalgas rojas, Grateloupia turuturu y Palmaria palmata, sobre el desarrollo de la bacteria patógena Vibrio harveyi. Este estudio se ha visto valorizado mediante dos experiencias: la primera, referente a los extractos hidrosolubles, ha sido objeto de un artículo científico aceptado para su publicación en la revista *Aquatic Living Resources* y la segunda, acerca de los extractos polares y apolares, ha formado así mismo parte de un artículo científico enviado para su publicación en el *Journal of Aquatic Food Product Technology*.

En el **Capítulo IV**, han sido realizados dos estudios de infección por balneación *in vivo* de dos sub-especies de orejas de mar europeas, Haliotis tuberculata tuberculata del Atlántico Norte y Haliotis tuberculata lamellosa del Mediterráneo, con la cepa ORM4 del patógeno Vibrio harveyi. Para ello, se han efectuado infecciones experimentales a individuos de oreja de mar sometidos a diferentes temperaturas. Esta parte del manuscrito es preliminar. Después de algunos ensayos complementarios, formará parte igualmente de dos publicaciones científicas.

Chapitre I

Étude bibliographique

Ce chapitre est consacré à la présentation des éléments bibliographiques portant sur l'ormeau européen *Haliotis tuberculata*, la bactérie pathogène *Vibrio harveyi* ainsi que les macroalgues rouges *Palmaria palmata* et *Grateloupia turuturu*. Ce travail de synthèse a un double objectif : d'une part montrer la pertinence d'utiliser ces macroalgues comme aliments pour l'élevage de l'ormeau et d'autre part l'intérêt de celles-ci dans la lutte contre le pathogène *Vibrio harveyi*.

CHAPITRE I : Étude bibliographique

1. Présentation des ormeaux

1.1. Éléments de classification

L'ormeau est le nom commun utilisé en France pour faire référence au genre *Haliotis* appartenant à l'embranchement des Mollusca, à la classe des Gasteropoda, à la sous-classe des Orthogastropoda, à l'ordre des Vetigastropoda et à la famille des Haliotidae. Le nom *Haliotis* provient du grec « halios » (la mer) et « otis » (l'oreille) et fait donc référence à son habitat et à la forme particulière de sa coquille. Au 4^e siècle avant JC, Aristote décrivait déjà dans son 4^e livre sur l'histoire des animaux, la patelle sauvage ou oreille de mer : "...l'écuelle sauvage, qu'on appelle parfois oreille de mer...". Les premiers fossiles d'*Haliotidae* sont apparus au Crétacé, il y a 65 millions d'années (Geiger 1999). Des fossiles de *H. tuberculata* datant du Miocène (Figure 2) ont été retrouvés dans différents pays européens (Woodring 1931).



Figure 2. Fossile d'*Haliotis tuberculata* de la ville de Ceutí. Source : Association culturelle de paléontologique de Murcie (Espagne).

Les premières descriptions taxonomiques de la famille *Haliotidae* ont été effectuées par Linné (1758) qui décrivit les sept premières espèces. Ce travail a ensuite été poursuivi par Gmelin (1791) qui a défini vingt autres taxons et plus tard Reeve (1846) qui en décrivit quarante nouveaux. Jusqu'à récemment, 75 à 100 espèces étaient considérées par la plupart des auteurs. L'utilisation de différents marqueurs génétiques (séquences génomiques, microsatellites et séquences mitochondriales) en complément de critères morpho-anatomiques a permis de clarifier la classification des *Haliotidae* (Lee *et al.* 1995; Evans *et al.* 2004; Van Wormhoudt *et al.* 2009). Les analyses phylogénétiques effectuées par Geiger (1999) ont ainsi permis de valider l'existence de 56 espèces au sein du genre *Haliotis*.

En Europe, une seule espèce est présente : *Haliotis tuberculata* (Mgaya *et al.* 1995). Cette espèce comprend trois sous-espèces (Figure 3) qui ont été décrites à partir de leurs caractéristiques morphologiques : *Haliotis tuberculata tuberculata* Linné (1758); *Haliotis tuberculata lamellosa* Lamarck (1822) et *Haliotis tuberculata coccinea* Reeve (1846). Récemment la phylogénie a permis de confirmer l'existence de ces trois sous-espèces qui présentent notamment une structure commune de leur ADN ribosomal 18S (Giribet et Wheeler 2002) mais des différences au niveau de leurs séquences non codantes (ITS1 et

ITS2- Internal Transcribed Spacer) pour *Haliotis tuberculata tuberculata* et *Haliotis tuberculata lamellosa* (Coleman et Vacquier 2002) ainsi que pour *Haliotis tuberculata tuberculata* et *Haliotis tuberculata coccinea* (Van Wormhoudt *et al.* 2011). Par ailleurs, des différences morphologiques telles que la taille et la masse des organismes correspondent à ce constat phylogénétique ainsi *H. tuberculata lamellosa* est plus petit et plus léger que le *H. tuberculata tuberculata* et *H. tuberculata coccinea* ; il atteint seulement entre 6 et 8 cm de longueur. Son nom est dû aux plis caractéristiques observables sur sa coquille qui différencient cette dernière de celles des deux autres sous-espèces.

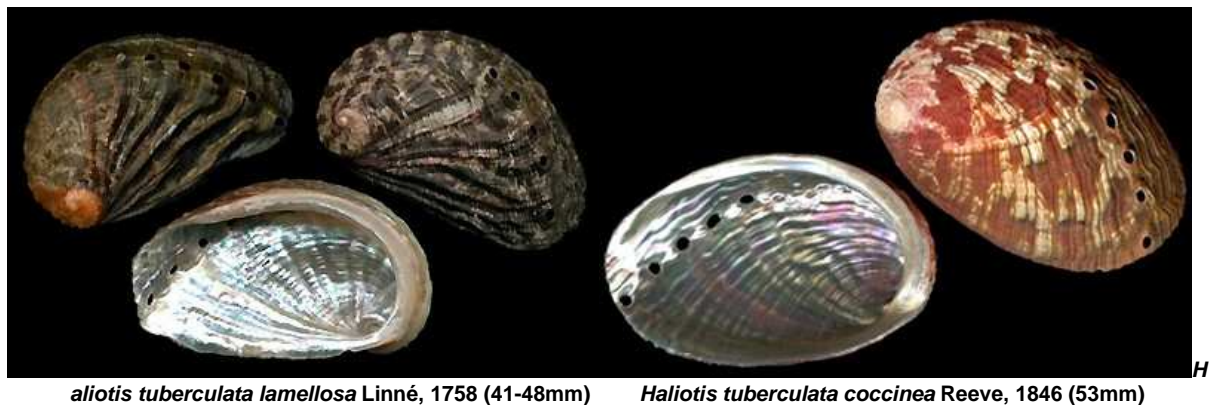


Figure 3. Coquilles des trois sous-espèces d'ormeau européen *Haliotis tuberculata*. D'après <http://www.idscaro.net>

1.2. Répartition géographique

La famille des *Haliotidae* montre une répartition quasi mondiale (Figure 4). En Europe, la distribution géographique de trois espèces d'*Haliotis tuberculata* est la suivante :

- *Haliotis tuberculata tuberculata* est présente sur les côtes atlantiques de l'Irlande jusqu' au Sénégal,
- *Haliotis tuberculata lamellosa* est présente exclusivement en Mer Méditerranée,

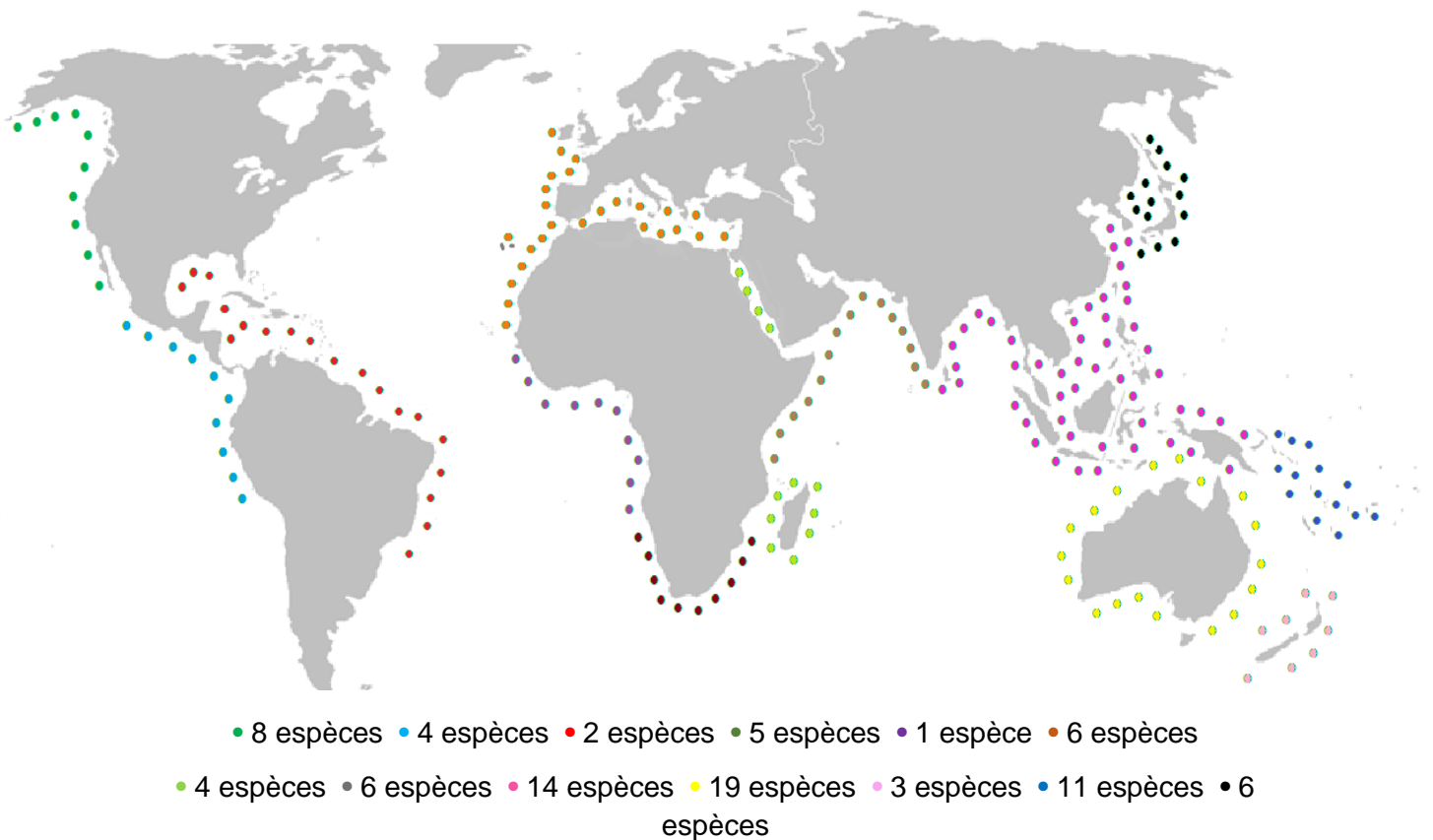


Figure 4. Répartition mondiale de la famille des *Haliotidae*.

La distribution de l'espèce *H. tuberculata* est influencée par différents facteurs environnementaux telles la température et la salinité. Les populations les plus denses se situent dans des zones où la température est comprise entre 8 et 20°C (Mgaya 1995). Les densités les plus importantes sont observées au niveau des îles anglo-normandes et au nord de la Bretagne (Huchette et Clavier 2004).

1.3. Habitat d'*Haliotis tuberculata*

Les ormeaux européens affectionnent des substrats durs et stables, abrités de la lumière et situés à faible profondeur entre 0 et 10 mètres (Clavier et Richard 1986). Ces mollusques vivent souvent cachés dans des anfractuosités, sur les bords de récifs ou sous des blocs de pierres, et se déplacent peu. Un tel habitat procure une protection aux ormeaux contre les prédateurs potentiels, les vagues, etc... Les surfaces de roches recouvertes d'algues encroûtantes, du genre *Lithothamnium spp.*, sont l'habitat préférentiel de l'ormeau européen. La présence d'algues est prépondérante, d'une part pour son alimentation et d'autre part car elles offrent un refuge pour les juvéniles (Clavier et Chardy 1989). Les densités de population observées varient en fonction de la région, des conditions environnementales et de la pression de pêche exercée. Dans certaines zones, l'espèce peut atteindre des densités remarquables de 5 à 6 individus par m² (Clavier et Richard 1986; Clavier et Chardy 1989).

1.4. Morpho-anatomie

Les ormeaux possèdent une **coquille** auriforme composée d'une courte spirale formée par trois ou quatre tours dont le dernier est très grand. Elle présente une série de trous ronds ou ovales autour desquels la surface de la coquille est légèrement relevée. Par chaque trou, un tentacule palléal débouche sur l'extérieur, fonctionnant comme pore respiratoire et canal évacuateur des déchets et des gamètes. Au fur et à mesure que l'animal se développe, de nouveaux trous se forment, tandis que les plus anciens (et plus postérieurs) sont scellés. La partie interne de la coquille contient une épaisse couche de nacre. La couleur externe est influencée par les conditions environnementales et surtout par les algues composant son régime alimentaire. Elle constitue un mécanisme de camouflage permettant la limitation de la prédation, ce dernier apparaissant comme un résultat de l'évolution et de l'adaptation de l'espèce (Liu *et al.* 2009).

Le système musculaire est essentiellement formé par un large pied musculeux ventral qui assure l'adhésion de l'ormeau sur son substrat ainsi que sa locomotion. La partie dorsale du

muscle du pied est entourée latéralement par un collier appelé epipodium (Figure 5). La partie ventrale a la capacité de se contracter fermement et secrète une grande quantité de mucus, ce qui permet à l'ormeau d'adhérer fortement aux roches ou toute autre surface dure. À l'avant du pied, la tête porte deux longs tentacules céphaliques rétractiles.

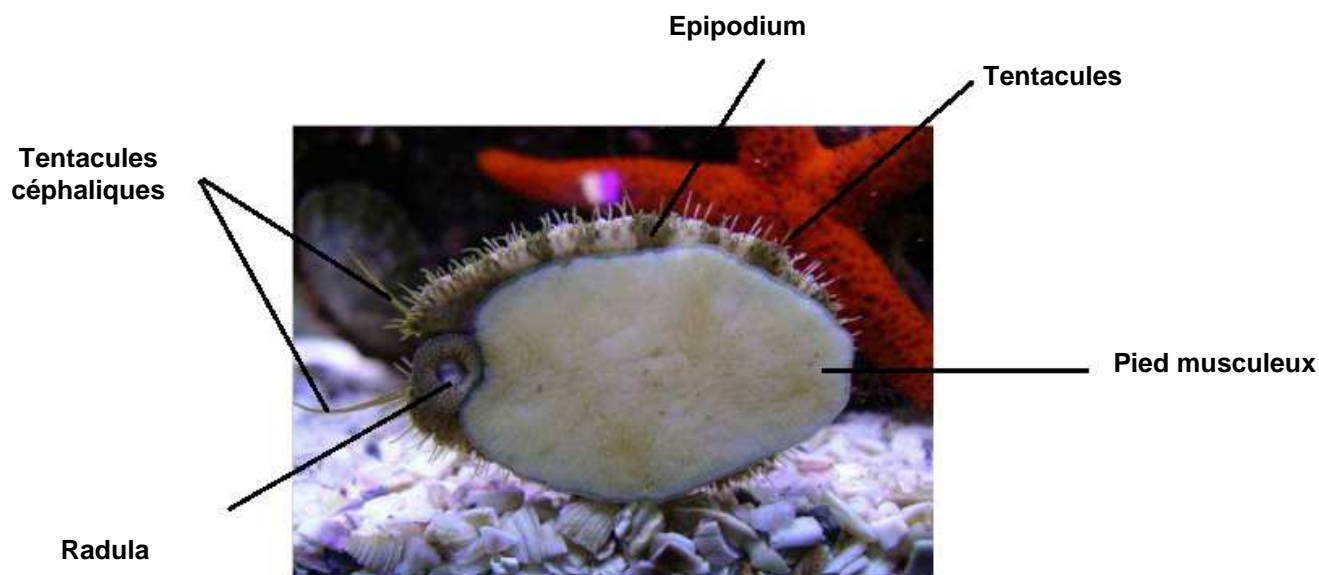


Figure 5. Vue ventrale d'*Haliotis tuberculata*. D'après Travers (2008).

Le système respiratoire présente deux branchies situées au-dessous des pores de la coquille et formées d'un épithélium unistratifié à cellules ciliées et mucocytes (Manganaro *et al.* 2012). Elles se trouvent au centre de la cavité palléale (Figure 6). La branchie de droite est plus grande que celle de gauche. L'eau pénètre dans la cavité palléale du côté droit et est expulsé par les pores respiratoires de la coquille.

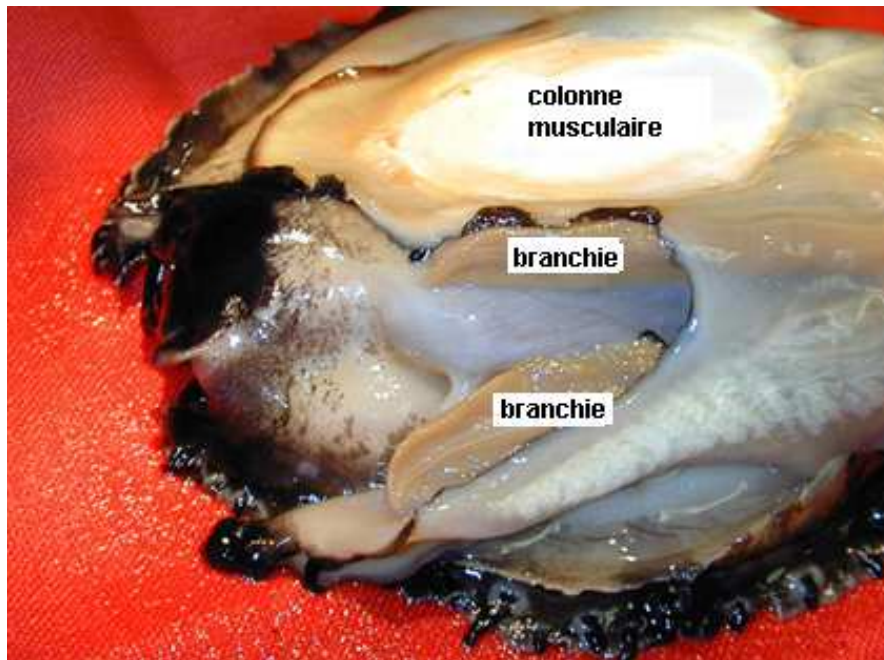


Figure 6. Vue dorsale d'*Haliotis tuberculata* sans sa coquille. Observation des branchies.

D'après <http://www.marinebio.net>.

Le système circulatoire comprend un cœur, des artères, des veines et des sinus. L'hémolymphe oxygénée est poussée par le ventricule dans les artères qui irriguent les différentes parties du corps. Elle baigne les muscles, les organes, les glandes et les éléments nerveux au niveau d'espaces appelés sinus. Ensuite, cette hémolymphe parvient dans un sinus collecteur et est conduite aux branchies en passant par le rein droit. Après l'hématose, le retour au cœur s'effectue par les veines vers les oreillettes.

Le système excréteur de l'ormeau est formé par deux reins asymétriques ayant une fonction très distincte. Le plus grand, situé à la droite du péricarde, est l'organe réellement chargé de l'excrétion. Le rein gauche, appelée « sac papillaire », situé entre la glande hypobranchiale et le péricarde, a surtout une fonction immunitaire.

Le système digestif se trouve sur le côté gauche de la colonne musculaire, située au milieu du corps. Les organes digestifs sont constitués par : la radula, l'œsophage, l'estomac, l'intestin, le rectum et l'anus (Figure 7). Dû à la torsion primitive des gastéropodes, la bouche

et l'anus sont situés dans la partie antérieure du corps. La gonade digestive (l'hépatopancréas) est située sur le côté droit de la colonne musculaire. Elle est intimement liée à la gonade et forme avec elle l'appendice conique (Booolootian *et al.* 1962; Mottet 1978; Mgaya 1995).

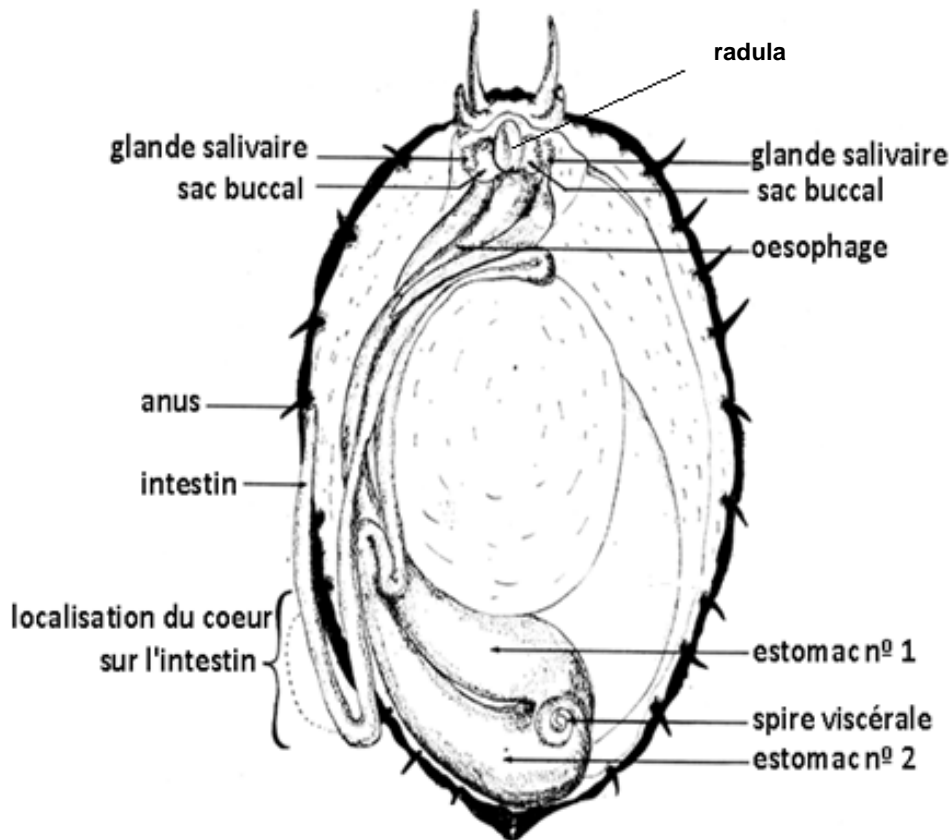
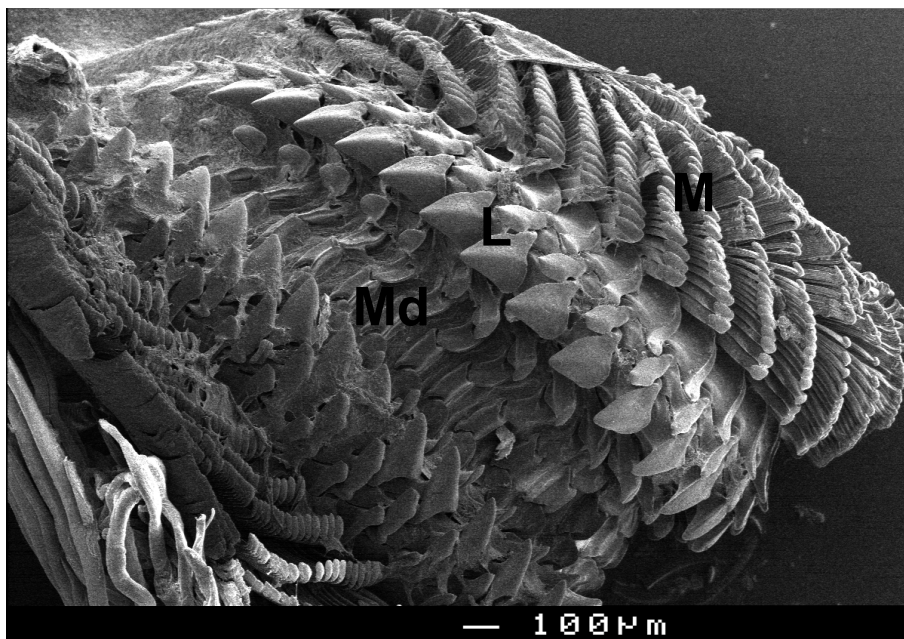


Figure 7. Anatomie du système digestif de l'ormeau.

La radula est de type rhipidoglosse formée par des dents marginales nombreuses, des dents latérales et de dents médianes (Figure 8). C`est dents ne sont pas durcies, contrairement par exemple à la radula des patelles, la radula des ormeaux leur permet de brouter des algues relativement souples.

7.1



7.2

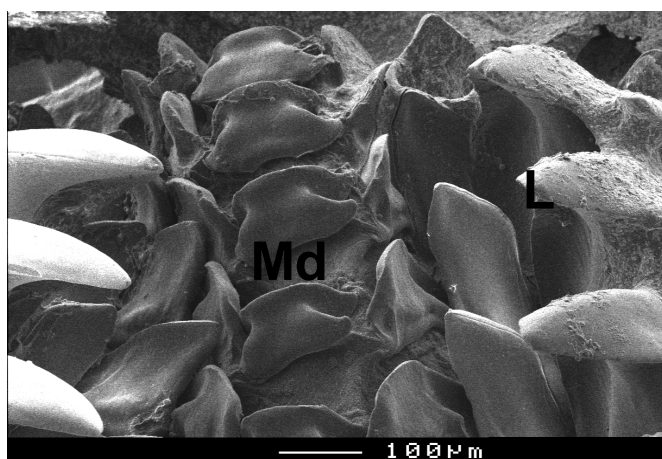


Figure 8. Vues dorsales de la zone fonctionnelle de la radula d'*Haliotis tuberculata tuberculata* provenant de la côte Atlantique ouest française. 7.1 Vue générale. 7.2 Détail. M (dents marginales), L (dents latérales) et Md (dents médianes).

Le système sensoriel de l'ormeau est formé par deux types de tentacules : les céphaliques et les épipodiaux. Ces tentacules permettent à l'animal d'apprécier les changements chimiques et thermiques du milieu qui les entoure. A l'entrée de la cavité respiratoire se trouve également une paire d'osphradies formant l'organe olfactif.

1.5. Reproduction et développement

L'ormeau est un animal gonochorique, c'est à dire à sexes séparés. La gonade entoure la glande digestive formant ce qui est appelé l'appendice conique (Booolootian *et al.* 1962; Mottet 1978; Mgaya *et al.* 1995). La couleur de cet appendice indique le sexe de l'animal (Figure 9) et est généralement beige chez les mâles et gris chez les femelles (Stephenson 1924). Il augmente de taille au fur et à mesure que les animaux atteignent leur maturité sexuelle (Hayashi 1980). Au cours de la maturation la glande digestive joue un rôle particulier en fournissant les nutriments nécessaires au développement des cellules sexuées.



Figure 9. Coloration de la gonade chez les femelles (grise - F) et chez les mâles (beige - M).

La gamétogenèse est influencée par différents facteurs environnementaux dont les principaux sont : la disponibilité et la qualité de la nourriture ainsi que la température de l'eau (Uki et Kikuchi 1984; Hahn 1989; 1994). Le cycle de reproduction diffère d'une espèce à l'autre en fonction des conditions environnementales dans lesquelles elles vivent (Sobhon *et al.* 1999; Campbell *et al.* 2003). Les espèces peuvent être classées en trois groupes en fonction de leur période de reproduction : celles qui pondent durant l'été, celles qui pondent à toute autre période de l'année (excepté l'été) et celles qui le font toute l'année (Shepherd et Laws 1974). Elles sont asynchrones d'une population à l'autre, mais synchrones à l'intérieur

d'une même population (Belhsen 2000). L'induction de la ponte est activée par des ganglions du système nerveux (pleuro-pédieux et viscéraux), sous l'influence des facteurs externes qui sont principalement : des fortes variations de la température de l'eau, l'exondation des reproducteurs à marée basse et n'importe quel stimulus pouvant provoquer la contraction des muscles du pied (Hooker et Morse 1985). La ponte de l'ormeau se produit au coucher du soleil ou au crépuscule. Les animaux quittent leurs abris et se placent en haut des rochers. Les gamètes matures contenus dans les gonades sont expulsés dans l'eau à travers le deuxième trou de la coquille, à l'aide d'une contraction musculaire du pied (Hayashi 1980). Les ovocytes sphériques, de densité supérieure à l'eau de mer, coulent vers le fond tandis que les spermatozoïdes montrent une grande mobilité (Peña 1986; Clavier 1992). La fécondation se produit suite à la libération de lysine par les spermatozoïdes, ce qui solubilise la couche vitelline de l'œuf (Lewis *et al.* 1992). Le succès de la fécondation est influencé par la température de l'eau (elle modifie la durée de vie des spermatozoïdes), la maturité de l'animal (seul le sperme et les ovocytes en pleine maturité ont un potentiel élevé pour la fertilisation) et la densité de reproducteurs (Zhang 2008). Clavier *et al.* (1992) ont ainsi observé chez *Haliotis tuberculata* des taux de fécondation nuls à des densités inférieures à 10^3 spermatozoïdes.mL⁻¹, lié à une dilution du sperme trop importante.

Après la fécondation, le développement comprend cinq phases : la phase embryonnaire, la phase larvaire, la phase post-larvaire, la phase juvénile et la phase adulte. Il se déroule de manière graduelle et progressive en quatre étapes (Figure 10).

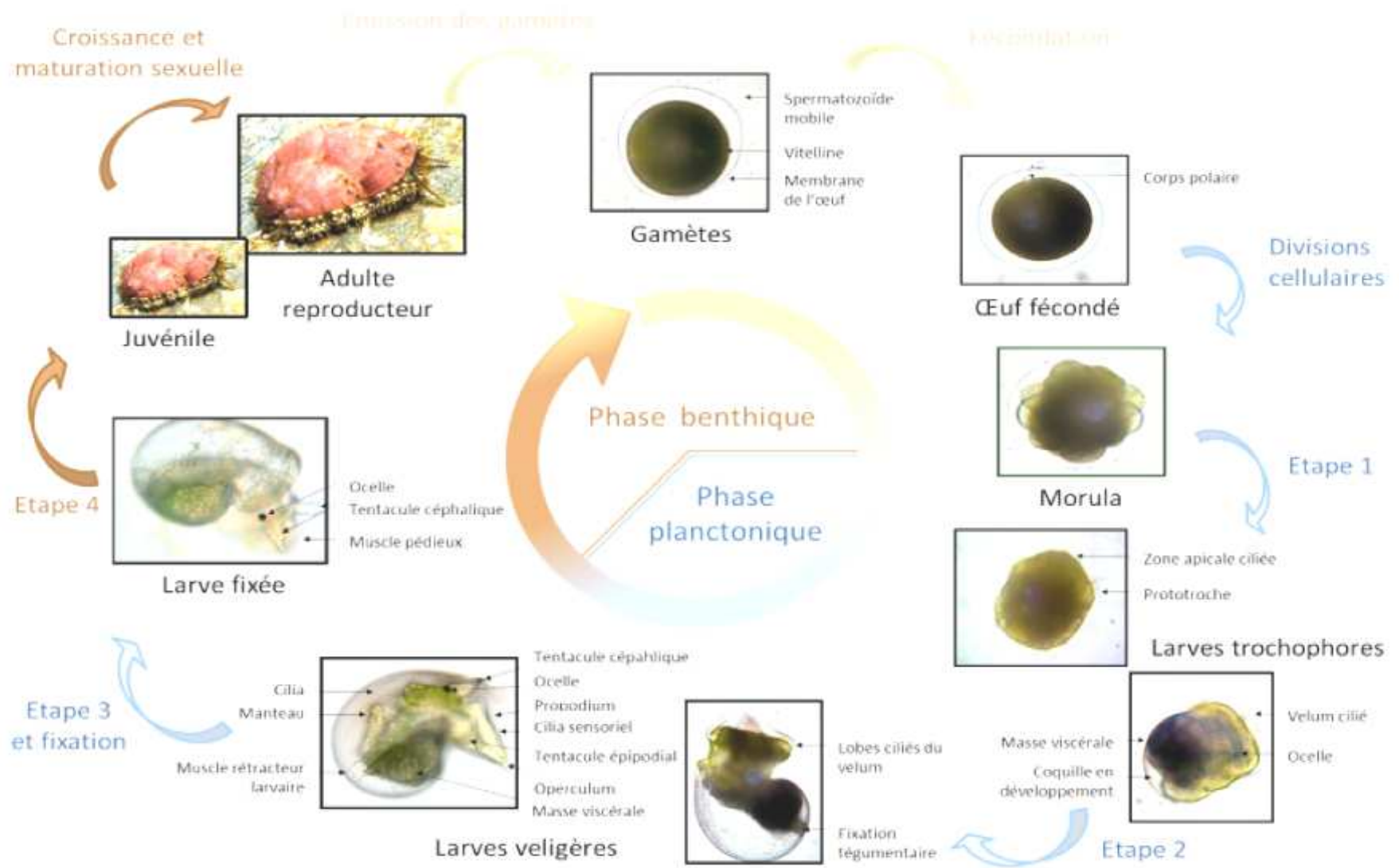


Figure 10. Développement des ormeaux (Cardinaud, 2013). Étape 1 : passage de la phase embryonnaire à la phase larvaire ; Étape 2 : transformation de la larve trochophore en larve véligère ; Étape 3 : passage de la phase planctonique à la phase benthique par fixation de la larve véligère ; Étape 4 : fin de la phase larvaire et passage au stade juvénile.

L'œuf fécondé subit des multiples divisions cellulaires conduisant à l'éclosion de larves trochophores planctoniques. Celles-ci évoluent jusqu'au stade véligère avant de se fixer. Débute alors la phase benthique. Les post-larves s'alimentent alors à l'aide de leur radula, principalement de biofilm et d'algues encroûtantes (Kawamura *et al.* 1998). Le développement du système digestif est incomplet chez les post-larves et évolue jusqu'à la transition vers le stade juvénile (Kawamura *et al.* 2001; Takami et Kawamura 2003).

Le passage au stade juvénile s'accompagne alors d'une transition alimentaire vers un régime composé majoritairement de macroalgues ainsi que d'une augmentation du nombre de pores respiratoires et de tentacules épipodiaux (Koike 1978). Les animaux deviennent adultes lorsqu'ils atteignent la maturité liée à un développement conséquent de la gonade, généralement en fin de deuxième année chez *H. tuberculata*.

1.6. Alimentation

1.6.1. Préférences alimentaires

Les ormeaux sont des herbivores qui s'alimentent préférentiellement de macroalgues. Il est largement admis que si plusieurs espèces d'algues cohabitent, chaque espèce d'ormeaux possède une préférence pour une ou plusieurs espèces d'algues (Dunstan *et al.* 1996). Par exemple, l'ormeau européen *Haliotis tuberculata* consomme préférentiellement les algues rouges et vertes (Mercer *et al.* 1993) alors que l'ormeau du pacifique *Haliotis discus hannai* préfère les algues brunes (Qi *et al.* 2010). Certaines études ont également montré que les juvéniles et les adultes présentent des préférences différentes liées à l'évolution des besoins nutritionnels (Kawamura *et al.* 2001; Johnston *et al.* 2005). Plusieurs critères déterminent cette préférence, celle-ci n'est pas toujours en corrélation avec la valeur nutritive des algues. Mai *et al.* (1995a) ont ainsi montré que les préférences d'une même espèce d'*Haliotis* sont dépendantes

des propriétés physiques et de la composition biochimique des macroalgues, fortement liées à l'espèce, la zone géographique, la saison et les conditions environnementales (Ito et Hori 1989).

Les facteurs qui influencent la préférence des ormeaux pour les macroalgues peuvent être regroupés en 5 catégories :

1. **Les phagostimulants.** La préférence de l'ormeau pour certaines macroalgues est liée à des composés chimiques attractants (Sakata et Ina 1983; Fleming 1995).
2. **Les phagorépulsifs.** Certains composés phénoliques trouvés dans les algues ont été identifiés comme étant répulsifs (Winter et Estes 1992).
3. **La texture.** Les algues souples sont plus faciles à ingérer par les ormeaux, dont les dents sur la radula ne sont pas durcies, que les algues rigides (Steneck et Watling 1982; Shepherd et Steinberg 1992). En général, c'est le cas des algues rouges qui ont un thalle plus fragile que celui des algues brunes.
4. **Le contenu énergétique.** Culley et Peck (1981) ont établi un classement des certains genres de macroalgues en relation avec leur contenu énergétique selon leur consommation préférentielle par les ormeaux :
 - a) *Enteromorpha*
 - b) *Ulva* et *Palmaria*
 - c) *Laminaria* et *Chondrus*
5. **L'âge et la fraîcheur.** Les propriétés physiques et chimiques des algues évoluant avec leur âge, il est connu que les herbivores préfèrent les jeunes thalles (Van Alstyne *et al.* 1999).

1.6.2. Exigences alimentaires des ormeaux

Les exigences alimentaires des ormeaux se situent en dessous de 5% de lipides (Mai *et al.* 1995a), entre 24 et 34,5% de protéines (Mai *et al.* 1995b) combinés à un taux élevé en carbohydrates de 40 à 60% (Fleming *et al.* 1996; Thongrod *et al.* 2003). De nombreux travaux ont examinés la valeur nutritionnelle de macroalgues pour les ormeaux (Culley et Peck 1981; Mercer *et al.* 1993; Mai *et al.* 1995b; Viera *et al.* 2005). Bien que les algues rouges et vertes semblent posséder les meilleures valeurs nutritives et induire une meilleure croissance de l'ormeau, un régime mixte conduit souvent à une meilleure croissance (Qi *et al.* 2010; Mulvaney *et al.* 2013).

Chez *H. tuberculata*, il a été établi une hiérarchisation des performances de différents régimes mono-spécifiques en terme de croissance et de condition des ormeaux :

- 1) *Palmaria palmata*
- 2) *Alaria esculenta*, *Ulva lactuca*, *Laminaria digitata*
- 3) *Laminaria saccharina*, *Chondrus crispus*

1.7. Mortalité

La mortalité chez l'ormeau dans son milieu naturel est principalement due à la prédation des post-larves par des annélides et des crustacés lors de leur fixation (Shepherd et Turner 1985; Onitsuka *et al.* 2008). L'ormeau peut aussi être la proie de certaines espèces de poissons, de crabes et de homards (Cox 1962; Shepherd 1973). D'autres causes de mortalité sont liées aux facteurs physiques de l'environnement, tels les courants océanique, les mouvements de sable et les effets des tempêtes (Mottet 1978; Naylor et McShane 2001; Onitsuka *et al.* 2008). De même, les activités humaines et les maladies provoquent une mortalité élevée.

1.8. Pathologies

Les pathologies les plus courantes dans le genre *Haliotis* sont : le parasitisme, les maladies virales et les maladies bactériennes.

1.8.1. Parasitisme

La coquille des ormeaux est susceptible d'être infestée par de nombreux organismes invertébrés sessiles (Leonart *et al.* 2003; Vargas *et al.* 2005), notamment des éponges *Cliona spp.* ainsi que des polychètes (Clavier 1992). Ceux qui causent le plus de maladies chez la famille des *Haliotidae* appartiennent à la famille de *Spionidae* (genres *Polydora* et *Boccardia*) ainsi qu'à la famille de *Sabellidae* (*Terebrasabella heterouncinata*) (Leonart *et al.* 2003; Simon *et al.* 2006; Moore *et al.* 2007). Différentes études ont montré que l'infestation par des parasites présente autant dans les populations naturelles que dans les ormeaux en élevage (Figure 10 - Clavier 1992; Leonart *et al.* 2003), affecte significativement l'état de la chair (Simon *et al.* 2006) entraînant la mort de certains animaux en état d'infestation avancée (Leonart *et al.* 2003). D'autres parasites peuvent attaquer l'ormeau comme des trématodes (Bower 2003) ainsi que certains protozoaires du genre *Haplosporidium*, ce dernier étant par ailleurs la cause de fortes mortalités observées pour *Haliotis iris* en Nouvelle-Zélande (Diggles *et al.* 2002).

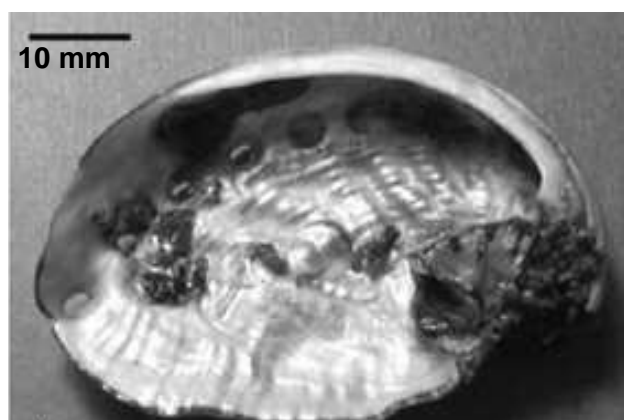


Figure 11. Surface interne de la coquille d'un ormeau sévèrement infecté par un polychète. D'après Travers (2008).

1.8.2. Les maladies virales

L'amyotrophie est une maladie qui limite l'alimentation, conduisant à la mortalité chez les ormeaux noirs japonais juvéniles de l'espèce *Haliotis discus discus* dans plusieurs écloséries au Japon. L'étiologie de la maladie n'a pas été établie mais un virus a été isolé dans des hémocytes (Nakatsugawa *et al.* 1999). Une autre infection virale connue est celle produite par *Haliotid herpesvirus 1* (AbHV-1) qui a provoqué de fortes mortalités dans la culture d'*Haliotis diversicolor supertexta* à Taiwan (Chang *et al.* 2005).

1.8.3. Les maladies bactériennes

Le «Withering Syndrome » est la maladie la plus connue et étudiée pour avoir causé des mortalités massives chez *Haliotis*. Elle a été identifiée la première fois en Californie dans les années 80 quand les populations d'*Haliotis cacherodii*, d'*Haliotis rufescens* et d'*Haliotis corrugata* ont diminué de 51 à 98% dans les îles californiennes (Haaker *et al.* 1992; Parker *et al.* 1992). La bactérie responsable de cette maladie était *Xenohaliotis californiensis* (Figure 11 - Friedman *et al.* 2000). Cette maladie est associée au phénomène El Niño (Steinbeck *et al.* 1992; Friedman *et al.* 1997) et liée à des températures élevées. L'infection se produit sans contact physique entre individus (Moore *et al.* 2000).

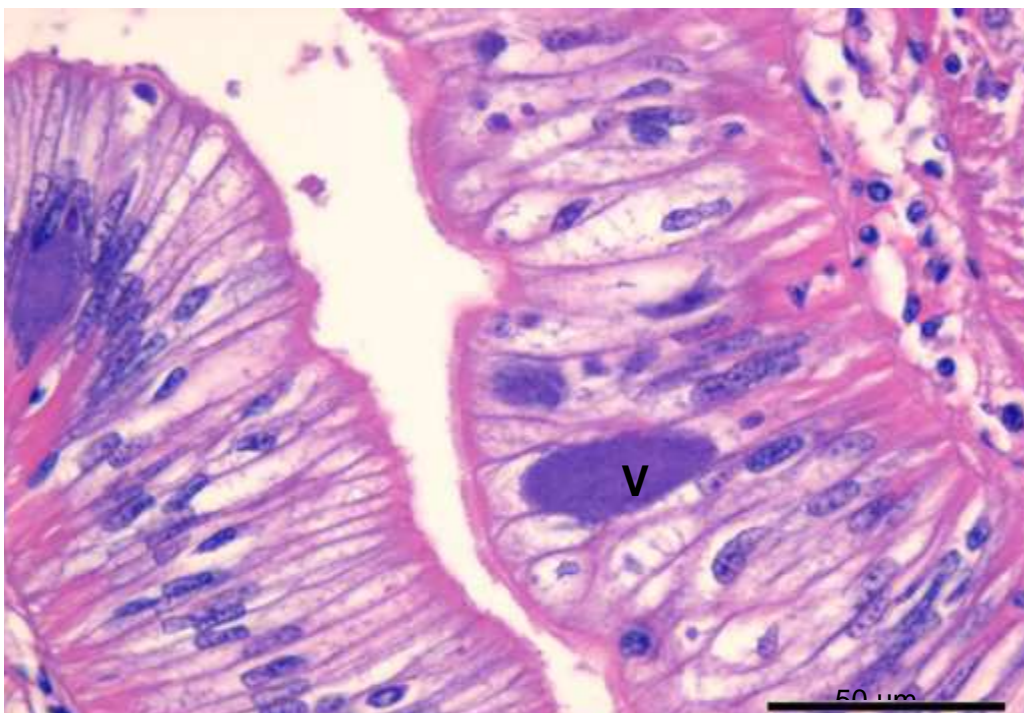


Figure 12, Vacuole intracytoplasmique (v) contenant de nombreuses bactéries de *Xenohaliotis californiensis* dans l'épithélium intestinal de l'ormeau *Haliotis rubra*. D'après B. Cholet (IFREMER-2013).

D'autres maladies bactériennes sont causées par des bactéries gram-négatives du genre *Vibrio*. À la fin des années 80, des mortalités massives chez les populations naturelles de l'ormeau européen *H. tuberculata tuberculata* ont été causées par *Vibrio harveyi*, qui est également responsable de pertes importantes dans les cultures d'*Haliotis diversicolor supertexta* (Nicolas *et al.* 2002). D'autres vibrioses ont été signalées, comme celle due à *V. fluvialis*, responsable de la maladie pustuleuse chez *Haliotis discus hannai* en Chine (Li *et al.* 1998), *V. parahaemolyticus* chez *Haliotis diversicolor supertexta* à Taiwan (Liu *et al.* 2000) et *V. harveyi* et *V. splendidus* chez *Haliotis rubra* et *Haliotis laevigata* en Tasmanie (Bower 2003).

1.9. Exploitation des ormeaux

Bien que les espèces du genre *Haliotis* aient été exploitées par les communautés côtières humaines depuis des temps immémoriaux, sa production à grande échelle n'a commencé qu'au début des années 1970. En effet, l'ormeau permet la diversification

de la conchyliculture. La saveur de sa chair et l'originalité de sa coquille nacrée délicatement perforée font de ce mollusque un mets raffiné à haute valeur commerciale et prisé internationalement, particulièrement par les restaurateurs et en Asie.

Gordon and Cook (2013) ont étudié les variations de la production mondiale de l'ormeau issue des différentes filières d'exploitation : la pêche, les fermes aquicoles et la pêche illégale. Parmi les 56 espèces décrites dans le monde, seulement 15 ont un intérêt commercial.

La production mondiale d'ormeau (pêche, aquaculture et pêche illégale) a augmenté passant de 20370 t en 1970 à environ 98000 t en 2011 (Fishtech 2012). En parallèle, la capture mondiale de ces mollusques a diminué progressivement de 19720 t en 1970 pour atteindre 7424 t en 2012 (Figure 12 - Fishtech 2012). Cette baisse est principalement due à la surexploitation des populations naturelles, l'exploitation illégale, les maladies et la dégradation de l'habitat (Gordon et Cook 2013). Pour ces raisons, la pêche dans deux des zones les plus productives, les États-Unis et l'Afrique du Sud, est actuellement interdite.

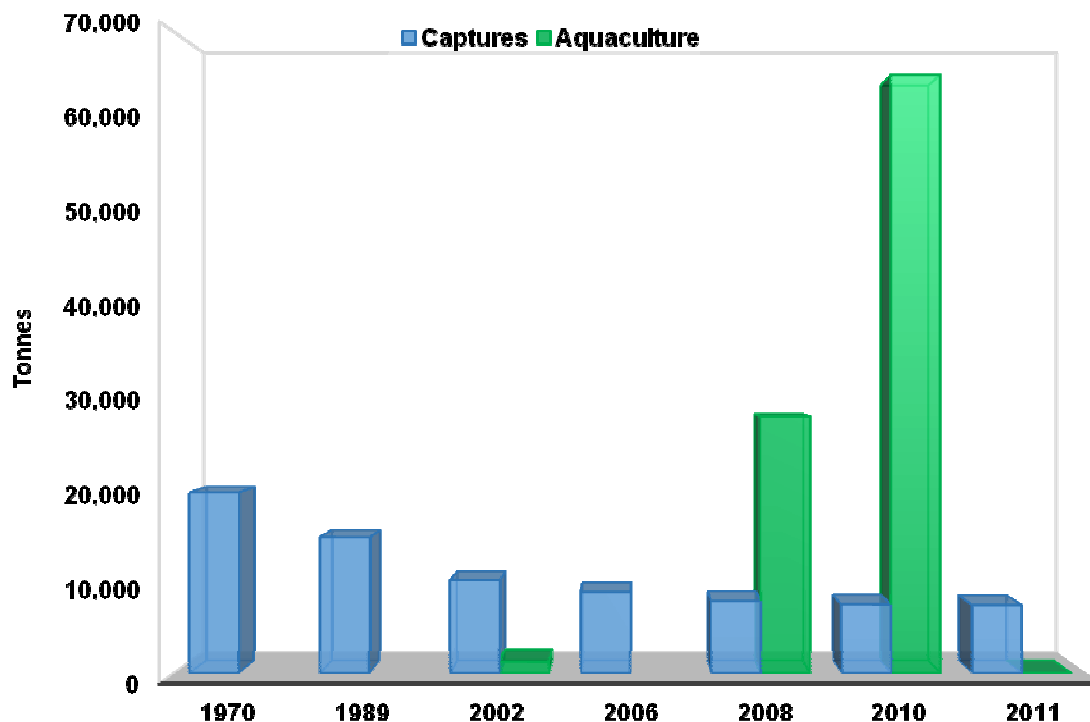


Figure 13. Production mondiale d'ormeaux entre 1970-2011 (Fishtech, 2012).

En 2010, les captures les plus importantes de ce mollusque ont été réalisées en : Australie (4525 t), la Nouvelle-Zélande (1115 t), le Japon (600 t) et le Mexique (756 t). Bien que les pays fassent des efforts pour réduire la pêche illégale, il est estimé que celle-ci, en 2010, représentait plus de 60% des captures légales. Inversement à cette diminution de la capture, la culture dans le monde est passé d'environ 1220 t en 2002 à une production estimée à 85000 t en 2011(Figure 13 - Fishtech 2012).

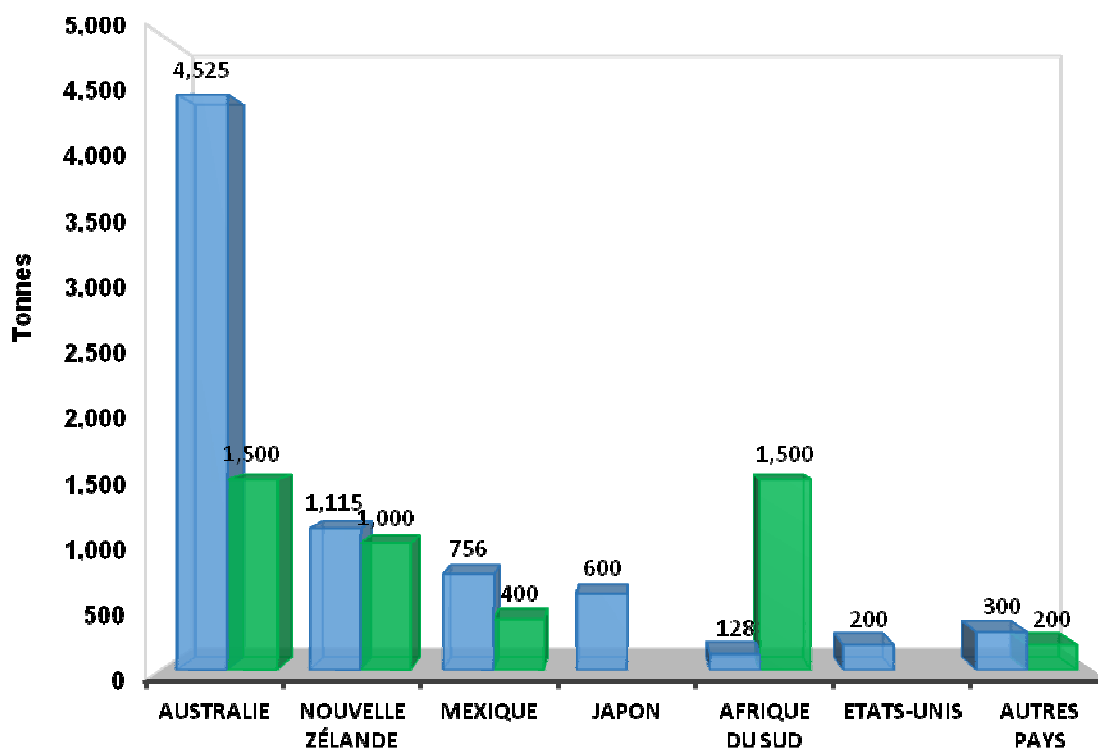


Figure 14. Pêche légale (en bleu) et illégale (en vert) d'ormeaux par pays en 2010 (Fishtech, 2012).

Le principal producteur halioticole est la Chine, où il est estimé qu'il y a 300 entreprises avec une production de 56000 t en 2010 (Figure 15). Les principales espèces cultivées en Chine sont *Haliotis diversicolor supertexta* espèce de faible valeur commerciale, et un hybride d'*Haliotis discus hannai* et *Haliotis discus discus*, espèces à forte valeur ajoutée. La plupart de la production chinoise reste dans le pays. La Corée est le deuxième plus grand producteur, sa production ayant augmenté de 60 fois au cours des neuf dernières années (avec un total de 6228 t en 2010) et étant exportée à 85%. La principale espèce qui y est cultivée est *Haliotis discus hannai*.

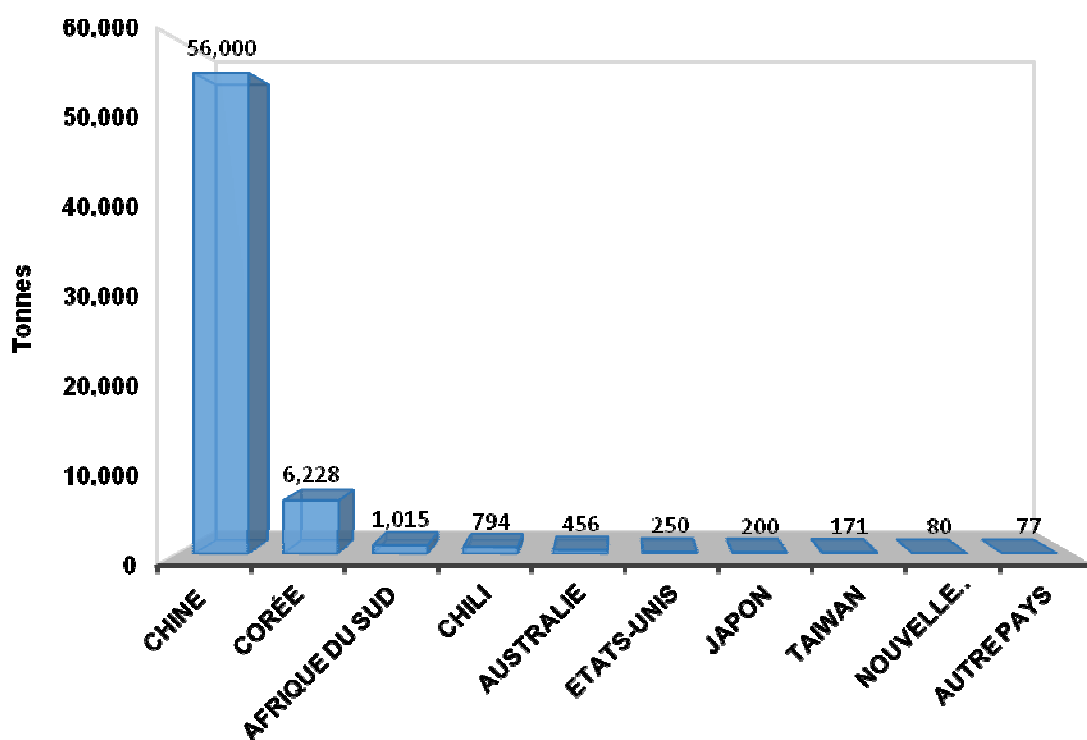


Figure 15. Production aquacole d'ormeaux par pays en 2010 (Gordon et Cook, 2013).

L'industrie européenne est basée principalement sur la production d'*Haliotis tuberculata tuberculata*. Cette espèce est traditionnellement capturée sur la côte de l'ouest de la France et des Îles de la Manche (Huchette et Clavier 2004). La production halioticoles totale européenne a augmenté dans les années 90, en raison de la mondialisation du marché international et d'une augmentation des exportations vers l'Asie. Cependant, les captures d'ormeaux ont varié au fil des années, principalement en raison de la surexploitation des stocks naturels des îles anglo-normandes, l'infection par l'espèce bactérienne *Vibrio harveyi* en France et les toxines paralysantes PSP, produites par les microorganismes (*Alexandrium minutum* et *Dinophysis acuminata*) responsables des « marées rouges » en Espagne (Huchette et Clavier 2004).

En Europe, *Haliotis tuberculata tuberculata* est cultivé industriellement seulement en France et en Irlande. L'Irlande a commencé la production des espèces *Haliotis tuberculata tuberculata* et *Haliotis discus hannai* dans les années 70, et est aujourd'hui,

avec les îles anglo-normandes de la Manche, en tête de la production européenne (Huchette et Clavier 2004). En France, la production d'*Haliotis tuberculata tuberculata* est destinée principalement à couvrir les demandes des restaurants parisiens (Huchette et Clavier 2004). La plupart de la production européenne est écoulée en France, cette dernière n'ayant pas une production suffisante pour satisfaire la demande de son pays, ce qui l'oblige à importer des ormeaux.

En Espagne, une production de l'ormeau s'est développée en Galice dans les années 90 en raison du prix attractif de l'ormeau sur les marchés asiatiques. Cependant, cette activité est restée paralysée depuis 1993 à cause de la présence de la toxine PSP en Galice, jusqu'à ce qu'en 2011, la société Galician Marine Aquaculture S.L. recommence l'élevage avec les espèces *Haliotis tuberculata tuberculata* et *Haliotis discus hannai*.

L'augmentation de la production aquacole ainsi que de la pêche illégale a entraîné une baisse du prix de l'ormeau au cours des dernières années. Ainsi, quand le cours des espèces à plus forte valeur ajoutée (*Haliotis de laevigata* et *Haliotis discus*) avait une valeur de 45 \$ US.kg⁻¹ en 1999 (Gordon et Cook 2001), il a été évalué à 30 \$ US.kg⁻¹ en 2010 (Cook et Roy Gordon 2010). Le marché mondial des ormeaux a été frappé par la crise mondiale financière qui a réduit la demande des produits haut de gamme.

Face à cela, les fermes ont dû améliorer leur rentabilité par la mise en œuvre de systèmes plus efficaces, moins consommateurs d'eau et d'énergie, et demandant moins de main d'œuvre. Le contrôle de la reproduction et la maîtrise de l'approvisionnement en nourriture apparaissent aussi comme deux aspects primordiaux pour le développement de l'halioticulture. Ils ont fait l'objet de nombreux travaux (Hahn 1989) et en particulier ont permis le développement de la nourriture artificielle (Britz *et al.* 1994; Fleming *et al.* 1996). La considération des besoins

alimentaires est d'une importance vitale non seulement pour la réussite des entreprises mais aussi pour évaluer l'impact potentiel sur l'environnement.

2. Présentation des Rhodophyta

2.1. Éléments de classification

Le terme «algues» a été utilisé la première fois par Linné (1753) pour désigner les organismes végétaux inclus dans la classe des cryptogames. Ce terme est dépourvu de sens taxonomique dans la classification actuelle mais utilisé pour désigner les organismes qui possèdent de la chlorophylle *a*, un thalle non différencié en racine, tige et feuilles et qui sont principalement aquatiques. Les macroalgues possèdent des plastes riches en chlorophylle ainsi que d'autres pigments (phycoérythrine, phycocyanine...) et vivent dans la zone euphotique, sauf certaines algues rouges qui peuvent être rencontrées plus profondément. Elles se reproduisent généralement en phases alternées, sexuée et asexuée.

Les algues ont été pendant longtemps classées en fonction de leur composition pigmentaire en quatre groupes : Cyanobactéries (algues bleu-vert), Rhodophycées (algues rouges), Phéophycées (algues brunes) et Chlorophycées (algues vertes). La classification phylogénétique actuelle regroupe les algues rouges classiques dans l'embranchement des Rhodophyta (anciennement Rhodophycées - Yoon *et al.* 2006; Guiry et Guiry 2014). Ce taxon d'algues est très diversifié, comprenant entre 5000 et 5500 espèces pour la plupart marines. Les Rhodophyta se subdivisent en quatre sous-embranchement : *Cyanidiophytina*, *Rhodophytina*, *Eurhodophytina* et *Metarhodophytina* (Saunders et Hommersand 2004; Yoon *et al.* 2006; Guiry et Guiry 2014). Dans ce groupe, il existe des formes unicellulaires microscopiques et des formes pluricellulaires qui peuvent mesurer quelques décimètres de long.

Les Rhodophyta contiennent différents pigments, principalement la chlorophylle *a*, des caroténoïdes (α et β) et des xanthophylles. Leur originalité réside dans la présence des

phycobiliprotéines : allophycocyanine (bleu-vert), phycocyanine (bleu), phycoérythrocyanine (orange) et phycoérythrine (rose-violet). Ces derniers leur permettent de capter l'énergie des radiations bleues et violettes qui pénètrent en profondeur la couche euphotique et qui ne sont pas directement utilisables par la chlorophylle. Beaucoup de Rhodophyta vivent ainsi dans l'étage infralittoral et jusqu'à la limite inférieure de la zone euphotique ; l'une d'entre elles a été retrouvée par -268 m de fond aux Bahamas où ne subsiste que 0,5‰ de l'intensité lumineuse de surface (Littler *et al.* 1985).

2.2. Organisation cellulaire

Dans ce groupe d'algues, la paroi cellulaire est essentiellement composée de deux parties, l'une interne et rigide, constituée de microfibrilles de cellulose et l'autre externe et mucilagineuse, constituée de polysaccharides de type galactane (phycocolloïdes), tels l'agar-agar ou le carraghénane. Il est possible aussi de trouver des algues rouges présentant des dépôts de carbonate de calcium dans leur paroi, offrant un aspect rigide à ces organismes (cas des Corallinales).

Les plastes sont rarement uniques dans les cellules mais en nombre variable. Ils sont souvent dépourvus de pyrénoïde et renferment la chlorophylle *a* associée aux caroténoïdes. Ils sont de forme ovale ou ronde, bien que certains genres présentent des formes étoilées. Dans ces chloroplastes, des thylakoïdes libres présentent, sur leur face externe, des phycobilisomes renfermant les phycobiliprotéines (c.f 2.1- Figure 16).

La principale substance de réserve dans ce groupe est un glucane nommé rhodamylon ou amidon floridéen, qui est toujours stocké sous forme de grains dans le cytoplasme.

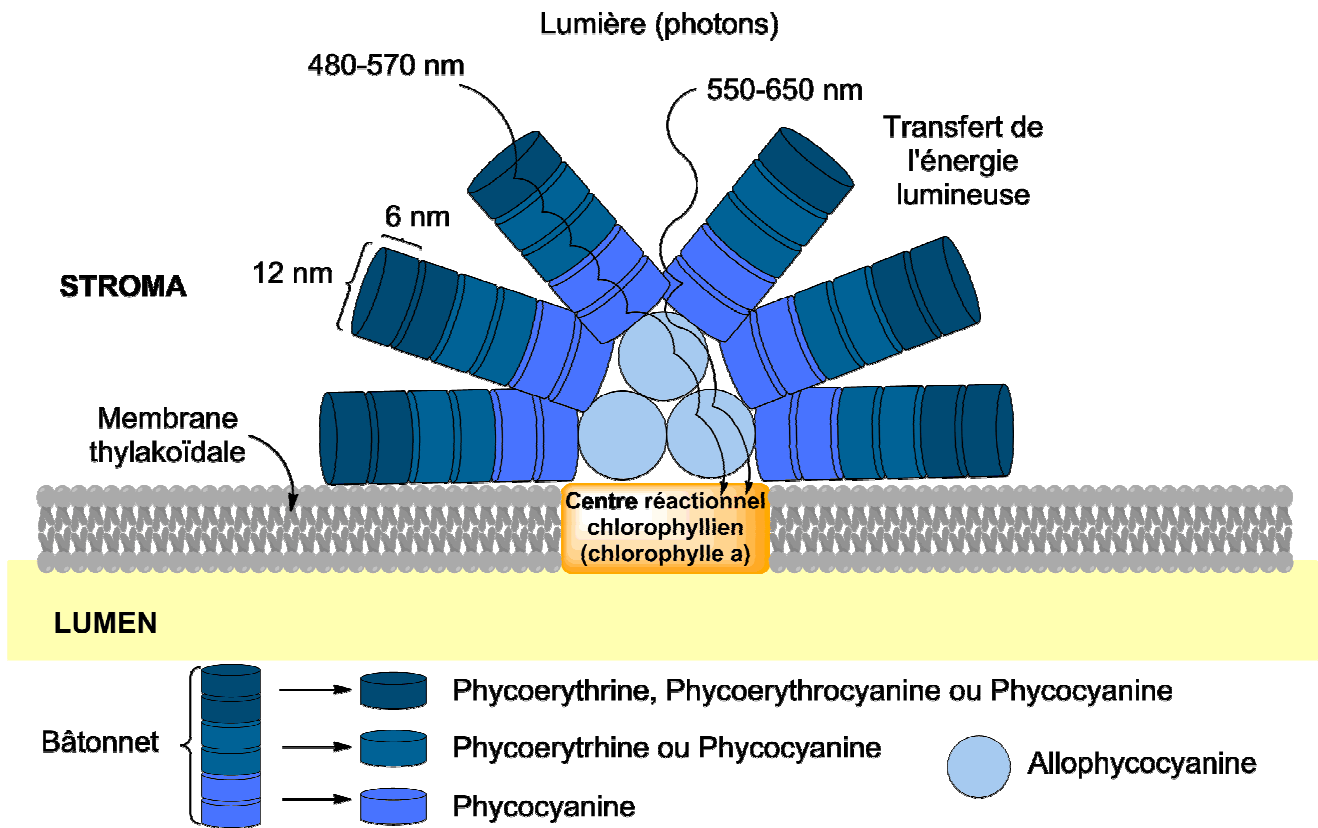


Figure 16. Schéma de la structure du phycobilisome. D'après Munier (2013).

2.3. Valeur nutritive

D'un point de vue nutritionnel, les algues ont une faible valeur énergétique mais présentent une forte teneur en protéines, fibres, minéraux et vitamines (Fleurence 1999; Ortiz *et al.* 2009). En général, les protéines d'algues sont riches en glycine, arginine, alanine et acide glutamique. Elles contiennent des acides aminés essentiels à des niveaux comparables à ceux indiqués par la Food and Agriculture Organisation et l'Organisation Mondiale de la Santé (Table 1 - Dhargalkar et Verlecar 2009; Rajapakse et Kim 2011). La taurine, un acide aminé libre, présent chez les Rhodophyta est impliquée dans de nombreux processus physiologiques telles la régulation osmotique, la neuromodulation et la stabilisation de la membrane cellulaire (Van Gelder 1981; Mabeau et Fleurence 1993; Bidri et Choay 2003). Les algues sont aussi une excellente source de vitamines A, B1, B2, B3, B5, B9, B12, C, D et E (Dhargalkar et Verlecar

2009). Enfin, les principaux minéraux des algues sont, entre autres, le sodium, le calcium, le potassium, le chlore, le soufre et le phosphore (Rupérez 2002).

Tableau 1. Composition en acides aminées de certaines macroalgues. D'après Fleurence (1999).

Acides Aminées	<i>Palmaria palmata</i> (algue rouge) (4)	<i>Porphyra tenera</i> (algue rouge) (2)	<i>Chondrus crispus</i> (algue rouge) (5)	<i>Laminaria digitata</i> (algue brune) (1)	<i>Undaria pinnatifida</i> (algue brune) (2)	<i>Ulva armoricana</i> (algue verte) (3)	<i>Ulva pertusa</i> (algue verte) (2)
Histidine	0.5-1.2	1.4	0.9	1.3	2.7	1.2-2.1	4.0
Isoleucine	3.5-3.7	4.0	1.8	2.7	2.9	2.3-3.6	3.5
Leucine	5.9-7.1	8.7	2.9	5.4	5.1	4.6-6.7	6.9
Lysine	2.7-5.0	4.5	4.9	3.7	4.3	3.5-4.4	4.5
Méthionine	2.7-4.5	1.1	0.5	1.6	2.0	1.4-2.6	1.6
Phénylalanine	4.4-5.3	3.9	1.5	3.2	3.7	5.0-7.1	3.9
Thréonine	3.6-4.1	4.0	2.2	4.4	2.4	4.5-6.8	3.1
Tryptophane	3.0	1.3	-	0.8	0.8	-	0.3
Valine	5.1-6.9	6.4	-	4.2	4.2	4.0-5.2	4.9
Cystéine	-	0.3	-	1.7	1.7	-	1.2
Arginine	4.6-5.1	16.4	33.6	0.3	0.3	4.3-8.7	14.9
Acide aspartique	8.5-18.5	7.0	3.8	8.7	8.7	6.0-11.8	6.5
Acide glutamique	6.7-9.9	7.2	4.1	9.4	9.4	11.7-23.4	6.9
Alanine	6.3-6.7	7.4	3.8	14.4	14.4	5.5-7.7	6.1
Glycine	4.9-13.3	7.2	3.5	4.3	4.3	6.3-7.5	5.2
Proline	1.8-4.4	6.4	1.9	3.7	3.7	5.0-10.5	4.0
Sérine	4.0-6.2	2.9	2.2	4.0	4.0	5.6-6.1	3.0
Tyrosine	1.3-3.4	2.4	1.0	1.5	1.5	4.4-4.7	1.4

(1) Augier & Santimone, 1978; (2) Fujiwara-Arasaki et al., 1984; (3) Fleurence, 1999 a; (4) Morgan et al., 1980; (5) Young & Smith, 1958

Au contraire, la teneur en lipides dans les algues est faible entre 1 et 5%, composés principalement par des lipides neutres et des glycolipides (Figure 17). Les algues rouges contiennent généralement des concentrations très élevées d'EPA (acide eicosapentaénoïque) et des acides palmitique, oléique et arachidonique par rapport

aux algues brunes qui contiennent des concentrations élevées d'acide oléique, linoléique et α -linoléique (Fleurence *et al.* 1994; Kumari *et al.* 2010).

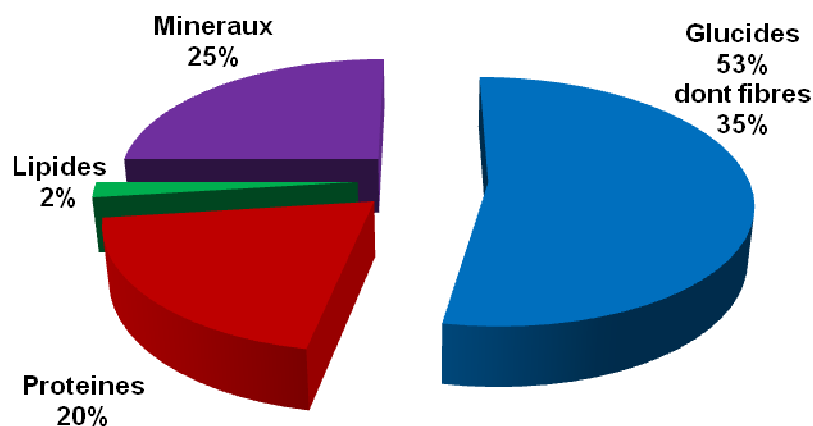


Figure 17. Composition moyenne des algues (% de matière sèche).

Les algues contiennent une concentration élevée de glucides qui sont surtout des polysaccharides de structure et de stockage, avec des teneurs allant de 20 à 70% de la matière sèche. Parmi ces glucides, la proportion de fibres est considérable pouvant varier de 36 à 60% de la matière sèche (Rasmussen et Harrison 2011) et comprend une grande partie de fibres solubles (55-70%).

2.4. Valorisation des Rhodophyta

Il existe une grande variété d'espèces ayant une importance commerciale comme matière première dans l'industrie d'extraction des phycocolloïdes (agar-agar, alginate et carraghénane). Celle-ci se fait à partir d'algues cultivées ou de stocks naturels. De nombreuses études ont également démontré chez les Rhodophyta la présence de métabolites ayant des activités biologiques intéressantes et potentiellement valorisables en tant qu'agents antiviraux (Matsuhira *et al.* 2005; Chattopadhyay *et al.* 2007), biocides (Val *et al.* 2001; Dworjanyn *et al.* 2006; Nylund *et al.* 2007),

antitumoraux (Huang *et al.* 2006), antioxydants (Burritt *et al.* 2002) et anticoagulants (Yamada *et al.* 2000; Melo *et al.* 2004).

Parmi ces métabolites, les phycobiliprotéines suscitent un intérêt tout particulier en tant que colorant alimentaire et cosmétique, et aussi en tant qu'agents responsables de certaines activités biologiques (Fleurence 2004). Dix-sept brevets ont ainsi été déposés entre 1981 et 2006 concernant les activités biologiques des phycobiliprotéines (Sekar et Chandramohan 2008).

2.5. Les modèles d'étude

2.5.1. *Grateloupia turuturu*

2.5.1.1. Systématique et description

Grateloupia turuturu est une macroalgue rouge marine dont la taxonomie est la suivante :

Phylum :	Rhodophyta
Sous-phylum :	Eurhodophytina
Classe :	Florideophyceae
Sous-classe :	Rhodymeniophycidae
Ordre :	Halymeniales
Famille :	Halymeniaceae
Espèce :	<i>Grateloupia turuturu</i> Yamada 1941



Figure 18. *Grateloupia turuturu* (Yamada 1941) parmi d'autres macroalgues dans le milieu naturel.

Grateloupia turuturu présente un thalle de grande taille qui est parmi les plus polymorphes. Son thalle, souple et gélatineux, est constitué de deux à trois grandes frondes épaisses qui se dressent à partir d'un stipe très court et d'un crampon réduit (Figure 18). Elle peut atteindre une longueur de 185 cm de long pour une largeur de 30 cm, ce qui fait d'elle la plus grande algue rouge d'Europe (Simon *et al.* 2001). Son épaisseur varie de 0,1 à 1 mm (Barbara et Cremades 2004; Cabioc'h *et al.* 2006).

2.5.1.2. Répartition géographique

L'aire de répartition naturelle de *G. turuturu* se situe au sud-est de l'Asie, principalement au Japon et en Corée (Figure 18 - Gavio et Fredericq 2002). Elle a été introduite accidentellement en Europe au début des années 1980, au niveau de l'étang de Thau, lors de l'importation de naissains d'huître *Crassostrea gigas* en provenance du Japon. Elle s'est ensuite répandue sur les côtes européennes. Le phénomène s'est accéléré sur la côte ouest française suite à la marée noire de l'Erika qui a provoqué la disparition de ses consommateurs (Barillé-Boyer *et al.* 2004). Appelée dans un premier temps *Grateloupia doryphora*, des études biomoléculaires ont démontré que cette espèce européenne était en fait l'espèce *G. turuturu* (Gavio et Fredericq 2002; Marston

et Villalard-Bohnsack 2002). Aujourd'hui, en Europe, *G. turuturu* est présente en France (Gavio et Fredericq 2002; Plouguerné *et al.* 2006; Lafontaine *et al.* 2011), en Grande-Bretagne (Hardy et Guiry 2003), aux Pays-Bas (Stegenga *et al.* 2007), en Espagne (Barbara et Cremades 2004; Barreiro *et al.* 2006), aux Îles Canaries (John *et al.*, 2004), en Italie (Wilkes *et al.* 2006) et au Portugal (Araújo *et al.* 2011). Elle est décrite comme invasive à d'autres endroits du monde : en Australie (Saunders et Withall 2006), en Nouvelle-Zélande (D'Archino *et al.* 2007), aux Etats-Unis (Villalard-Bohnsack et Harlin 1992; Villalard-Bohnsack et Harlin 1997; Villalard-Bohnsack et Harlin 2001; Mathieson *et al.* 2008; Janiak 2009; Janiak et Whitlatch 2012), en Chine (Wang 2012), en Corée (Frydenborg *et al.* 2014) et en Russie (Titlyanov et Titlyanov 2012), ainsi qu'en Mauritanie, au Sénégal, au Libéria, en Côte d'Ivoire, au Ghana, en Gambie, en Angola et en Namibie (John *et al.* 2004).

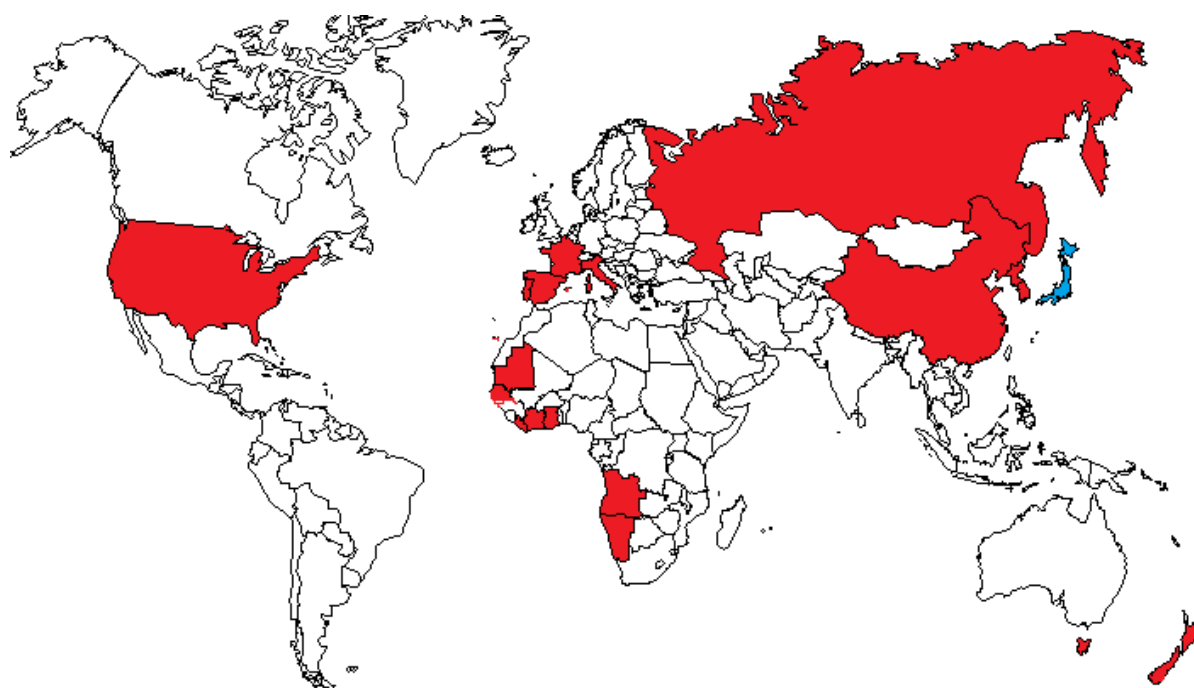


Figure 19. Pays de distribution naturelle (en bleu) et de prolifération ou d'invasion (en rouge) de *Grateloupia turuturu*.

2.5.1.3. Habitat et écologie

Grateloupia turuturu colonise les zones intertidales jusqu'au niveau moyen des basses mers de vives eaux (Figure 20). Elle est trouvée dans des cuvettes ou des chenaux où subsiste de l'eau de mer à marée basse ; elle semble mal supporter l'exondation. Elle se fixe sur des rochers, des cailloux ou encore des coquilles de bivalves.



Figure 20. *Grateloupia turuturu* (Yamada 1941) dans le milieu naturel.

2.5.1.4. Cycle de vie et reproduction

Grateloupia turuturu se reproduit en suivant un cycle trigénétique haplodiplophasique isomorphe constitué par les gamétophytes (haploïdes, produisant les gamètes mâles ou femelles haploïdes), le carposporophyte (diploïde, produisant les carpospores diploïdes) et le tétrasporophyte (diploïde, produisant les tétraspores haploïdes) (Figure 21).

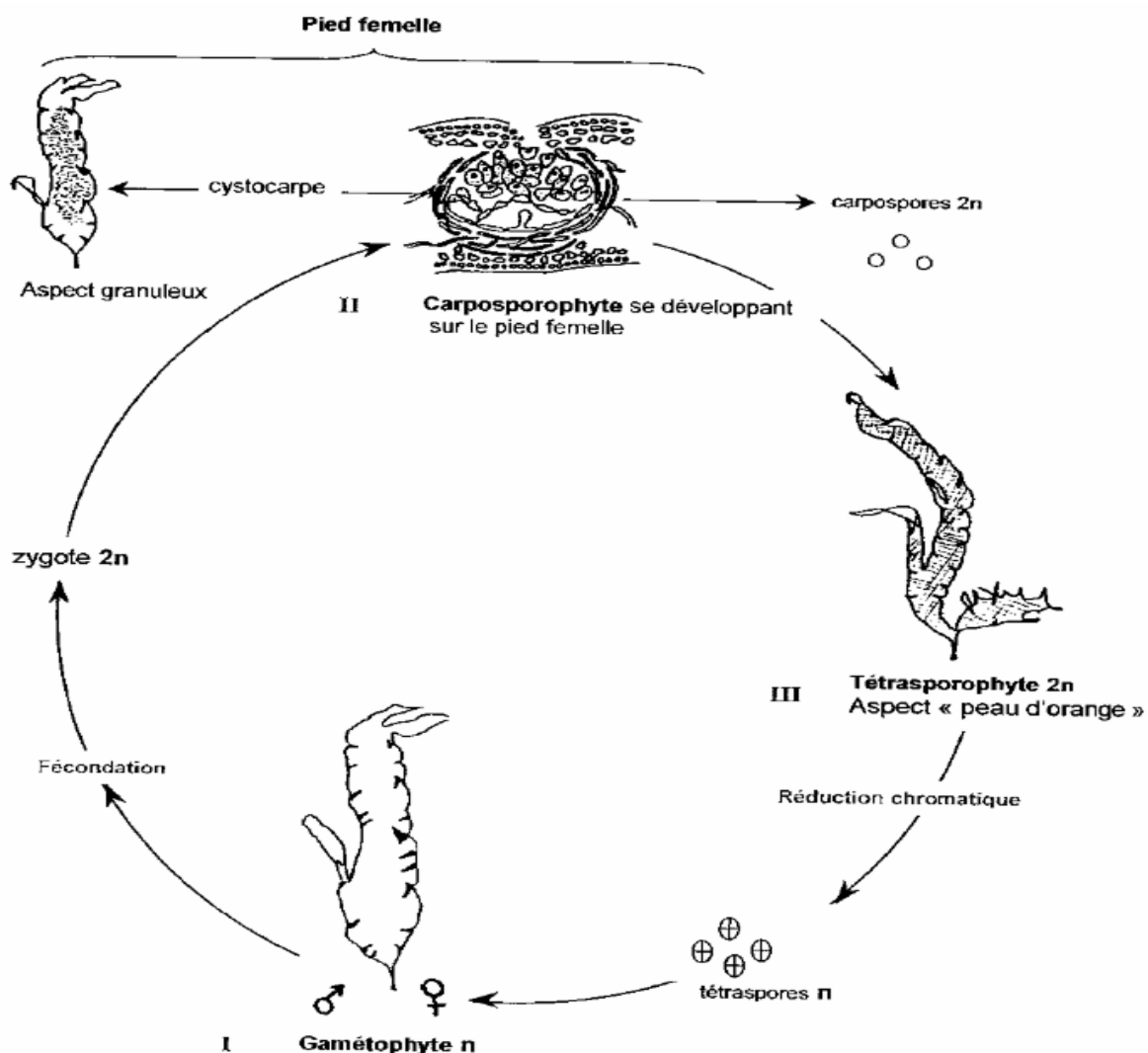


Figure 21. Cycle de reproduction de *Grateloupia turuturu*. D'après Simon-Colin (2001).

2.5.1.5. Valorisation

Grateloupia turuturu, bien que considérée proliférante (GIPBE-OBPNB 2011) et donc présentant potentiellement des biomasses importantes dans le milieu naturel, n'est que peu valorisée en France. Dans certains pays d'Asie d'où elle est originaire, cette algue est régulièrement consommée (Fujiwara-Arasaki *et al.* 1984). De par sa composition biochimique, elle constitue une source importante de carraghénane, de fibres, de

protéines et de pigments (en particulier la R-phycoérythrine) pouvant être valorisés dans les domaines de l'alimentaire, de la pharmaceutique, de la cosmétique et de l'aquaculture (Denis 2009). Cette macroalgue présente une composition biochimique plus stable au fil des saisons que *Palmaria palmata* (Galland-Irmouli *et al.* 1999; Denis 2009; Denis *et al.* 2010). Sa richesse en protéines et son faible contenu en lipides (respectivement 23 et 2,6% en masse sèche) sont comparables à ceux de *Palmaria palmata*. Sa composition correspond aux exigences alimentaires de l'ormeau européen qui se situent en dessous de 5% de lipides (Mai *et al.* 1995a), entre 24 et 34,5% de protéines (Mai *et al.* 1995b) combinés à un taux élevé en carbohydrates de 40 à 60% (Tableau 4 - Fleming *et al.* 1996; Thongrod *et al.* 2003).

Tableau 2. Composition biochimique de *Grateloupia turuturu* et exigences alimentaires de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata* (MS : matière sèche).

	Composition biochimique <i>Grateloupia turuturu</i>	Exigences alimentaires <i>Haliotis tuberculata</i>
Protéines	22.7 ± 2.7% MS	24-34,5% MS
Glucides	51.3 ± 4.1% MS	40-60% MS
Lipides	2.6 ± 0.2% MS	5% MS
Cendres	24.3 ± 0.8% MS	

Au cours des dernières années, diverses études sur *Grateloupia turuturu* ont pu mettre en évidence des activités biologiques de type biocide (Hellio *et al.* 2004; Plouguerné 2006), antiviral (Hudson *et al.* 1999), anticoagulant (Shanmugam et Mody 2000) et facteur de croissance (Cho *et al.* 1998). En aquaculture, elle a également montré une réponse inhibitrice de la croissance de la bactérie pathogène *Vibrio parahaemolyticus*

(Pang *et al.* 2006). Elle a été aussi utilisée comme aliment pour les ormeaux australiens en élevage *H. rubra* et *H. laegivata* (Mulvaney *et al.* 2013).

De nombreuses études se sont également intéressées aux métabolites de *Grateloupia turuturu*, mettant en évidence la présence de divers composés utilisés dans l'industrie pharmaceutique ou agroalimentaire : acide iséthionique et floridoside (un des composants principaux de *Grateloupia turuturu* - Hellio *et al.* 2004), L-citrullinyl-L-arginine (Miyazawa et Ito 1974), L-méthionine-L-sulfoxyde et N-méthylméthionine sulfoxyde (Miyazawa et Ito 1974). En 2008, onze composés de *G. turuturu* ont été isolés par des techniques chromatographiques et ensuite caractérisés par Résonance Magnétique Nucléaire (Li *et al.* 2008).

2.5.2. *Palmaria palmata*

2.5.2.1. Systématique et description

Palmaria palmata est une macroalgue rouge marine dont la taxonomie est la suivante :

Phylum :	Rhodophyta
Sous-phylum :	Eurhodophytina
Classe :	Florideophyceae
Sous-classe :	Nemaliophycidae
Ordre :	Palmariales
Famille :	Palmaraceae
Espèce :	<i>Palmaria palmata</i> Linné 1891



Figure 22. *Palmaria palmata* (Linné 1981) dans le milieu naturel.

Palmaria palmata présente un thalle plat généralement en forme de palme ou divisé d'une manière dichotomique (Figure 22). La morphologie peut être très variable en fonction des conditions environnementales. La texture des thalles est membraneuse ou coriace. Les frondes sont fixées au niveau de leur stipe court par un crampon discoïde, individuellement ou réunies en groupes sur le substrat. Les frondes matures peuvent atteindre une longueur maximale d'un mètre, la taille la plus commune étant de 50 cm. *Palmaria palmata* est une espèce vivace dont sa durée de vie maximale n'est pas connue ; une nouvelle croissance des frondes a lieu chaque année.

2.5.2.2. Répartition géographique

Palmaria palmata est une espèce des eaux tempérées froides de l'Atlantique Nord et du Pacifique Nord (Figure 23). Actuellement, elle est rencontrée dans les pays européens suivants : en Islande (Caram et Jónsson 1972), en Norvège (Husa *et al.* 2014), en Suède (Kylin 1944), en Irlande (Kraan et Guiry 2006), en Grande-Bretagne (Hardy et Guiry 2003), au Pays-Bas (Stegenga *et al.* 2007), en France (Valenzuela Miranda 2005; Kraan et Guiry 2006; Anon 2012), en Espagne (Bárbara *et al.* 2005; Valenzuela Miranda 2005; Kraan et Guiry 2006; Esteban *et al.* 2009), au Portugal (Araújo *et al.* 2009), aux Açores (Neto 1994) et aux Îles Canaries (Woelkerling *et al.*

1998). Elle est également présente dans le reste du monde : au Groenland (Pedersen 2011), au Canada (Lee 1980), aux Etats-Unis (Bates *et al.* 2005; Kraan et Guiry 2006; Corey *et al.* 2014), au Japon (Segawa 1981), en Corée (Lee et Kang 2001), en Inde (Sahoo 2001), aux Philippines (Silva *et al.* 1987), au Ghana (John *et al.* 2004), au Brésil (Taylor 1930) et aux Îles Galápagos (Ruiz et Ziemmeck 2011).



Figure 23. Pays de distribution de *Palmaria palmata* (en bleu).

2.5.2.3. Habitat et écologie

Palmaria palmata se développe dans la zone intertidale et subtidale peu profonde, jusqu'à 20 mètres de profondeur. Dans les eaux européennes, l'algue est une épiphyte fréquente sur les stipes de *Laminaria hyperborea* et de *Laminaria digitata* et

occasionnellement sur les Fucales (Figure 24). *Palmaria palmata* préfère le mode abrité au mode battu. Les frondes âgées de *Palmaria palmata* sont souvent couvertes par des bryozoaires et d'autres organismes épiphytes.



Figure 24. *Palmaria palmata* (Linné 1981) parmi d'autres macroalgues dans le milieu naturel.

2.5.2.4. Cycle de vie et reproduction

Palmaria palmata a un cycle de vie digénétique haplodiplophasique hétéromorphe. Elle a une phase sexuelle (gamétophytes) alternée avec une phase asexuée (tétrasporophytes). Les tétraspores se développent en gamétophytes mâles et femelles dans un rapport 1:1. Une caractéristique de ce cycle est la taille microscopique des gamétophytes femelles qui présentent une forme de disque pseudoparenchymateux. Après fécondation, le zygote formé se développe en un thalle qui recouvre le microscopique gamétophyte femelle et fabrique son propre système basal. Ce thalle dressé (interprété comme tétrasporophyte dans la nature) produit des tétraspores (Figure 25).

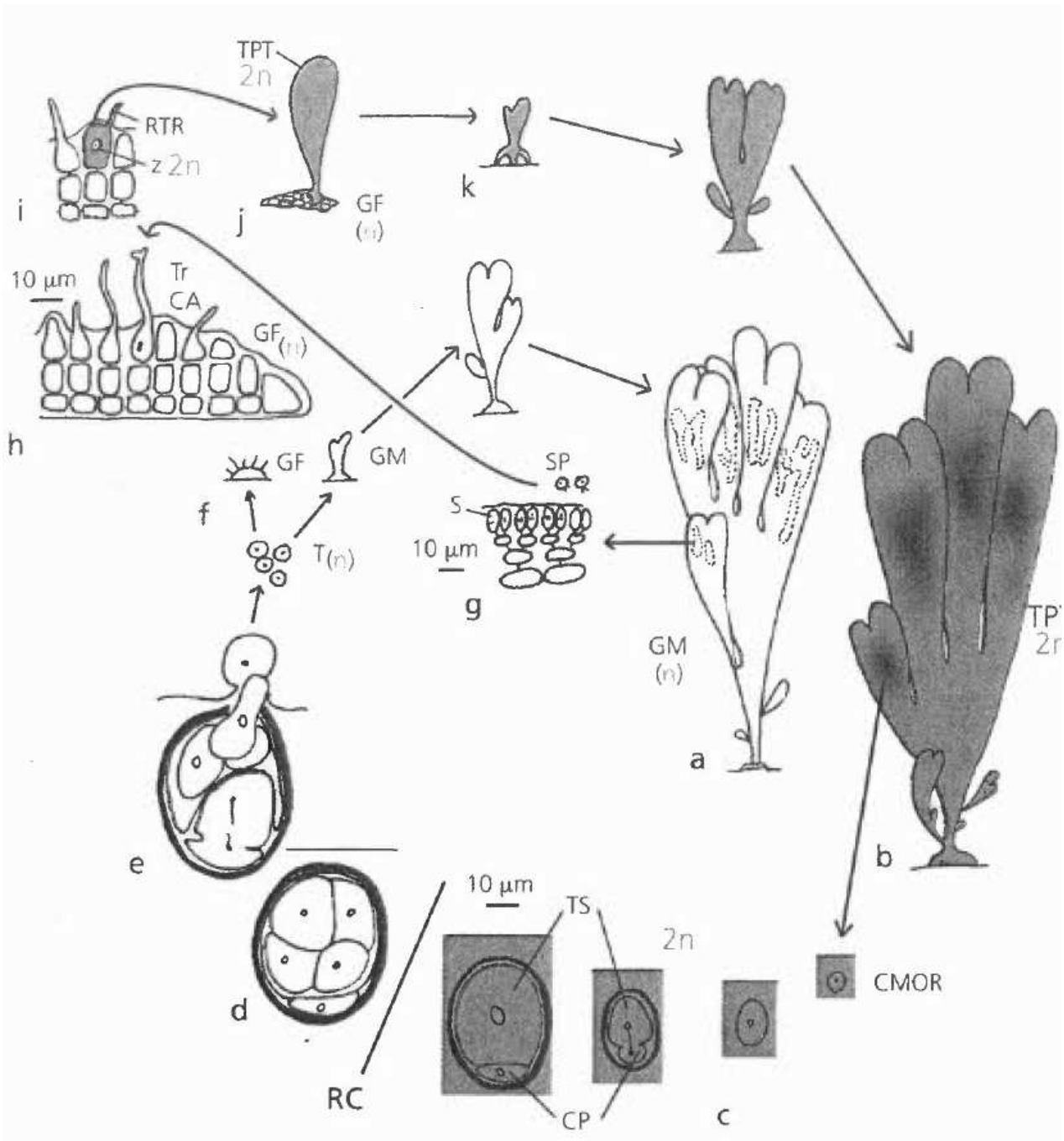


Figure 25. Cycle de reproduction de *Palmaria palmata*. D'après Van der Meer et Todd, (1980) et Magne, (1987). CA= carpogone, CMOR= cellule mère de l'organe reproducteur, Cp= celphyte femelle plus observable, GF= gamétophyte femelle, GM= gamétophyte male, RC= réduction chromatique, RTR= reste du trichogyne, T= tétraspores, TPT= thalle produisant des tétraspores, Tr= trichogyne et TS= tétrasporocyste.

2.5.2.5. Valorisation et applications

Palmaria palmata est depuis très longtemps utilisée comme légume de mer, sous le nom de dulse. La collecte de la dulse pour l'alimentation est bien connue en Irlande, en Norvège et en France ainsi que sur la côte est du Canada.

Palmaria fait partie des rares algues en Europe destinées à la consommation humaine de par sa composition biochimique (Morgan *et al.* 1980; Fleurence 1999). Au cours des dernières années, l'intérêt du grand public pour la santé, la recherche de nouvelles sources de protéines pour l'alimentation animale et de nouveaux composés bioactifs ont conduit à de nouvelles études du contenu biochimique des algues. Des nouvelles applications ont été développées dans les domaines de la santé, des compléments alimentaires, des produits cosmétiques et des applications médicales (Indergaard et Minsaas 1991; Holdt et Kraan 2011). La teneur en protéines relativement élevée de *Palmaria palmata* est en adéquation avec les exigences alimentaires humaines et animales (Table 3 - Mabeau et Fleurence 1993; Fleurence *et al.* 2012). Celle-ci peut même être augmentée lorsque *Palmaria* est cultivée en aquaculture intégrée, par exemple dans des élevages d'ormeaux (Demetropoulos et Langdon 2004). En aquaculture, *Palmaria palmata* est aussi connue pour faire partie des meilleures espèces d'algues appropriées pour la croissance de l'ormeau (Evans et Langdon 2000) ou le développement des gonades de l'oursin (Vadas *et al.* 2000). La teneur relativement élevée en protéines de *P. palmata* (20-25% de la masse sèche) peut être comparée à d'autres aliments riches en protéines comme la viande bovine (25%), le saumon (20%) ou le soja (30%). *Palmaria* est aussi une source précieuse de vitamines et de minéraux ainsi que d'antioxydants. Cependant, la composition biochimique varie selon la saison et la localisation (Rødde *et al.* 2004).

Tableau 3. Exemple de composition biochimique de *Palmaria palmata* (MS : matière sèche).

Protéines	16.2 ± 1.7% MS
Glucides	63.4 ± 7.4% MS
Lipides	2.0 ± 0.3% MS
Cendres	27.2 ± 0.4% MS

Des études ont mis en évidence des activités biologiques de type antioxydant (Yuan *et al.* 2005) et biocides (Hellio *et al.* 2001; Cox *et al.* 2010) à partir de molécules et d'extraits de cette algue.

3. Présentation de la famille des Vibrionaceae

3.1. Historique sur les vibrions

En 1854, le médecin italien Filippo Pacini décrivit le premier *Vibrio*, à savoir *Vibrio cholerae* (agent causal du choléra), pendant qu'il étudiait une épidémie de cette maladie à Florence (Pacini 1854). Mais c'est Koch qui a démontré en 1884 que cette espèce est bien à l'origine du choléra (Howard-Jones 1984).

En 1951, lors d'une épidémie d'intoxication alimentaire dans la province d'Osaka pendant laquelle 272 personnes ont été touchées et 20 décédées, des chercheurs japonais ont identifié pour la première fois *Vibrio parahaemolyticus* dans des sardines partiellement séchée appelée « Shirasu » (Fujino 1951). De nombreuses intoxications alimentaires ont ensuite pu être reliées à cette bactérie aux États-Unis, en Europe et en Asie. Ce n'est qu'en 1969 que ce microorganisme fut considéré comme un problème de santé publique. Depuis, il est de plus en plus mis en cause lors des épidémies d'infections gastro-intestinales associées à la consommation de mollusques crus ou insuffisamment cuits (Kaysner et DePaola 2001).

Les dernières études sur la phylogénie du genre *Vibrio* ont permis de différencier 118 espèces dans cette famille des Vibrionaceae. Les bactéries de ce genre sont courtes, courbes ou légèrement courbes, mesurant entre 0,5 et 0,8 microns de largeur et entre 1,4 et 2,6 microns de longueur. Parmi celles-ci, onze sont pathogènes pour l'homme : *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. hollisae*, *V. fluviales*, *V. furnissii*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. metschnikovii* et *V. cincinnatiensis* (Euzéby 1997). Les infections causées par ces organismes entraînent chez les patients des symptômes allant de la gastro-entérite à la septicémie en passant par des éruptions cutanées, conduisant parfois à la mort chez les patients immunodéprimés (Rowe-Magnus *et al.* 2006).

En aquaculture, la production intensive dans des systèmes artificiels facilite la prolifération de ces bactéries pathogènes (Huchette *et al.* 2003; Travers *et al.* 2009). Les élevages constituent ainsi des réservoirs de vibrions. Le développement de la maladie est le résultat de l'interaction entre l'agent pathogène, l'environnement et l'hôte. Les infections causées par différentes espèces de *Vibrio* sont l'un des problèmes les plus importants dans les élevages aquacoles, causant des taux de mortalité élevés ainsi que des pertes économiques très importantes (Huchette et Clavier 2004). Les maladies bactériennes sont ainsi un obstacle majeur qui peut conduire à une réduction de la valeur marchande du produit et réduire la rentabilité des cultures. La plupart des vibrions qui causent ces infections sont des pathogènes opportunistes et exigent que l'hôte soit prédisposé au stress pour pouvoir exprimer leur pathogénicité. C'est le cas par exemple de *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus* et *V. splendidus* (Brock et Lightner 1990). Cependant, certaines espèces ou souches de *Vibrio* ont été identifiées comme des agents pathogènes primaires (Lavilla-Pitogo *et al.* 1990; Harris et Owens 1999).

De nombreux cas de vibriose affectant ce secteur ont été décrits dans la littérature depuis des décennies. Par exemple, *Vibrio tapetis* a été décrit comme le responsable

de la maladie de l'anneau brun qui affecte la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* (Figure 25 - Paillard 2004a; Flye-Sainte-Marie *et al.* 2007).



Figure 26. Vue interne d'une palourde atteinte par la maladie de l'anneau brun. D'après <http://sfbtm.univ-littoral.fr>.

En Espagne, *V. alginolyticus* et *V. splendidus* ont été associés à la mortalité des larves et des juvéniles de la palourde commune *Ruditapes decussatus* (Gómez-León *et al.* 2005). En Bretagne, *V. splendidus* a été rapporté comme l'agent causal des mortalités survenues chez l'huître japonaise *Crassostrea gigas* (Lacoste *et al.* 2001). Chez les poissons sauvages ou élevés en ferme, plusieurs vibrions ont été associés à des maladies : *V. trachurii* chez le maquereau (Iwamoto *et al.* 1995), *V. ichthyoenteri* chez les larves de flet (Ishimaru *et al.* 1996), ainsi que *V. tapetis* chez la crénilabre mélops (Jensen *et al.* 2003) et chez le flétan de l'Atlantique (Reid *et al.* 2003).

Chez la famille des *Haliotidae*, de nombreuses études ont permis d'isoler et de caractériser différentes espèces responsables de fortes mortalités, notamment : *V. alginolyticus* et *V. parahaemolyticus* chez *H. diversicolor supertexta* et *H. rufescens* (Liu *et al.* 2000; Cai *et al.* 2007), *V. splendidus* chez *H. rubra* et *H. laevigata* (Dang *et al.* 2011) et *V. harveyi* chez *H. rubra*, *H. laevigata*, *H. diversicolor supertexta*, *H.*

tuberculata et *H. discus hannai* (Sawabe *et al.* 2007; Travers *et al.* 2008b; Dang *et al.* 2011; Jiang *et al.* 2013)

3.2. Écologie du genre *Vibrio*

Les vibrions regroupent beaucoup de bactéries marines hétérotrophes, protéolytiques, mésophiles et généralement mobiles grâce à un flagelle polaire (Thompson *et al.* 2004). Leur distribution et leur dynamique sont influencées par des facteurs environnementaux tels la température, la salinité, le pH et la disponibilité des nutriments ainsi que par des facteurs biotiques telles la prédation et l'abondance des hôtes (Thompson et Polz 2006). À cet égard, diverses études conduites dans des écosystèmes estuariens et côtiers à travers le monde ont montré que la température et la salinité jouent un rôle important dans le développement de ces bactéries (Travers *et al.* 2009; Baker-Austin *et al.* 2013). Les vibrions tolèrent une large gamme de salinité, bien que leur besoins optimaux en NaCl se situent généralement entre 20 et 25‰ (masse/volume). Cependant des espèces non halophiles comme *V. cholerae*, *V. mimicus* et *V. hispanicus* peuvent se développer dans un milieu avec une faible concentration en NaCl (Gomez-Gil *et al.* 2004). En ce qui concerne les exigences de température, la plupart des vibrions se développent à des températures optimales comprises entre 18 et 22 °C (Thompson *et al.* 2004). Pour le pH, la plupart des espèces préfèrent une gamme allant de 7 à 8 (Raguénès *et al.* 1997), certaines tolérant un pH à 10 (Baumann *et al.* 1984). Les vibrions présentent des formes planctoniques (Worden *et al.* 2006), benthiques pouvant développer des biofilms (Azandegbe 2010) et épibiontes (Heidelberg *et al.* 2002). Différentes études ont montré leur importance dans les écosystèmes marins (Thompson et Polz 2006).

Les vibrions sont des bactéries Gram-négatives, aéro-anaérobies facultatives et chimio-organotrophes. Ces bactéries sont oxydase positives et réduisent les nitrates en nitrites. La plupart fermentent des sucres tels le glucose, le fructose ou le maltose

en générant divers acides au cours de la fermentation tels l'acide formique, lactique, acétique, succinique et pyruvique (Baumann *et al.* 1984).

3.3. Le modèle d'étude *Vibrio harveyi*

Vibrio harveyi Bauman 1981 est une bactérie appartenant à l'embranchement des Protobacteria, à la classe des Gammaprotobacteria, à l'ordre des Vibrionales et à la famille des Vibrionaceae (Figure 27). Elle a été antérieurement connue sous les noms de *Achromobacter harveyi*, *Lucibacterium harveyi*, *Beneckea Harveyi* et *Vibrio carchariae* (Johnson et Shunk 1936; Gauger et Gomez-Chiarri 2002; Farmer et Hickman-Brenner 2006).

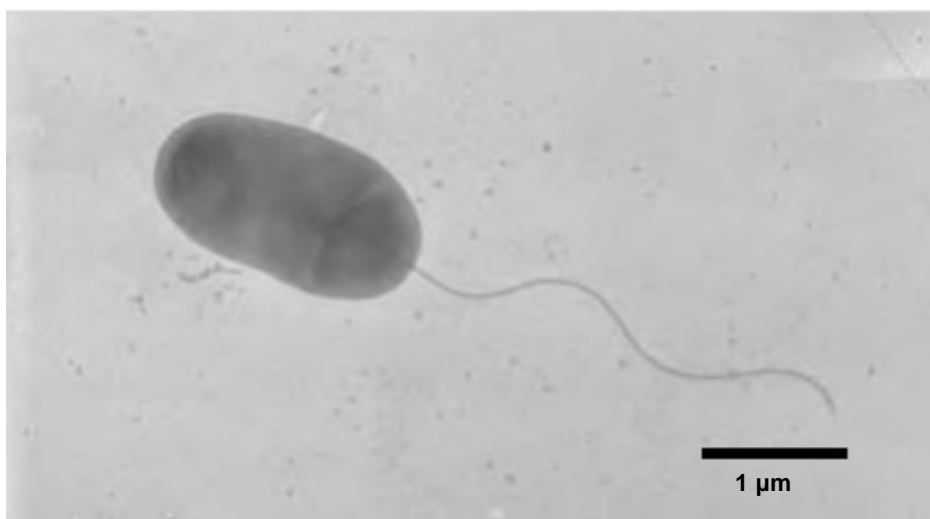


Figure 27. *Vibrio harveyi* souche ORM4 en microscopie électronique à transmission. D'après Travers (2008).

Vibrio harveyi est une bactérie libre qui ne forme pas de relation symbiotique. C'est un agent pathogène commun à nombreux organismes marins. *V. harveyi* a été isolé dans différentes zones géographiques à travers le monde (Austin et Zhang 2006). Il vit principalement dans les eaux chaudes et les sédiments marins mais il peut également être associé à du zooplancton ou des microalgues. Un grand nombre de souches de cette espèce sont bioluminescentes, pouvant induire la maladie lumineuse chez la

crevette géante tigrée *Penaeus monodon*, mais celles affectant les ormeaux ne présentent pas cette caractéristique (Figure 27 - Dworkin et Falkow 2006).

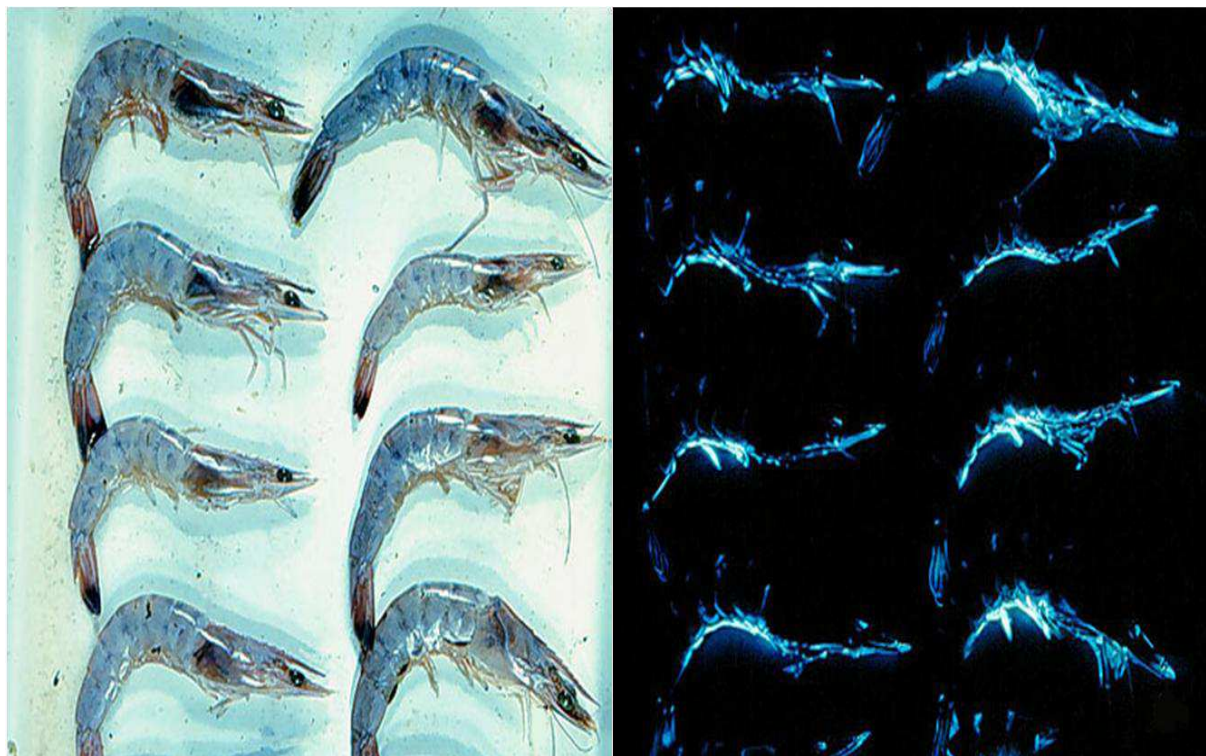


Figure 28. Maladie lumineuse chez la crevette géante tigrée *Penaeus monodon* causée par *V. harveyi*. D'après Defoirdt (2007).

Avec le développement rapide de l'aquaculture dans le monde entier, les maladies causées par *V. harveyi* font de plus en plus l'objet de recherches. Cette bactérie est responsable de nombreuses mortalités autant chez les vertébrés que chez les invertébrés. Chez les crustacées, elle a été responsable de 45 à 80% des mortalités chez l'artémie *Artemia franciscana* (Soto-Rodriguez *et al.* 2003), 85% chez la crevette à pattes blanches *Litopenaeus vannamei* (Aguirre-Guzmán *et al.* 2004) et 75% chez le homard *Jasus verreauxi* (Diggles *et al.* 2000). Chez les poissons, *V. harveyi* a été reporté aussi comme l'agent causal des gastroentérites suivies de mortalités massives chez le cobia *Rachycentron canadum* (Liu *et al.* 2004), le mérrou à tâches oranges *Epinephelus coioides* (Lee *et al.* 2002) ou le tambour rouge *Sciaenops ocellatus* (Liu *et*

al. 2003), ainsi que de très importantes mortalités chez les saumons et les hippocampes (Zhang et Austin 2000; Alcaide *et al.* 2001). En ce qui concerne les mollusques, cette bactérie est spécialement connue à cause des maladies induites chez la famille des *Haliotidae*, comme c'est le cas chez *H. discus hanai*, *H. diversicolor* et *H. tuberculata* (Nishimori *et al.* 1998; Sawabe *et al.* 2007).

3.4. La vibriose chez *Haliotis tuberculata*

3.4.1. Apparition et étiologie

En 1999, suite à l'apparition de mortalités massives estivales en Bretagne, une bactérie pathogène a pu être isolée dans l'hémolymphe d'*Haliotis tuberculata*. Par caractérisation génétique et phénotypique, cette bactérie a été décrite comme appartenant au genre *Vibrio* et à l'espèce *carchariae* synonyme de *V. harveyi* (Nicolas *et al.* 2002). Les mortalités associées à *V. harveyi* sont fortement corrélées aux températures estivales locales supérieures à 16,5 °C (Huchette et Clavier 2004). La température joue un rôle très important sur la croissance de *V. harveyi*, (optimale à 28 °C) et aussi indirectement sur l'immunité des mollusques (Cheng *et al.* 2004; Paillard *et al.* 2004b; Austin et Zhang 2006) .

Les ormeaux affectés par la vibriose présentent des pustules blanches sur le pied, mais le principal **symptôme** de cette maladie s'observe dans l'hémolymphe des individus moribonds où apparaît une couleur jaune-marron liée à la forte concentration en bactéries pouvant atteindre jusqu'à 10^9 UFC.mL⁻¹ et à une modification chimique de l'hémocyanine (qui confère normalement une couleur bleue - Travers *et al.* 2008a). De plus, ces symptômes peuvent s'accompagner d'une dégradation tissulaire des branchies (

Figure 29).

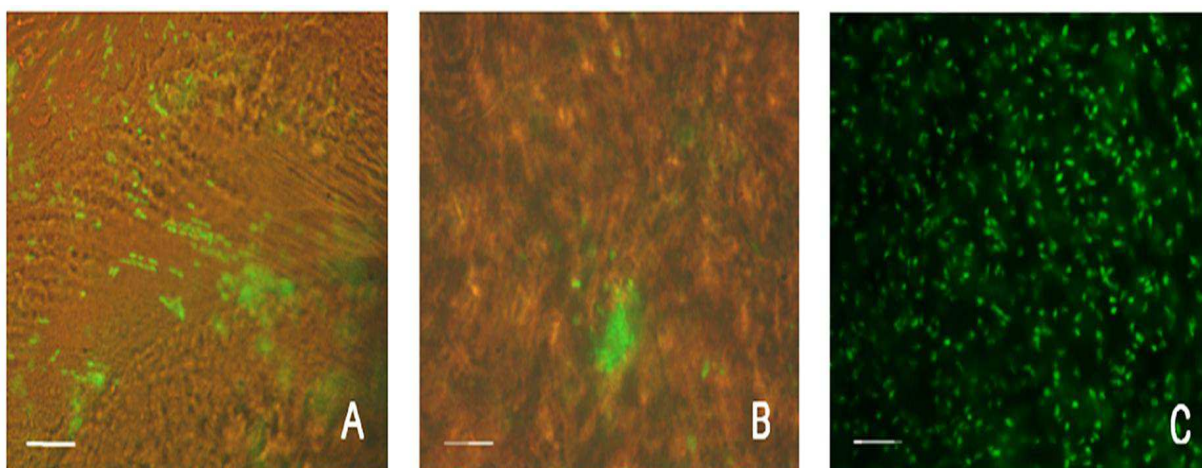


Figure 29. Observations microscopiques de tissus d'ormeaux moribonds, infectés par la souche ORM4-GFP de *V. harveyi* (Travers et al., 2008).

A : Insertion de bactéries dans les sillons des filaments branchiaux,

B : Amas bactériens dans le muscle pédieux,

C : Forte quantité de bactéries dans l'hémolymphe caractéristique d'un cas de septicémie.

3.4.2. Distribution géographique

La vibriose est présente sur toute la Côte Atlantique européenne, touchant uniquement *Haliotis tuberculata tuberculata*. À l'heure actuelle, aucun cas n'a été recensé chez les deux autres sous-espèces européennes, *Haliotis tuberculata coccinea* (Îles Canaries) et *Haliotis tuberculata lamellosa* (Méditerranée). En France, cette maladie a été identifiée en 1997 sur la côte sud de la Bretagne près de Concarneau. Elle s'est ensuite propagée vers le nord de la Bretagne (en 1998) et la côte ouest de la Normandie (Golfe de Saint-Malo en 1999). C'est à cette période qu'ont été constatées les premières mortalités en élevage en Normandie (Huchette et Clavier 2004). Depuis, cette maladie cause fréquemment de fortes mortalités dans les populations naturelles, affaiblissant les stocks (Huchette et Clavier 2004), ainsi que dans les élevages, et reste une menace pour le développement de la filière halioticole.



Chapitre II

**Étude comparative de l'intérêt nutritionnel
de deux macroalgues rouges, *Grateloupia
turuturu* et *Palmaria palmata* pour la
croissance de l'ormeau européen, *Haliotis
tuberculata tuberculata***

CHAPITRE II : Étude comparative de l'intérêt nutritionnel de deux macroalgues rouges, *Grateloupia turuturu* et *Palmaria palmata* pour la croissance de l'ormeau européen, *Haliotis tuberculata tuberculata*.

1. Contexte de l'étude

La conchyliculture à l'échelle nationale est largement dominée par la production ostréicole. Les événements incontrôlables de mortalités massives qui ont touché l'huître japonaise *Crassostrea gigas* ces dernières années ont ainsi fragilisé tout un pan de l'économie française. Une solution durable d'évitement de ce type de crise demeure la diversification des productions conchylicoles (Girard *et al.* 2005). Une des espèces de mollusques élevées en France est l'ormeau européen *Haliotis tuberculata tuberculata*. Ce gastéropode brouteur de macroalgues apparaît comme un candidat potentiel pour la diversification des activités conchylicoles. En effet, le développement de la filière halioticoles est freiné par la croissance lente de l'espèce qui complique la réussite économique des entreprises (Huchette et Clavier 2004). La macroalgue rouge exotique *Grateloupia turuturu*, originaire du Japon, en pleine expansion sur les côtes de la Bretagne et des Pays de la Loire, montre des caractéristiques (composition biochimique, biomasse disponible) intéressantes qui pourraient améliorer significativement la croissance des ormeaux et diminuer les dépenses des entreprises liées à la récolte de macroalgues.

Après près de 40 années de recherche sur les aliments artificiels et naturels, l'alimentation des ormeaux en élevage est toujours un défi (Fleming *et al.* 1996; Kirkendale *et al.* 2010; Mulvaney *et al.* 2013). De très nombreuses études sur différentes espèces d'ormeaux ont comparé la survie, les taux de croissance et parfois la qualité du produit final, obtenus avec différentes macroalgues, principalement dans

les genres *Laminaria*, *Ulva*, *Gracilaria*, *Sargassum* et *Palmaria* (Mai *et al.* 1996; Shpigel *et al.* 1999; Demetropoulos et Langdon 2004; Taylor et Tsvetnenko 2004; Viera *et al.* 2005; Alcantara et Noro 2006; Qi *et al.* 2010). Les réponses d'une même espèce à différents régimes varient selon les propriétés physiques et la composition chimique de l'alimentation (Mai *et al.* 1995a). Cela est particulièrement important étant donné que la composition chimique et la texture des algues dépendent de l'espèce mais varient aussi au sein d'une même espèce avec la zone géographique, la saison ou les conditions environnementales (Ito et Hori 1989).

Dans cette étude, les macroalgues rouges *Grateloupia turuturu* et *Palmaria palmata*, ont été testées pendant cinq mois comme aliments pour l'orveau européen *Haliotis tuberculata tuberculata*. Les orveaux ont été nourris *ad libitum* avec trois régimes alimentaires : 1) *Palmaria palmata*, 2) *Grateloupia turuturu* et 3) un régime mixte de *Palmaria palmata* et *Grateloupia turuturu* (1:1). L'intérêt nutritionnel a été évalué en suivant à chaque nourrissage la mortalité et mensuellement la croissance des orveaux par des mesures biométriques (longueur, largeur, masse). La composition biochimique (protéines, glucides, lipides et cendres) du produit final (orveaux en fin d'expérimentation) ainsi que des algues utilisées comme aliments a été mesurée. La consommation des algues par les différents lots d'orveaux a été estimée à chaque nourrissage.

L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'un article scientifique soumis pour publication dans la revue *Aquaculture*.

CAPÍTULO II: Estudio comparativo del interés nutricional de dos macroalgas rojas, Grateloupia turuturu y Palmaria palmata, para el crecimiento de la oreja de mar europea, Haliotis tuberculata tuberculata.

1. Contexto del estudio

La conchicultura a escala nacional esta predominantemente dominada por la producción ostrícola. Las apariciones incontrolables de mortandades masivas que han afectado a la ostra japonesa Crassostrea gigas durante los últimos años han mermado una buena parte de la economía francesa. Una solución sostenible para evitar este tipo de crisis podría ser la diversificación de la producción acuícola (Girard et al. 2005). Una de las especies de moluscos criados en Francia es la oreja de mar europea Haliotis tuberculata tuberculata. Este gasterópodo ramoneador de macroalgas resulta ser un potencial candidato para la diversificación de las actividades productivas de moluscos. Sin embargo, el desarrollo de la acuicultura de la oreja de mar se ve obstaculizado por un crecimiento lento de la especie, lo cual complica la rentabilidad de la actividad para las empresas (Huchette et Clavier 2004). La macroalga roja exótica Grateloupia turuturu, original de Japón y en plena expansión en las costas Bretonas y en la región Países del Loira, muestra características (composición bioquímica, biomasa disponible) interesantes que podrían mejorar significativamente el crecimiento de la oreja de mar y disminuir la inversión necesaria para la recolección de algas por parte de las empresas.

Tras cerca de 40 años de investigación sobre los alimentos artificiales y naturales, la alimentación de la oreja de mar criada en cautividad es, todavía hoy, un desafío (Fleming et al. 1996; Kirkendale et al. 2010; Mulvaney et al. 2013). Numerosos

estudios sobre diferentes especies de este molusco han comparado la supervivencia, la tasa de crecimiento y en ocasiones la calidad del producto final, obtenidos con distintas especies de macroalgas, principalmente de los géneros Laminaria, Ulva, Gracilaria, Sargassum o Palmaria (Mai et al. 1996; Shpigel et al. 1999; Demetropoulos et Langdon 2004; Taylor et Tsvetnenko 2004; Viera et al. 2005; Alcantara et Noro 2006; Qi et al. 2010). Las respuestas de una misma especie a diferentes regímenes varían según las propiedades físicas y la composición química de la alimentación (Mai et al. 1995a). Esto es particularmente importante teniendo en cuenta que la composición química y la textura de las algas dependen de la especie, pero que pueden darse variaciones dentro de una misma especie debido a la diferencia de hábitat, la zona geográfica, la estación del año o las condiciones ambientales (Ito et Hori 1989).

En el presente estudio, las macroalgas rojas Grateloupia turuturu y Palmaria palmata han sido probadas durante cinco meses como alimento para la oreja de mar europea Haliotis tuberculata tuberculata. Los individuos fueron alimentados *ad libitum* mediante tres dietas diferentes: 1) Palmaria palmata, 2) Grateloupia turuturu y 3) dieta mixta de Palmaria palmata y Grateloupia turuturu (1:1). El interés nutricional fue evaluado mensualmente siguiendo para cada lote la mortalidad y el crecimiento de los individuos mediante medidas biométricas (longitud, anchura, peso). La composición bioquímica (proteínas, glúcidos, lípidos y cenizas) del producto final (el molusco tras finalizar el ensayo), así como el de las algas utilizadas como alimento, ha sido analizada. El consumo de algas por parte de los diferentes lotes de orejas de mar se estimó cada vez que distribuía nuevo alimento.

El conjunto de este trabajo ha sido objeto de un artículo científico enviado para su publicación a la revista *Aquaculture*.

2. Comparison of the nutritional value of two red macroalgae, the introduced *Grateloupia turuturu* and the native *Palmaria palmata*, for the European abalone *Haliotis tuberculata*

Nuria García-Bueno, Vincent Turpin, Bruno Cognie, Justine Dumay, Michèle Morançais, Mireille Amat, Jean-Marie Pédrón, Arnaldo Marín Atucha, Joël Fleurence, Priscilla Decottignies.

2.1. Abstract

The suitability of two red algae species, *Grateloupia turuturu* and *Palmaria palmata*, as feed for the culture of the European abalone *H. tuberculata*, was evaluated over a 5-month period. Three experimental diets were tested: 1) *Palmaria palmata*, 2) *Grateloupia turuturu* and 3) a mixed diet of *Palmaria palmata* and *Grateloupia turuturu* (1:1). Biochemical composition (proteins, carbohydrates, lipids, ashes) of algae was measured. No mortality was observed during the time of the experiment in any of the treatments. Growth in length and weight was highest for abalones fed with *P. palmata* and the mixed diet. Abalones exhibited a preference for *P. palmata* and showed the highest weight gain with this macroalgae ($107.8 \pm 7.2\%$). *G. turuturu* was fast in desintegrating in abalone rearing conditions and was not suitable for good growth of *H. tuberculata* in a monospecific diet.

Keywords: Aquaculture, Experimental diets, Feeding, *Haliotis*, Nutrition, Seaweeds

2.2. Introduction

Abalones are of great commercial value (Shepherd et Steinberg 1992). Their high nutritional value, the flavor of their flesh and the originality of their perforated shell lined with mother-of-pearl make of them a highly desirable food, particularly in Asia. Facing the ever increasing demand for this product and the simultaneous overfishing of wild stocks, the rearing of abalone has grown greatly over the last 25 years (Gordon et Cook 2001). The main obstacle for the production and the economic success of this product is its slow and variable growth rate (Shepherd et Steinberg 1992). *Haliotis* species need between 3 to 4 years to reach market size (Shpigel *et al.* 1996; Demetropoulos et Langdon 2004). Abalone growth in the wild is very variable depending on season, food availability, population densities, temperature and stress (Huchette *et al.* 2003; Saunders *et al.* 2008). The growth of reared abalones, however, is greatly influenced by certain factors linked to the culture system such as water quality, tanks used, abalone density, quantity and quality of feed (Mgaya et Mercer 1995; Fleming et Hone 1996; Troell *et al.* 2006). Feed ranks high in the economic viability of abalone farms (Fleming et Hone 1996; Shpigel *et al.* 1999). After nearly 40 years of research on formulated and natural feeds, the feeding of reared abalones is always a challenge (Fleming *et al.* 1996; Kirkendale *et al.* 2010; Mulvaney *et al.* 2013). This is the case in Europe where the annual production of the European abalone, *Haliotis tuberculata* Linnaeus 1758, remains anecdotal (around 10 tons for the last 3 years - FAO 2014), nutrition being among the main technical problems encountered by abalone growers. The harvesting of macroalgae which are known to deliver suitable growth rates and condition in abalone is costly and quantitatively limited (Huchette pers. comm.). The use of an introduced proliferative macroalgae available most of the year in high quantities could be a cost-effective solution for the development of abalone aquaculture in Europe. In France, this would help to diversify aquaculture which is currently largely dominated by oyster production and which is facing today severe

financial difficulties in a context of mass mortalities of oysters (Segarra *et al.* 2010; Petton *et al.* 2013)

Food preferences differ between abalone species and are linked to the available food in their natural habitats (Dunstan *et al.* 1996). Numerous studies on different abalone species have compared survival and growth rates obtained with various macroalgae, mainly in the genera *Laminaria*, *Ulva*, *Gracilaria*, *Sargassum* and *Palmaria* (Mai *et al.* 1996; Shpigel *et al.* 1999; Demetropoulos et Langdon 2004; Taylor et Tsvetnenko 2004; Viera *et al.* 2005; Alcantara et Noro 2006; Qi *et al.* 2010). Different abalone species fed identical diets have shown variable growth rates due to differences in nutritional requirements (Taylor et Tsvetnenko 2004). Mai *et al.* (1995a) also showed that responses of a same species to different diets vary according to the physical properties and chemical composition of diets. This is particularly important given that the chemical composition of algae varies with species, geographic area, season or environmental conditions (Ito et Hori 1989).

An invasive red algae native of Japan has shown considerable expansion along the French Atlantic coast (Simon *et al.* 2001). This species, *Grateloupia turuturu* Yamada 1941, constitutes an important resource which has not yet been exploited. A recent study has shown that this macroalgae, sampled on the French Atlantic coast, was rich in total proteins and had a low total lipids content, respectively 23.0 and 2.6% dry weight (Denis *et al.* 2010), comparable to those of *Palmaria palmata* Linnaeus 1805. The latter allows a higher growth rate of the European abalone *Haliotis tubercala* when compared to other macroalgae or artificial feeds (Mercer *et al.* 1993; Mai *et al.* 1995b; Basuyaux 1997). The biochemical composition of *G. turuturu* seems to match the food requirements of the European abalone which, in dry weight, are below 5% lipids (Mai *et al.* 1995a), between 24 and 34.5% proteins (Mai *et al.* 1995b), combined with a high level of carbohydrates of 40 to 60% (Fleming et Hone 1996; Thongrod *et al.* 2003).

Furthermore, its biochemical composition appears to be seasonally more stable than in *P. palmata* (Denis *et al.* 2010). Mulvaney *et al.* (2013) showed that *G. turuturu* provided good growth rates of juvenile abalone in *Haliotis rubra* and *Haliotis laevigata*.

The aim of this study was to estimate the suitability of *G. turuturu* as food for the abalone *H. tuberculata*. Consumption, growth and eventual mortality of *Haliotis tuberculata* fed with two species of red seaweeds *P. palmata* and *G. turuturu* were compared.

2.3. Materials and methods

2.3.1. Experimental culture conditions

The study was conducted between May 15 and October 15 2010, in a shellfish farm in Le Croisic (47°17'38" N 2°30'33" W), a seaside town in the northwest of France. Four 300 L polygonal tanks designed for abalone aquaculture containing PEHD (high density polyethylene) plastic cages (50x50x5 cm) were used. Tanks were provided with sand-filtered and UV treated seawater and were aerated. The experiment was conducted in the dark and light was only used during feedings and measurements. Water temperature was measured daily and varied from 13.2 to 19.0 °C during the time of the experiment.

2.3.2. Experimental animals and diets

Two hundred and seventy abalones *Haliotis tuberculata* (\approx 2 years old) with an initial shell length of 42.6 ± 1.7 mm (mean \pm standard deviation) and an initial body weight of 11.3 ± 1.5 g (mean \pm standard deviation) were purchased from the abalone Labadie hatchery/farm in Bouin (France). In the hatchery, abalones were fed with a mixture of fresh macroalgae (e.g. *Ulva spp.*, *Laminaria spp.*, *Palmaria palmata*). Thirty abalones were randomly assigned to each triplicate of three dietary treatments. They were fed with three experimental diets consisting of: a) *P. palmata*, b) *G. turuturu* and c) a

mixture of *P. palmaria* and *G. turuturu* with a mass ratio of 1:1. These seaweeds were harvested every 3 days at Batz-sur-mer (47°16'34.82" N 2°29'36.64" O; Atlantic Coast, France). Immediately after each harvest, abalones were fed with those freshly picked seaweeds *ad libitum* to guarantee good feeding.

2.3.3. Algal consumption of abalones and growth

Seaweeds were weighed before being distributed. When uneaten algae were left at the next feeding time, it was weighed again and the difference enabled to estimate what had been ingested by the abalones. For the mixed diet, each species was weighed separately. Six plastic cages containing algae without abalone were used as controls. During the experiment, a degradation of *G. turuturu* was observed (cf. Results), so only the consumption of *P. palmata* could be estimated.

Shell length (L) and body weight (W) of each abalone were measured twice a month.

The following physiological variables were calculated for all treatments:

$$\Delta L (\mu\text{m}\cdot\text{d}^{-1}) = (L_t - L_i) / d$$

$$\text{SGR } (\%\cdot\text{d}^{-1}) = 100 [(\ln W_t - \ln W_i) / d]$$

$$\text{Weight gain } (\%) = 100 [(W_t - W_i) / W_i]$$

$$\text{Survival } (\%) = 100 (n_t / n_i)$$

where ΔL is the length difference, L_i is the initial shell length (mm), L_t is the shell length (mm) at time t, d is duration of experiment in days, n_i and n_t are respectively initial and final numbers of abalones, SGR is the specific growth rate, W_i is the initial body weight (g), W_t is the body weight (g) at time t.

2.3.4. Biochemical analysis

Once a month, certain thalli were set aside, cleaned of epibionts, rinsed successively with seawater, tap water then distilled water and frozen at -20 °C. At the end of the

experimentation, five abalones from each triplicate of the 3 dietary treatments were also frozen at -20 °C. All seaweed and abalone samples were freeze-dried and grounded into a powder with liquid nitrogen before being homogenized with phosphate buffer (20 mM; pH 7.1). The suspensions were then centrifuged (25000 g, 20 min, 4 °C). The resulting supernatants were the aqueous crude extract (CE) containing all the water-soluble compounds. Each sample was analyzed in triplicate for the biochemical analysis. Water-soluble proteins in the CE were analyzed following the method of Bradford and total protein content was estimated by multiplying the nitrogen content quantified by the Kjeldhal method, by a factor of 6.25 (Miller et Miller 1948; Bradford 1976). Total lipids were extracted with a mixture of dichloromethane:methanol (2:1, v:v) and were determined by the gravimetric method as described by Bligh and Dyer (1959). Ash content was determined by incineration of 1 g of each sample at 450 °C for 24 h. Total water-soluble carbohydrates were analyzed in the CE using the modified colorimetric phenol-sulfuric acid method (White *et al.* 1986).

2.3.5. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using SigmaStat software (3.1). Biochemical compositions of algae and abalones, biometrics and growth parameters were compared with t-test or one-way ANOVAs. When ANOVA showed a statistical difference, a Holm-Sidak procedure was used for pairwise comparisons. For each data sample, means and standard deviations are given.

2.4. Results

2.4.1. Algal biochemical composition

G. turuturu and *P. palmata* showed significant differences ($p < 0.001$) in their biochemical composition except for ash (Tableau 4). Protein contents were significantly higher in *G. turuturu* ($22.7 \pm 2.7\%$ dw) than in *P. palmata*. However *P. palmata* showed

the highest carbohydrate content with $63.4 \pm 7.4\%$ dw. Both, *G. turuturu* and *P. palmata*, were low in lipid contents, respectively 2.6 and 2.0% dw.

Tableau 4. Biochemical composition of the two macroalgae provided to abalones throughout experiment. Data are expressed as mean \pm SD (n=12). p-value obtained after a t-test. dw: dry weight; ns: not significant.

	<i>G. turuturu</i>	<i>P. palmata</i>	p value
Proteins (%dw)	22.7 ± 2.7	16.2 ± 1.7	$P < 0.001$
Carbohydrates (%dw)	51.3 ± 4.1	63.4 ± 7.4	$P < 0.001$
Lipids (%dw)	2.6 ± 0.2	2.0 ± 0.3	$P < 0.01$
Ash (%dw)	24.3 ± 0.8	27.2 ± 0.4	ns

2.4.2. Consumption, survival and growth of abalones

In abalone aquaculture tanks, *G. turuturu* deteriorated rapidly, resulting in very small pieces which made the calculation of this algae's consumption very difficult. No conservation problem was encountered with *P. palmata*. Daily average intake of *P. palmata* per abalone was $17.6 \pm 2.6 \text{ g.d}^{-1}$ during the entire feeding trial period.

During all the experiment, we did not observe any abalone mortalities, the survival rate reached 100% in all treatment groups. Initial biomass of all abalone triplicates were similar whereas final biomass were significantly higher with *P. palmata* and the mixed diet (Tableau 5).

Tableau 5. Biometrics of the European abalone (*H. tuberculata*) fed with the three macroalgae diets for 5 months. Data are expressed as mean \pm SD (n=3 for biomass and n=90 for length and weight). Statistical results were analyzed after a one-way ANOVA followed by an Holm-Sidak test. Values in the same row with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

	Diet fed to abalone		
	<i>G. turuturu</i>	<i>P. palmata</i>	<i>G. turuturu</i> - <i>P. palmata</i> (1:1)
Initial biomass (g)	353.3 \pm 61.2 ^a	336.8 \pm 26.9 ^a	356.1 \pm 67.6 ^a
Final biomass (g)	402.6 \pm 49.8 ^a	658.0 \pm 96.2 ^b	715.3 \pm 66.2 ^b
Initial length (mm)	42.9 \pm 2.3 ^a	42.0 \pm 0.8 ^a	42.9 \pm 2.3 ^a
Final length (mm)	47.3 \pm 2.0 ^a	52.7 \pm 1.7 ^b	54.2 \pm 0.6 ^b
Initial weight (g)	12.7 \pm 2.2 ^a	10.3 \pm 0.1 ^a	11.8 \pm 1.8 ^a
Final weight (g)	16.5 \pm 1.8 ^a	27.3 \pm 3.0 ^b	27.8 \pm 0.7 ^b

The initial and final biomass in abalone fed *G. turuturu* showed only a difference of 49.25 g whereas abalone fed *P. palmata* showed a difference of 359.17 g. Biometrical and growth parameters in *H. tuberculata* were higher with the *P. palmata* diet than with *G. turuturu* (Figure 30 and Tableau 6).

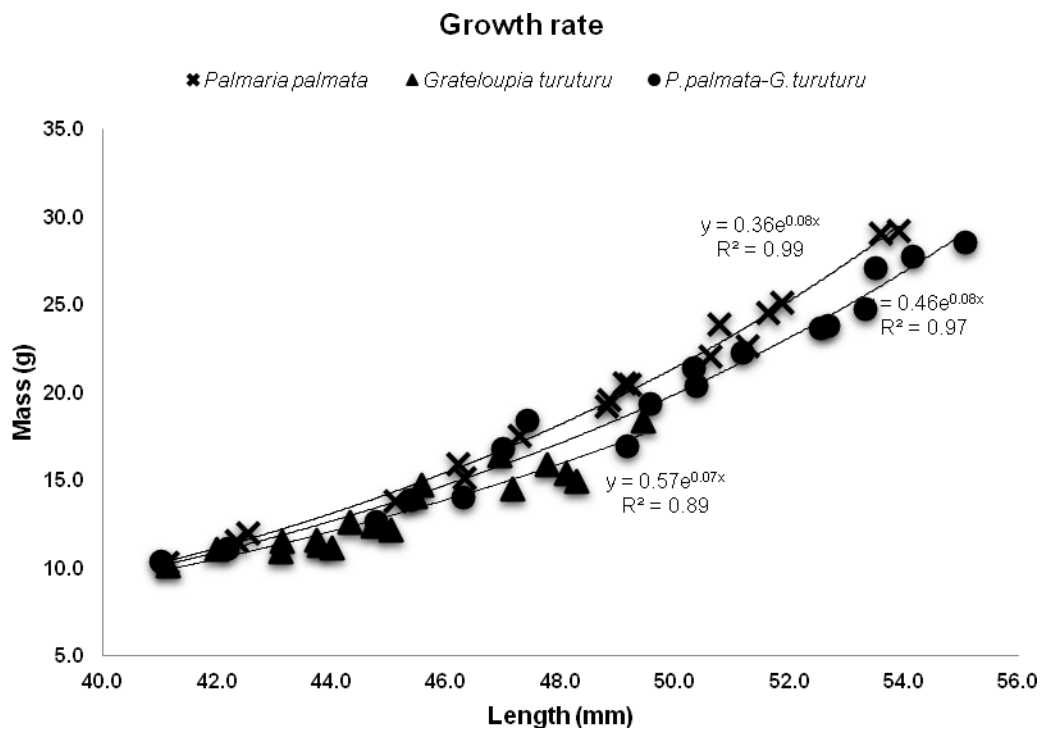


Figure 30. Abalone weight/length relationship depending on the type of feed.

Tableau 6. Growth and survival of juvenile European abalone (*H. tuberculata*) fed with the three macroalgae diets for 5 months. Data are expressed as mean \pm SD (n=3). Statistical results were analyzed after a one-way ANOVA followed by a Holm-Sidak test. Values in the same row with different letters are significantly different ($p < 0.05$). SGR: shell growth rate; ΔL : length difference.

	Diet fed to abalone		
	<i>G. turuturu</i>	<i>P. palmata</i>	<i>G. turuturu - P. palmata</i> (1:1)
DL ($\mu\text{m}\cdot\text{day}^{-1}$)	0.01 \pm 0.01 ^a	0.08 \pm 0.01 ^b	0.06 \pm 0.02 ^b
SGR ($\%\cdot\text{day}^{-1}$)	0.07 \pm 0.02 ^a	0.64 \pm 0.03 ^b	0.60 \pm 0.10 ^b
Weight gain (%)	8.3 \pm 2.3 ^a	107.8 \pm 7.2 ^b	97.5 \pm 21.6 ^b
Survival (%)	100	100	100

2.4.3. Biochemical composition of abalone

Abalone fed with *G. turuturu* showed the lowest carbohydrate and lipid content with $0.7 \pm 0.1\%$ dw and $27.6 \pm 1.8\%$ dw, respectively (Tableau 7). However, these abalones showed the highest ash content with $11.8 \pm 1.5\%$ dw. The abalones fed with *P. palmata* and the mixed diet presented significantly similar results.

Tableau 7. Biochemical composition of abalone fed with three different diets throughout experiment. Data are expressed as mean \pm SD (n=3). p-value obtained after a t-test (ns: not significant). Statistical results were analyzed after a one-way ANOVA followed by a Holm-Sidak test. Values in the same row with different letters are significantly different ($p < 0.05$). dw: dry weight.

	Abalone <i>G. turuturu</i>	Abalone <i>P. palmata</i>	Abalone <i>P.p. - G. t.(1:1)</i>
Water-soluble proteins (%dw)	0.18 ± 0.00^a	0.21 ± 0.00^b	0.20 ± 0.00^{ob}
Water-soluble carbohydrates (%dw)	0.7 ± 0.1^a	2.7 ± 0.2^b	2.4 ± 0.2^b
Lipids (%dw)	27.6 ± 1.8^a	36.9 ± 11.3^b	42.4 ± 5.7^b
Ash (%dw)	11.8 ± 1.5^a	8.3 ± 1.4^b	8.0 ± 0.5^b

2.5. Discussion

The biochemical composition of the two red algae *G. turuturu* and *P. palmata* harvested on the south Brittany coast (France), was within the range of values reported for other species of seaweeds used as feed for abalone (Mercer *et al.* 1993; Shpigel *et al.* 1999). Mercer *et al.* (1993) showed that balanced levels of proteins (>15%), lipids (3-5%) and carbohydrates (20-30%) in macroalgae were essential for an optimal growth performance of abalone species. Protein content of *G. turuturu* and *P. palmata* (around 20%) was within the range reported previously in red seaweeds (Morgan *et al.* 1980; Fleurence 1999; Galland-Irmouli *et al.* 1999) and for the protein requirements of

H. tuberculata which have been estimated between 25 and 35% (Mercer *et al.* 1993; Mai *et al.* 1995b). For *P. palmata*, the total carbohydrates were comparable to those found in the literature, which were from 38 to 45% dw (Morgan *et al.* 1980; Morgan et Simpson 1981; Rosen *et al.* 2000) and were higher than those found in *G. turuturu* (51.3%). To our knowledge, our paper reports the total carbohydrate content of *G. turuturu* for the first time. The carbohydrate contents of *P. palmata* were higher than the requirements for abalone (20-30% - Mai *et al.* 1995b) and *P. palmata* exhibited the best growth of *Haliotis tuberculata*. As previously reported for other species of red seaweeds (Mabeau et Fleurence 1993), lipid contents were low, $2.6 \pm 0.2\%$ dw for *G. turuturu* and $2.0 \pm 0.2\%$ dw for *P. palmata*. This low lipid contents are in agreement with the requirement of abalone (Mercer *et al.* 1993), where high levels of dietary lipids negatively affect their growth (Thongrod *et al.* 2003). As all the diets used in this study fulfilled abalone's requirements, the different growth performances could not be attributed to the biochemical composition of the algae. In particular, the *P. palmata* diet contained a lower protein content (16.1%) than the *G. turuturu* diet (22.7%), suggesting that protein levels in the other diets may not be a limiting factor for abalone growth.

Although survival was excellent in all treatments, the abalone fed with *G. turuturu* showed the lowest growth performance compared to the ones fed with *P. palmata* or the mixed diet. Previous growth trials already demonstrated that *P. palmata* was the best algal diet for *H. tuberculata* (Mercer *et al.* 1993; Mai *et al.* 1996) and the lower growth reported in our experiments with *G. turuturu* were certainly due to a lower feed intake. Abalones fed with *G. turuturu* showed the lowest lipid and carbohydrate contents which can be explained by the fact that most of the energy absorbed sustains metabolic needs and any deficit is drawn from the abalone's nutrient reserves. By the end of the experimental period, abalone fed on *P. palmaria* and the mixed diet had gained an average weight of 17 and 16 g respectively and an average length of 10.7 and 11.3 mm, whereas animals fed on *G. turuturu* had grown to an average of 3.8 and

4.4 mm in the same conditions of culture. SGR values were lower, $0.64 \pm 0.03\%$ for abalone fed *P. palmata* and $0.60 \pm 0.10\%$ for abalone fed the mixed diet, than those reported by Mai et al. (1996) of 1.0-1.3% for *Haliotis tuberculata* fed with five species of macroalgae (*Palmaria palmata*, *Alaria esculenta*, *Ulva lactuca*, *Laminaria digitata* and *Laminaria saccharina*). When comparing the weight gain, a difference of around 90-100% was found between the *G. turuturu* diet and the two other ones. However, when the animals were fed *G. turuturu* in a mixed diet, they exhibited a higher lipid content than the ones fed only with *P. palmata*, suggesting that *G. turuturu* provided complementary nutrients to those found in *P. palmata*.

Consumption rate in abalone could be influenced by multiple factors other than the nutritional quality of algae. Secondary metabolites are factors modifying seaweed susceptibility to herbivores and can make algae unpalatable to abalone (Yates et Peckol 1993). The texture of algae also influences the food intake (Shepherd et Steinberg 1992); in the wild, abalones thus prefer soft texture seaweeds because their radula have a limited ability to exert force against the substrate (Steneck et Watling 1982). This explanation should be rejected as *G. turuturu* is the softer of the two algae used in the present study. The preference for *P. palmata* could be explained by the rapid decomposition of *G. turuturu* in the culture tank making it unattractive to the animals.

At present, very little information has been reported on the suitability of *G. turuturu* as a promoter of growth and survival in abalone species. Previous studies have shown that growth was improved when abalone were fed with a combination of different algae compared with those fed a monospecific or formulated feed (Viera et al. 2005; Qi et al. 2010; Mulvaney et al. 2013). But in the present study, the mixed diet sustained a slightly lower growth rate than the *P. palmata* one. But at the same time and as shown above, abalone fed with the mixed diet presented a higher lipid content, suggesting a

qualitative improvement of the diet in mixing these two red algae. Therefore, *G. turuturu* cannot be used alone in monospecific diets for the abalone *H. tuberculata*, in contrast to the study by Mulvaney et al. (2013) but could be used in a mixed diet as a dietary supplement. Moreover, various studies have shown that numerous molecules and/or extracts of *G. turuturu* present a biological activity such as antibacterial (Pang et al. 2006) or antiviral ones (Hudson et al. 1999). More specifically, *G. turuturu* has shown an antibacterial activity against the abalone pathogen *V. harveyi* (Garcia-Bueno et al., 2014).

In the context of an expansion of the proliferative *G. turuturu*, these results are interesting as they can improve the aquaculture of abalone. To benefit from its biological activities and as a complementary source of lipids, this red macroalgae should be used only in a mixed diet. Moreover, to avoid the problem of the rapid degradation of fresh thalli in farming conditions, *G. turuturu* could be used in a formulated feed that still needs to be developed or as a fresh source of algae that would need changing daily.

2.6. Acknowledgements

All authors participated in the collection and interpretation of results. Mireille Amat, who is also a translator, corrected the English of the manuscript. The authors thank Katarzyna Lawreniuk for her technical assistance during feeding experiments. This project was funded by the Fundació "Obra Social la Caixa" through a doctoral scholarship to Nuria García Bueno and by the Syndicat Mixte pour le Développement de l'Aquaculture et de la Pêche (SMIDAP) de la Région des Pays de la Loire.

3. Conclusion

Malgré une composition biochimique correspondant aux besoins alimentaires de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata*, jusqu'à présent aucune étude n'avait évalué l'intérêt nutritionnel de la macroalgue rouge *Grateloupia turuturu* comme aliment pour ce mollusque. Il s'avère que, contrairement à ce qui a été montré par Mulvaney et al. (2013) chez une espèce d'ormeau hybride cultivée en Australie, *Haliotis rubra* 1814 Leach + *Haliotis laevigata* 1808 Donovan, *G. turuturu* ne peut pas être utilisé à l'état frais comme aliment monospécifique pour l'ormeau *H. tuberculata tuberculata*. Ceci est lié à la dégradation rapide des thalles dans les conditions d'élevage. Cependant, elle pourrait constituer un complément alimentaire intéressant. En effet, lorsqu'elle est fournie en mélange, les ormeaux présentent une teneur plus élevée en lipides que celle obtenue avec le régime monospécifique de *Palmaria palmata*. Des études précédentes avaient déjà montré que la croissance est améliorée lorsque les ormeaux sont nourris avec une combinaison de différentes algues par rapport celle obtenue avec un régime monospécifique ou un aliment artificiel (Viera et al. 2005; Qi et al. 2010; Mulvaney et al. 2013).

En outre, diverses études ont démontré une activité biologique de certaines molécules et d'extraits de *G. turuturu* (Hudson et al. 1999; Pang et al. 2006). Plus précisément, *G. turuturu* présente une activité antibactérienne contre le pathogène de l'ormeau *V. harveyi* (cf. Chapitre III - Garcia-Bueno et al., 2014).

Pour tirer partie de cette activité et du complément en nutriments, cette macroalgue rouge ne pourrait être utilisée à l'état frais que dans un régime mixte en étant renouvelée quotidiennement. Une perspective à envisager pour éviter le problème de la dégradation rapide des thalles frais dans les conditions d'élevage, serait de fournir *G. turuturu* sous une autre forme, à savoir un aliment artificiel.

3. Conclusión

A pesar de una composición bioquímica correspondiente a las necesidades alimenticias de *Haliotis tuberculata*, hasta hoy ningún estudio había evaluado el interés nutricional de la macroalga roja *Grateloupia turuturu* como alimento para este molusco. Se ha comprobado que, al contrario de lo que fue mostrado por Mulvaney et al. (2013) para la especie híbrida cultivada en Australia, *Haliotis rubra* 1814 Leach + *Haliotis laevigata* 1808 Donovan, *G. turuturu* no puede ser utilizada en fresco como alimento monoespecífico para *H. tuberculata tuberculata*. Este hecho está relacionado con la rápida degradación de los tallos del alga en las condiciones de un criadero. No obstante, esta alga podría constituir un complemento alimenticio interesante para el gasterópodo. De hecho, cuando *G. turuturu* es suministrada en dieta mixta, los moluscos presentan un contenido mayor en lípidos que cuando son alimentados en dieta monoespecífica con *Palmaria palmata*. Ya otros estudios precedentes habían demostrado que el crecimiento mejora cuando la oreja de mar es alimentada con una combinación de diferentes algas frente a dietas monoespecíficas o artificiales (Viera et al. 2005; Qi et al. 2010; Mulvaney et al. 2013). Por otro lado, varios estudios han demostrado que existe una actividad biológica de ciertas moléculas y extractos de *G. turuturu* (Hudson et al. 1999; Pang et al. 2006). Más concretamente, *G. turuturu* presenta una actividad antibacteriana contra el patógeno de la oreja de mar, *V. harveyi* (cf. Chapitre III-García-Bueno et al., 2014). Pero para desempeñar esta función como agente antibacteriano mediante su utilización como complemento alimenticio, esta macroalga solo podría ser utilizada en una dieta mixta y siendo renovada cotidianamente por nuevos tallos frescos. Una perspectiva a tener en cuenta para evitar el problema de la rápida degradación del alga fresca en las condiciones de los sistemas productivos, sería la posibilidad de suministrar *G. turuturu* bajo alguna otra forma, como por ejemplo, la de un alimento artificial.

Chapitre III

Étude de l'effet de différents extraits de *Grateloupia turuturu* et *Palmaria palmata* sur la croissance de la bactérie *Vibrio harveyi*, pathogène de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata tuberculata*

CHAPITRE III : Étude de l'effet de différents extraits de *Grateloupia turuturu* et *Palmaria palmata* sur la croissance de la bactérie *Vibrio harveyi*, pathogène de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata tuberculata*.

1. Contexte de l'étude

La production mondiale de mollusques est actuellement le deuxième secteur aquacole dans le monde (15,2 millions de tonnes en 2012 - FAO 2014). Mais les maladies récurrentes dans ce secteur sont maintenant une contrainte majeure, limitant le développement de l'aquaculture dans de nombreux pays. Une gestion efficace de l'eau, de l'alimentation, du stress et des maladies est la meilleure approche permettant d'éviter les fortes mortalités. La prévention, le contrôle et le traitement de ces maladies sont donc plus que jamais nécessaires pour la pratique d'une aquaculture durable. L'aquaculture intensive et le réchauffement global ont contribué à favoriser les maladies causées par des virus, des bactéries et d'autres agents pathogènes. La FAO et plusieurs gouvernements ont déjà soulevé la question de l'utilisation irresponsable des antibiotiques dans l'aquaculture, avec une référence particulière aux risques potentiels pour la santé publique. Différentes solutions, autres que l'utilisation d'antibiotiques, ont donc été développées pour lutter contre ces maladies dans les élevages aquacoles. L'intérêt pour les organismes marins a ainsi beaucoup augmenté au cours des dernières années, l'objectif étant de trouver et de développer des nouveaux médicaments alternatifs.

Tout naturellement, l'intérêt s'est porté sur les macroalgues qui sont connues pour être une source potentielle de substances bioactives et qui correspondent aussi à leur régime alimentaire en milieu naturel (Bhakuni et Rawat 2005). De nombreuses espèces d'algues contiennent des composés biologiques inhibant la croissance de

bactéries pathogènes (Arun Kumar et Rengasamy 2000; Freile-Pelegrín et Morales 2004; Pang *et al.* 2006; Plouguerné *et al.* 2008). La production de ces substances présente une variabilité intraspécifique liée à la saison, l'écologie, le stade de croissance ou la maturité sexuelle (Bourgougnon et Stiger-Pouvreau 2012). C'est une des raisons pour laquelle notre étude a été réalisée tout au long de l'année. Des travaux menés par Pang *et al.*, (2006) ont montré une activité de la macroalgue *G. turuturu* contre la bactérie pathogène *Vibrio parahaemolyticus*. Dans le cadre de l'étude de sa valorisation en halioticulture, il serait intéressant de connaître son potentiel d'action vis à vis du *Vibrio harveyi*, le principal pathogène de l'ormeau européen *H. tuberculata* causant des mortalités importantes dans les populations françaises.

Dans le présent travail, les effets d'extraits solubles, polaires et apolaires de la macroalgue native *Palmaria palmata* et de la macroalgue proliférante *Grateloupia turuturu* ont été testés afin de rechercher des métabolites potentiellement bioactifs sur la croissance de *V. harveyi*. Cela a été réalisé en utilisant la méthode des microplaques (Bioscreen). Parallèlement, des analyses par RMN ont été effectuées afin d'identifier d'éventuelles différences dans la compositions des extraits.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet de deux articles scientifiques : un premier accepté pour publication dans la revue *Aquatic Living Resources* et un deuxième soumis à la revue *Aquatic Food and Technology*.

CAPITULO III: Estudio del efecto de diferentes extractos de Grateloupia turuturu y Palmaria palmata sobre el crecimiento de la bacteria Vibrio harveyi, patógeno de la oreja de mar europea Haliotis tuberculata tuberculata.

1. Contexto del estudio

La producción mundial de moluscos es actualmente el segundo sector acuícola más importante en el mundo (15,2 millones de toneladas en 2012 - FAO 2014). Pero las enfermedades recurrentes en este sector son en este momento un obstáculo considerable, limitando el desarrollo de la acuicultura en numerosos países. Una gestión eficaz del agua, de la alimentación, del estrés y de las enfermedades es la mejor medida para prevenir las fuertes mortandades. La prevención, el control y el tratamiento de las enfermedades son ahora más que nunca necesarios para la práctica de una acuicultura sostenible. La acuicultura intensiva y el calentamiento global han contribuido a favorecer la aparición de enfermedades causadas por virus, bacterias y otros agentes patógenos. Por este motivo, la FAO y varios gobiernos del mundo han destacado la cuestión de la utilización responsable de antibióticos en acuicultura, haciendo particularmente referencia a los potenciales riesgos para la salud pública. Distintas soluciones, además de la utilización de antibióticos, han sido por tanto desarrolladas en la lucha contra las enfermedades que afectan los criaderos. Del mismo modo, el interés por los organismos marinos ha aumentado en gran medida a lo largo de los últimos años, de ahí el objetivo de encontrar y desarrollar nuevos medicamentos alternativos.

Naturalmente este interés recae fuertemente sobre las macroalgas, que son conocidas por formar parte de una potencial fuente de sustancias bioactivas (Bhakuni et Rawat 2005). Numerosas especies de algas contienen componentes biológicos inhibidores

del crecimiento de determinadas bacterias patógenas (Arun Kumar et Rengasamy 2000; Freile-Pelegrín et Morales 2004; Pang et al. 2006; Plouguerné et al. 2008). La producción de estas sustancias presenta una variabilidad intraespecífica ligada a la estación, la ecología, la fase de crecimiento o la maduración sexual del organismo (Bourgougnon et Stiger-Pouvreau 2012). Ésta es una de las razones por la que nuestro estudio se ha llevado a cabo durante todo un año. Estudios realizados por Pang et al., (2006) han mostrado una actividad de la macroalga G. turuturu contra la bacteria patógena Vibrio parahaemolyticus. En el marco de su valorización en halioticultura, sería interesante conocer su potencial de acción contra V. harveyi, principal patógeno de Haliotis tuberculata y causante de importantes mortandades en las poblaciones naturales francesas.

En el trabajo que presentamos, los efectos de los extractos solubles, polares y apolares de la macroalga nativa Palmaria palmata y de la macroalga proliferante Grateloupi turuturu han sido analizados con el objeto de hallar metabolitos potencialmente bioactivos sobre el crecimiento de V. harveyi. Estos análisis se llevaron a cabo mediante técnicas con microplacas (Bioscreen) y, en paralelo, análisis con RMN fueron efectuados con el fin de identificar eventuales diferencias en la composición de los extractos.

El conjunto de estos trabajos ha sido objeto de dos artículos científicos: el primero, aceptado para su publicación en la revista *Aquatic Living Resources* y el segundo enviado para su aprobación a la revista *Aquatic Food and Technology*.

2. Seasonal antibacterial activity of two red seaweeds, *Palmaria palmata* and *Grateloupi*a *turuturu*, on European abalone pathogen *Vibrio harveyi*

Nuria García-Bueno, Priscilla Decottignies, Vincent Turpin, Justine Dumay, Christine Paillard, Valérie Stiger-Pouvreau, Nelly Kervarec, Yves-François Pouchus, Arnaldo Aitor Marín-Atucha, Joël Fleurence

2.1. Abstract

Vibrio harveyi is the main pathogen of the European abalone *Haliotis tuberculata*, and recently caused important mortalities at the production sites of this marine gastropod in France. In the present work, the monthly antibacterial activity of two red seaweed species from the French Atlantic coast, the native *Palmaria palmata* and the introduced *Grateloupi*a *turuturu*, were investigated against the abalone pathogen *Vibrio harveyi* strain ORM4. Water-soluble extracts were screened using the microplate method. *Grateloupi*a *turuturu* showed an antibacterial activity with a maximal growth inhibition in spring of around 16%. In contrast, *Palmaria palmata* was inactive, as further growth of the bacteria was observed. Preliminary ¹H NMR profiles identified the differences between the two water-soluble extracts.

Keywords: *Vibrio harveyi*, *Haliotis tuberculata*, antibacterial activity, inhibition, water-soluble extracts

2.2. Introduction

World aquaculture production of molluscs, with an average in 2011 of 14.4 million tons, is the second fastest growing aquaculture sector in the world (FAO 2013). The intensity of aquaculture activities has led to increasing problems of disease caused by viruses, bacteria and other pathogens (Bondad-Reantaso *et al.* 2005). *Vibrio* is recognized as one of the most important bacterial genera to consider (Austin et Zhang 2006). For example, studies showed the pathogenicity of *Vibrio harveyi* against salmonids and shrimps (Zhang et Austin 2000; Paillard *et al.* 2004b; Austin et Zhang 2006), and even mortalities induced by *V. aestuarianus*, *V. splendidus* and *V. tapetis* in the oyster *Crassostrea gigas* and the clam *Venerupis philippinarum* (Lacoste *et al.* 2001; Gay *et al.* 2004; Paillard 2004a; Garnier *et al.* 2007; Paillard *et al.* 2008). Declines in abalone stocks have thus been associated with the emerging Gram-negative bacterium *Vibrio*, especially *V. harveyi* in relation to the European abalone *Haliotis tuberculata* (Nicolas *et al.* 2002; Huchette et Clavier 2004). Antibiotics are widely used to prevent and control outbreaks caused by *Vibrio spp.* in aquaculture, especially in shrimp and salmonid farming (Holmström *et al.* 2003). The development of various solutions against diseases, other than the use of antibiotics, was thus initiated to ensure the profitability of aquaculture, for which the production of safe and healthy products is a priority. For example, using probiotics in aquaculture to limit or inhibit the growth of the pathogenic species clade *Harveyi* is reported in several studies (Kesarcodi-Watson *et al.* 2008; Wang *et al.* 2008; Prado *et al.* 2010; Jiang *et al.* 2013). The interest in marine organisms as potential new drugs in aquaculture has increased during recent years (Genovese *et al.* 2012; Mata *et al.* 2013). In the past three decades, several studies have shown that seaweeds are one of the richest and most promising sources of bioactive primary and secondary metabolites (Bhakuni et Rawat 2005; Cardozo *et al.* 2007; Gupta et Abu-Ghannam 2011). Many seaweed species, especially red ones, contain biological compounds that inhibit the growth of pathogenic Gram-positive and

Gram-negative bacteria. *P. palmata* and *G. turuturu* are widespread along the French coast (Simon *et al.* 2001; Le Gall *et al.* 2004). On the one hand, several studies have shown the preferred consumption of *Palmaria* over other seaweeds, due to its biochemical composition, by gastropods like *Haliotis* (Rosen *et al.* 2000; Demetropoulos et Langdon 2004). On the other hand, the proliferative nature of *G. turuturu* provides the added advantage of being available most of the year in significant quantities (Plouguerné 2006). Moreover, a number of molecules and/or extracts from both species present biological activities, like antibacterial and antiviral (Hudson *et al.* 1999; Helligo *et al.* 2000; Bansemir *et al.* 2006; Pang *et al.* 2006; Plouguerné *et al.* 2006; Cox *et al.* 2010). These two seaweed species may thus be good candidates for sources of bioactive compounds in the context of their use in the culture of the European abalone *Haliotis tuberculata*. The aim of this work was to evaluate the seasonal *in vitro* activity of aqueous extracts of two marine red seaweeds, *Palmaria palmata* and *Grateloupia turuturu*, against the abalone pathogen *V. harveyi*.

2.3. Materials and methods

2.3.1. Seaweed sampling and extraction

Red seaweeds, *Grateloupia turuturu* Yamada 1941 (Rhodophyta, Halymeniaceae) and *Palmaria palmata* Linnaeus 1805 (Rhodophyta, Palmariaceae), were harvested monthly between May 2011 and April 2012 in the mediolittoral zone at Batz-sur-Mer (Atlantic Coast, France).

Thalli were successively rinsed with seawater, tap water and distilled water before freeze-drying. Freeze-dried samples were then ground in liquid nitrogen and the resulting fine powder was used for water-soluble component extraction for 20 min in a 1/20 ratio (w/v) of phosphate buffer (20 mM; pH 7.1) before being centrifuged at 25,000 g at 4 °C for 20 min then stored at -20 °C until use.

2.3.2. Biochemical composition of seaweeds

The resulting supernatants were called aqueous crude extracts (CE). Water-soluble proteins in the CE were analyzed following the Bradford method (Bradford 1976). Protein content, expressed in mg of protein per g of dry weight of seaweed, was determined using BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma) as a standard (from 0 to 50 mg.L⁻¹).

Total water-soluble carbohydrates were analyzed in the CE using the modified colorimetric phenol-sulfuric acid method (White *et al.* 1986). Carbohydrate content, expressed in mg of carbohydrate per g of dry weight of seaweed, was determined using glucose (Sigma) as a standard (from 0 to 100 mg.L⁻¹).

2.3.3. Bacterial strain

The marine bacterial *V. harveyi* pathogen strain ORM4 obtained from the culture collection of the LEMAR, (IUEM-UBO, Brest, France) was used for the experiment. The virulent bacteria studied were isolated from diseased European abalone *Haliotis tuberculata* in Normandy in 1999 (Nicolas *et al.* 2002). Before inoculation, bacteria were grown in test tubes with Luria–Bertani broth (LB, Sigma) supplemented with extra NaCl (20 g.L⁻¹) (LBS) in a temperature-controlled shaker at 28 °C for 18 h. Each plate well had the same bacterial content of 10⁵ CFU (colony-forming unit).mL⁻¹.

2.3.4. Antimicrobial assays

The monthly samples of water-soluble extracts from *P. palmata* and *G. turuturu* were tested for their activity against the growth of the ORM4 strain. Seaweed extracts were incubated with the bacteria in 96-well plates (Falcon® VWR). Two controls were performed for every assay, LBS medium and the water-soluble extracts, to ensure no influence of the microbial growth. Control LBS medium + bacterial strain was used to compare with our extracts. All the extracts and controls were tested on 6 replicates.

From each extract, 10 μ L CE + 200 μ L sample culture were transferred to wells (6 wells per month/seaweed) of a Bioscreen plate (C BIOSCREEN® MBR) for incubation for 24 hours. Experiments were carried out at three temperatures: 16 °C (lowest temperature of growth capacity of the bacteria in seawater), 20 °C (mean temperature of seawater when the abalone stock declined along the French coastline) and 28 °C (high optimal growth temperature of *V. harveyi* - Travers *et al.* 2009). Bacterial growth was monitored by measuring OD at 490 nm every 30 min for 24 h. After incubation, the intensity of growth in the presence of the tested compounds and controls was compared. Growth rate (Eq.1) was defined as the variation in population density occurring in different conditions compared to a control, and was calculated for each CE concentration (Bazes *et al.* 2006). Positive values of Eq.1 are seen as inhibition growth while negative values are seen as induced growth. Exponential Phase Speed Variation (EPSV, Eq.2) rate was defined as the variation in speed of bacterial growth during the exponential phase compared to the control. Delay rate (Eq. 3) was defined as the supplementary delay before the beginning of the exponential growth of the bacteria occurring in test samples compared to the control.

Eq. 1: Growth (%) = 100 [(OD_c – OD_t)/OD_c]

Eq. 2: EPSV (%) = 100 [(S_c – S_t)/S_c] where S = (OD_t-OD_{t-1})/OD_{t-1}

Eq. 3: Delay (%) = 100 [(λ _c – λ _t)/ λ _c]

where OD_c is mean optical density of the bacterial controls; OD_t mean optical density of the test samples; S_c speed of development of the bacterial controls; S_t speed of development of the test samples; λ _c appearance time (min) of maximal growth speed of the control; and λ _t appearance time (min) of maximal growth speed of the test samples.

2.3.5. NMR spectroscopy

One-Dimensional Proton Nuclear Magnetic Resonance (1D ^1H NMR) spectra were recorded at 25 °C on a Bruker Avance 400 spectrometer equipped with an inverse probe 5 mm triple resonance TBI $^1\text{H}/(\text{BB})/^{31}\text{P}$. NMR analyses of water-soluble extracts were recorded on samples dissolved in 700 μL of 100% D_2O , according to standard Bruker program acquisitions. The spectra were obtained using a 2 s delay and scan 30 ° angle pulse. Chemical shifts are expressed in ppm relative to trimethylsilyl propionate (TSP) as an external reference.

2.3.6. Statistical analysis

Extractions and biochemical analyses were performed in triplicate and antibacterial assays in sixuplicate. Mean and standard deviations were calculated for each experiment. All calculations were based on measured concentrations of extracts. To compare results obtained with *G. turuturu* and *P. palmata*, statistical analyses were performed using SigmaStat software (3.1) with two-way ANOVAs followed by Holm-Sidak procedures. A p -value less than 0.05 was considered significant.

2.4. Results

2.4.1. Biochemical composition

The annual average of water-soluble protein content was significantly higher for *P. palmata* ($11.0 \pm 0.9 \text{ mg.g}^{-1} \text{ dw}$) than for *G. turuturu* ($6.6 \pm 1.9 \text{ mg.g}^{-1} \text{ dw}$ - Figure 31a). The maximal water-soluble protein content of *G. turuturu* was recorded in December and January (9.5 ± 0.4 and $9.3 \pm 0.1 \text{ mg.g}^{-1} \text{ dw}$, respectively) and the minimal in March and April (4.2 ± 0.6 and $4.4 \pm 0.3 \text{ mg.g}^{-1} \text{ dw}$, respectively). The water-soluble protein content of *P. palmata* was more stable over the seasons with a maximum determined in December ($12.4 \pm 0.1 \text{ mg.g}^{-1} \text{ dw}$) and a minimum in August ($9.4 \pm 0.9 \text{ mg.g}^{-1} \text{ dw}$). As depicted in Figure 31b, no monthly variation in the water-soluble carbohydrate content was detected for *G. turuturu* while values for *P. palmata* were significantly variable

throughout the study period, with the highest content between May and December (from 99.9 ± 0.5 to 70.8 ± 0.1 mg.g⁻¹ dw).

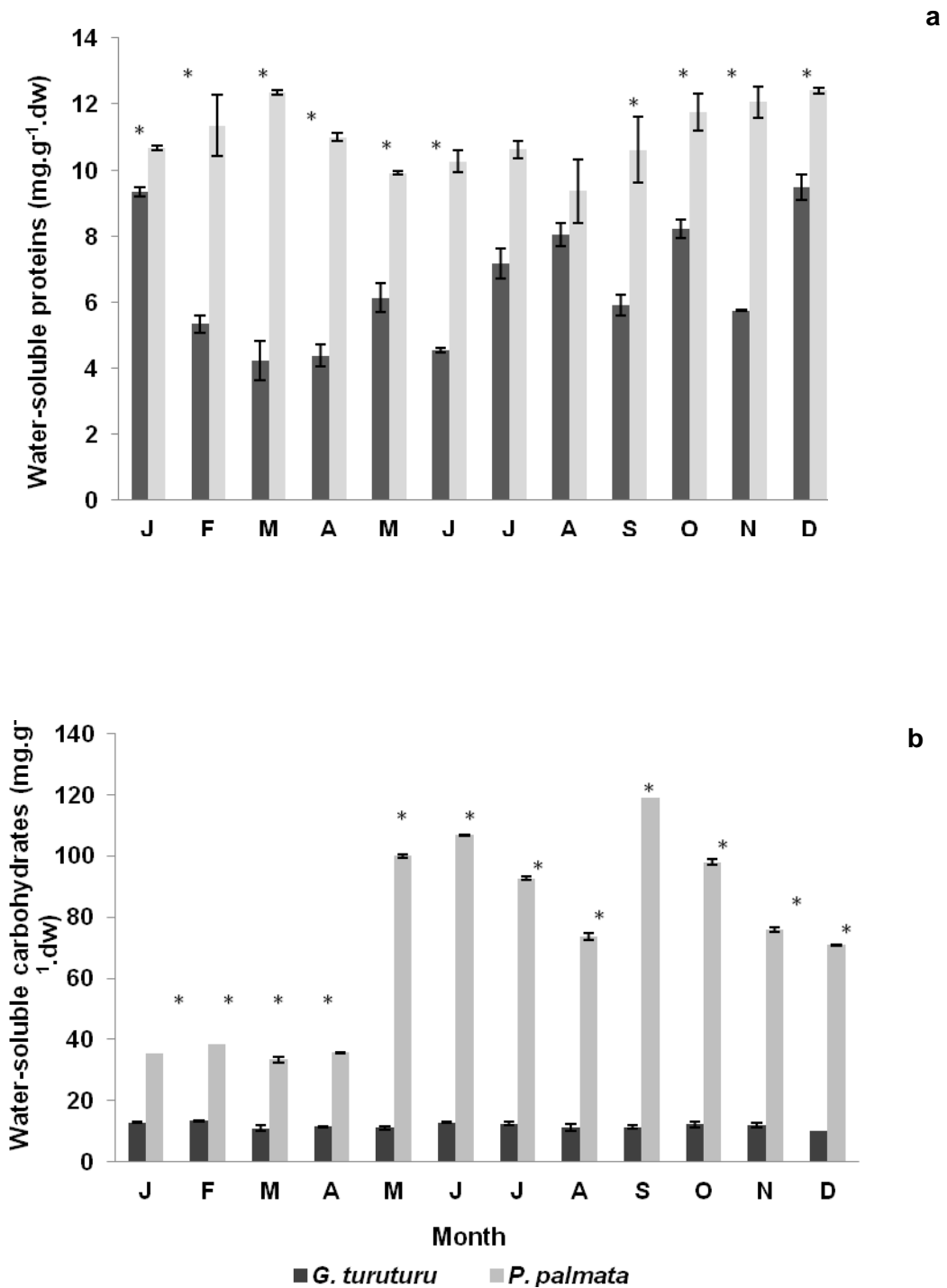


Figure 31. Monthly mean water-soluble protein (a) and water-soluble carbohydrate (b) contents (\pm standard deviation n=3) in *Grateloupia turuturu* and *Palmaria palmata* extracts. *: indicates a significant difference (p-value<0.05) between the two seaweeds obtained with the Holm-Sidak procedure after a two-way ANOVA.

2.4.2. Bacterial growth according to temperature

The ORM4 strain cultured at a higher temperature had faster growth rates and a greater bacterial concentration at the end of the experiment than the same ORM4 strain at 16 °C (Figure 32). The ORM4 strain at 28 °C reached the stationary phase at around 8 h while the strain cultured at 20 °C reached it after 17-18 h. The strain cultured at 16 °C did not even reach the stationary phase by the end of the experiment. ORM4 at 28 °C needed only 4 h to start the exponential phase (period characterized by cell doubling) while the strain at 20 °C needed twice as long to reach this phase. Only the results of the antimicrobial screening assays at 20 °C were studied as this is the average temperature in the natural environment where *Vibrio harveyi* ORM4 lives.

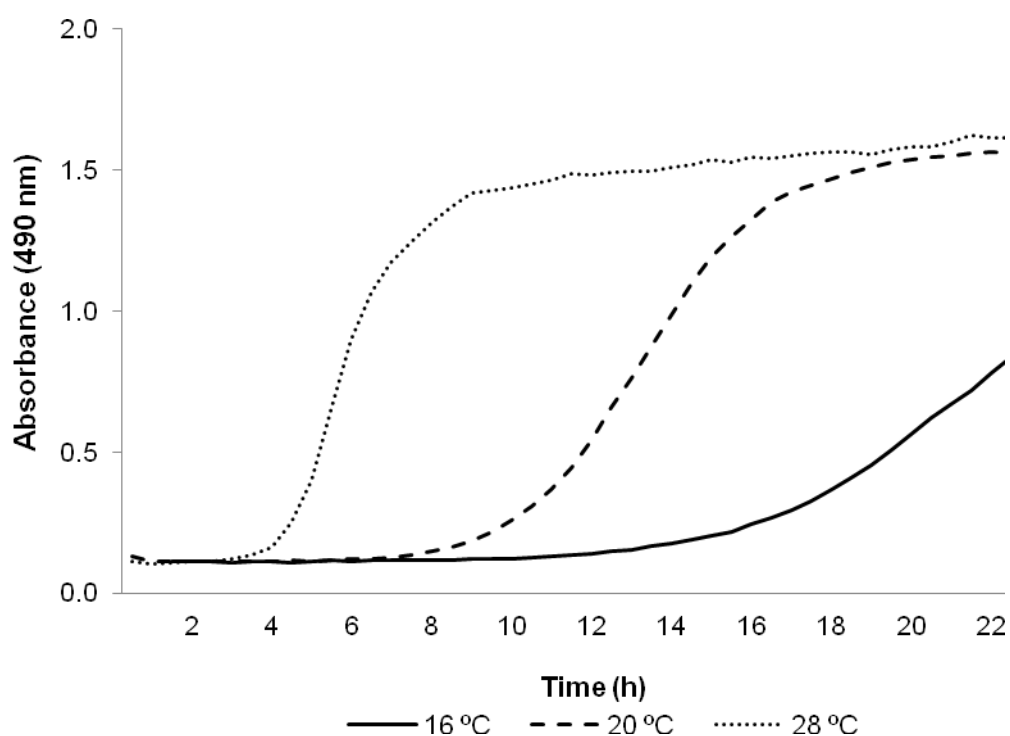


Figure 32. Growth of *Vibrio harveyi* ORM4 strain at three different temperatures (16, 20 and 28 °C).

2.4.3. Activity of extracts

CE dilutions did not lead to significant differences regarding the responses evaluated.

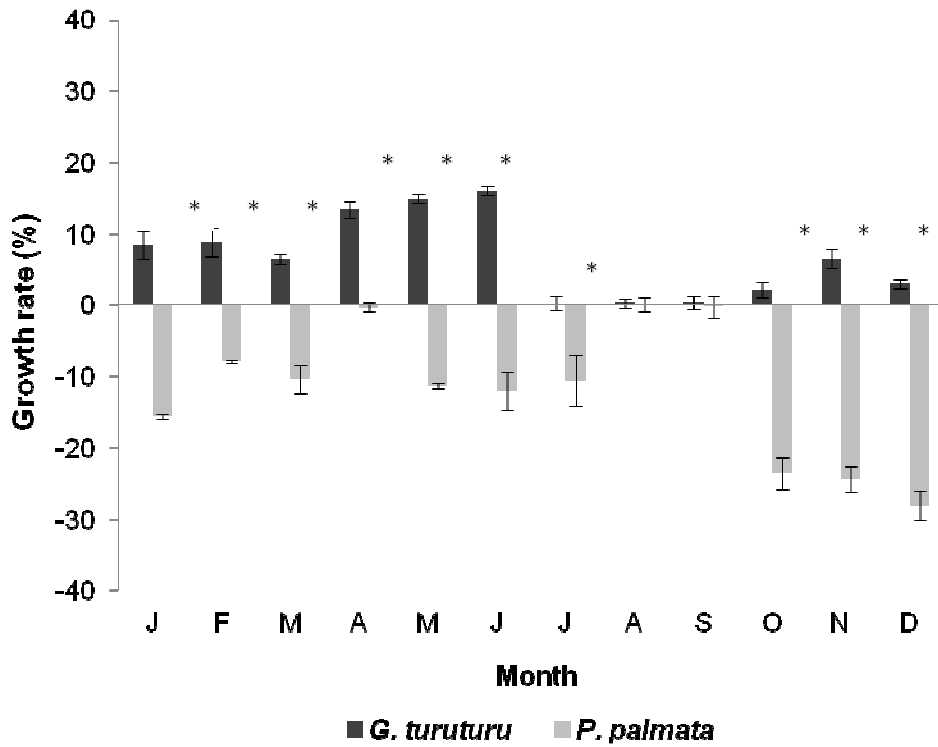
For a better understanding of the figures, only the 10 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ concentration is reported.

2.4.4. Evaluation of bacterial growth

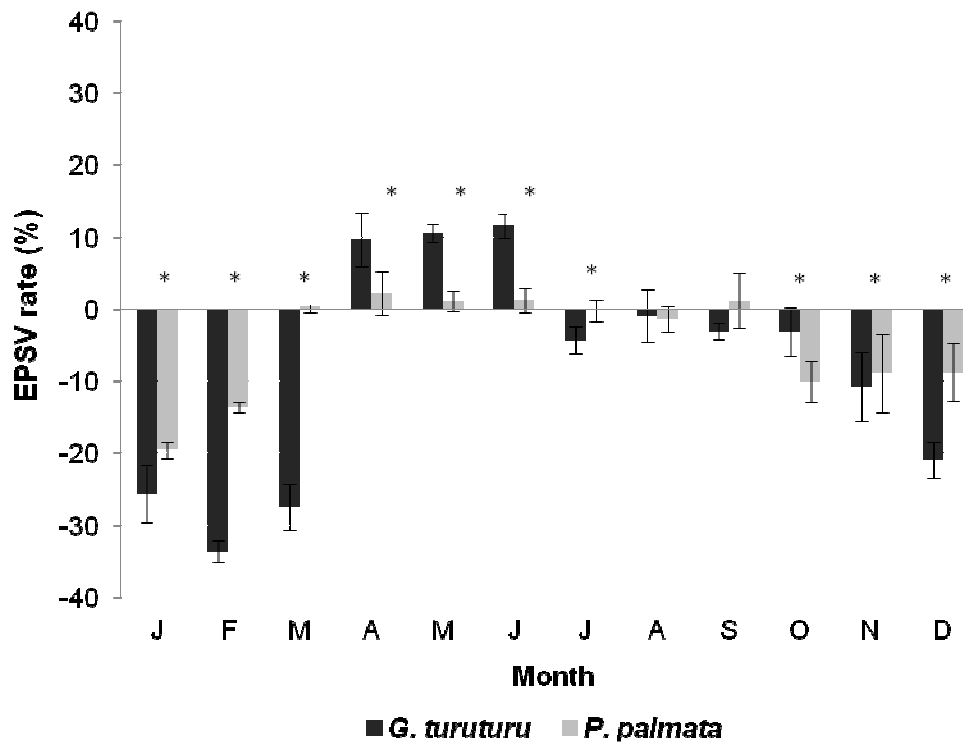
A seasonal variation in inhibition of bacterial growth between 0 and 16% was observed for water-soluble extracts of *G. turuturu* (Figure 33a). The strongest antibacterial activity was obtained in spring extracts of *G. turuturu* with a percentage of inhibition around 16%, whereas the winter extracts showed a weaker antibacterial activity of around 5-7%. An almost nonexistent effect was recorded in July, August and September.

Conversely, extracts of *P. palmata* were not effective against the tested pathogenic organism *V. harveyi* (Figure 33a). Among the seasonal extracts tested, the autumn extracts exhibited the best growth of the tested bacterial species, of around 25%. The highest development of the pathogen ORM4 was observed in the December *P. palmata* extract, which induced a growth of around 30%.

a



b



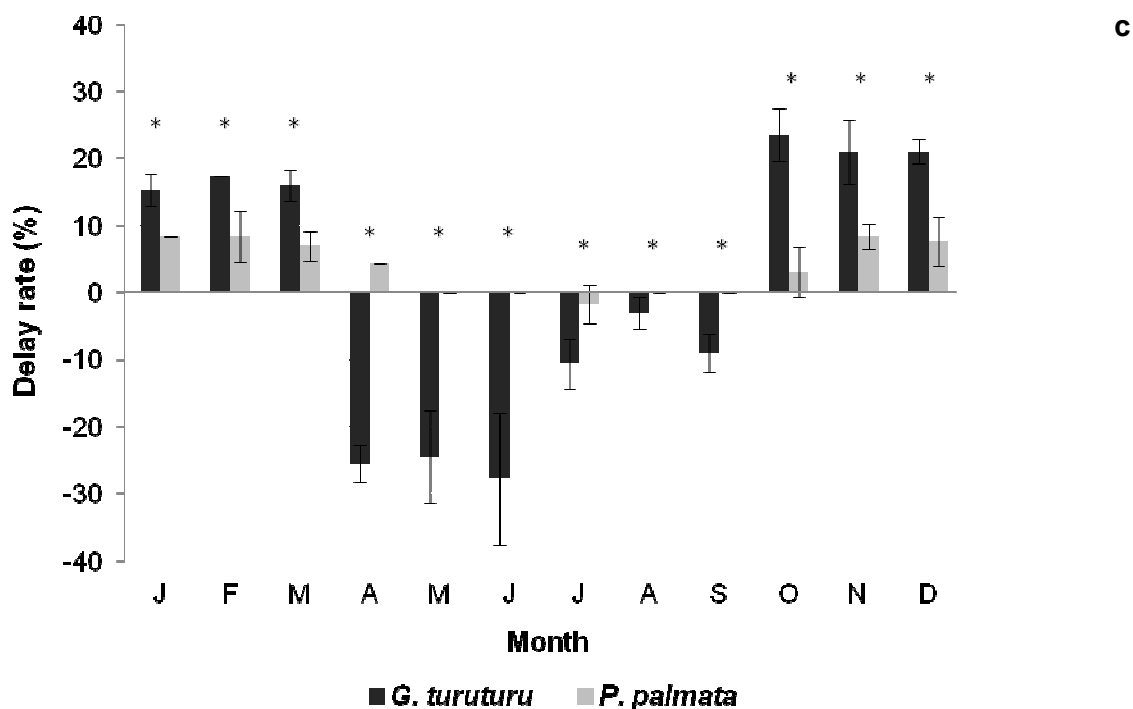


Figure 33. Growth rate (a), EPSV rate (b) and delay rate (c) of *Vibrio harveyi* strain ORM4 at 20 °C induced by *Grateloupia turuturu* and *Palmaria palmata* water-soluble extracts at 10 µg µL⁻¹. Data are expressed as mean ± SD (n=6). *: indicates a significant difference (p-value<0.05) between the two seaweeds obtained with the Holm-Sidak procedure after a two-way ANOVA.

2.4.5. Evaluation of speed variation during the exponential phase

Extracts from December to March of *G. turuturu* promoted cell doubling rate of around 25% compared with the control strain. Nevertheless, spring extracts generated a decrease in the cell doubling rate of approximately 12%. For the summer months, no change compared to the control was demonstrated (Figure 33b). For *P. palmata*, only the winter extracts tested promoted cell doubling at around 10% compared with the control.

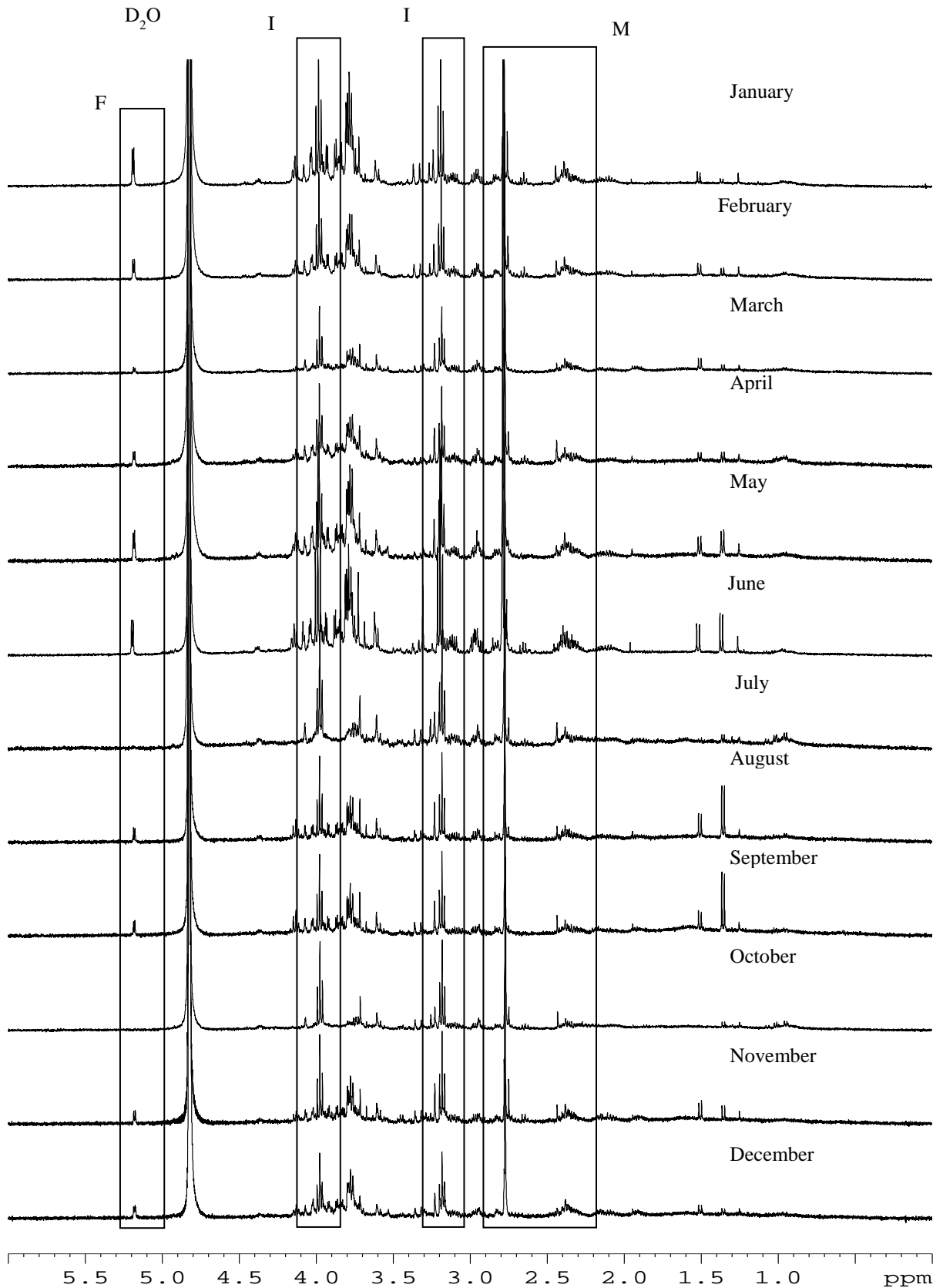
2.4.6. Evaluation of delay during the exponential phase

Delay in the growth of *V. harveyi* decreased by approximately 25% in April, May and June with *G. turuturu* extracts (Figure 33c). On the contrary, delay increased by around 20% with the winter and autumn extracts. The results observed for *P. palmata* extracts (Figure 33c) showed an increased delay of around 10% from November to March. No change was observed with other monthly extracts.

2.4.7. Nuclear magnetic resonance analysis of macroalgal extracts

¹H NMR spectra obtained from monthly water-soluble extracts of *G. turuturu* (Figure 34a) showed the presence of osmolytes, like floridoside and isethionic acid, in water-soluble extracts of *G. turuturu* throughout the study period. Letters F, I, M and D₂O refer to the resonances of floridoside ((2-O- α-D-galactopyranosyl) 1→2' (glycerol)), isethionic acid (2-hydroxyethane sulfonic acid), N-methyl-L-methionine sulfoxide (4-methane sulfinyl-2-methylamino butyric acid) and deuterium oxide, respectively. The spectral composition was variable but did not explain the variations in inhibition of bacterial strain ORM4.

¹H NMR spectra obtained from water-soluble extracts of *P. palmata* (Figure 34b) were very similar throughout the year. The major compound identified in this alga during the study period was floridoside.



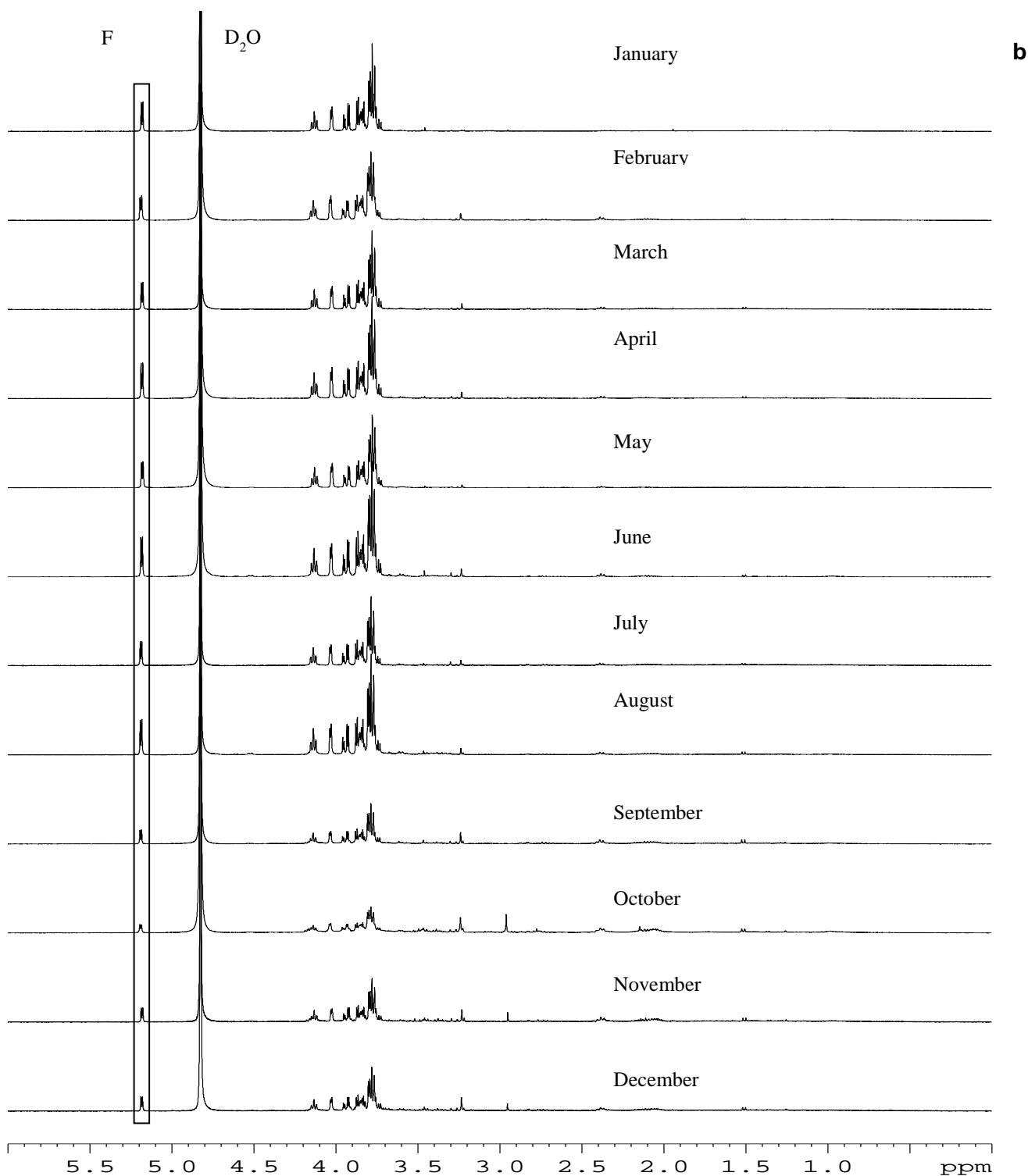


Figure 34. Monthly *Grateloupia turuturu* (a) and *Palmaria palmata* (b) water-soluble extracts analyzed using ^1H NMR. Letters F, I, M and D₂O refer to the resonances of floridoside (α -D-galacto-pyranosyl-(1-2)-glycerol), isethionic acid (2-hydroxyethane sulfonic acid (2-hydroxyethane sulfonic acid), N-methyl-L-methionine sulfoxide (4-methane sulfinyl-2-methylamino butyric acid) and deuterium oxide, respectively.

2.5. Discussion

The two species, *P. palmata* and *G. turuturu*, demonstrated a similar biochemical composition corresponding to abalone feeding preferences (Mai *et al.* 1995b). Water-soluble extracts, used to avoid toxic solvents (methanol or chloroform), enabled the recovery of polysaccharides, oligosaccharides, proteins and peptides, which are the main biochemical compounds of seaweeds (Mabeau et Fleurence 1993). The water-soluble protein content of both seaweeds presented a monthly variation. Total protein contents of *P. palmata* were maximum in winter and minimum in summer, as previously shown by Galland-Irmouli *et al.* (1999). The water-soluble carbohydrates values were in agreement with those recorded in previous studies, demonstrating that the amount of water-soluble sugars in *G. turuturu* (Denis *et al.* 2009; Munier *et al.* 2013) is lower than that recorded for *P. palmata* (Morgan *et al.* 1980; Morgan et Simpson 1981; Rosen *et al.* 2000).

Specific variability in the production of metabolites in seaweeds is generally related to seasonal variation, which can explain the difference revealed by the results of biological tests. This study confirmed the capacity of *G. turuturu* extracts to act as an antibacterial agent against *V. harveyi*. However, the inhibitory action of *G. turuturu* extracts was very variable according to the season. In the present work, maximal antibacterial activity against *V. harveyi* was recorded by *G. turuturu* extracts from April to June. This seasonal activity is consistent with the study carried out by Hornsey and Hide using Atlantic seaweed samples (Hornsey et Hide 1974; 1976). Contrasting results have been reported in studies focusing on Indian (Arun Kumar et Rengasamy 2000) and Mediterranean seaweed samples (Martí *et al.* 2004) where autumn was the season with the highest percentage of inhibition. The worst level for antibacterial activity occurring in the summer can be explained by the increase in the seawater temperature, which modifies metabolite production (Bourgaud *et al.* 2001). Research carried out in various parts of the world on *G. proteus* (Caccamese *et al.* 1980), *G.*

filicina (Vlachos *et al.* 1997) and *G. doryphora* (Val *et al.* 2001) identified high activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. However, results confirmed that *P. palmata* extracts did not exhibit activity against *V. harveyi* when compared to other studies where antimicrobial (Hellio *et al.* 2001), antifouling (Eguía *et al.* 2007) and antioxidant (Wang *et al.* 2010) activities were demonstrated. Here, in contrast, *P. palmata* extracts showed a better bacterial growth, which reached a value of 28%.

As mentioned in the study of Simon-Colin (2002), ¹H NMR spectra led to the characterization of three main organic solutes present in *G. turuturu*. The ¹H-NMR analyses revealed an annual stability in the presence of signals corresponding to the major compounds of both algae. It appears, therefore, that the major peaks of the present NMR spectra are not related to the very large variation in inhibition. The inhibitory effect of *G. turuturu* extract is probably due to other minor compounds not visible on the spectra and not characterized by our NMR analysis. Plouguerné *et al.* (2006) demonstrated the antibacterial activity of cholesteryl formate, which is a minor lipidic molecule found in *G. turuturu* from Brittany coasts. Secondary metabolites are factors modifying seaweed susceptibility to herbivores (Yates *et al.* 1993; Cronin *et al.* 1996; Cronin *et al.* 1997). In future studies, it will be interesting to extend the research into the metabolites responsible for this antibacterial activity of *G. turuturu* extracts.

In conclusion, the maximum antibiotic activity recorded in the water-soluble extract of *G. turuturu* was ~16% of growth inhibition. This level is not high but it suggests the presence of a compound with an inhibitory effect on the growth of *V. harveyi*. Further studies, especially the purification of this molecule, will be necessary to characterize its chemical nature. This purification should also improve the level of antibiotic activity reported initially. Thus, purified metabolites or extracts could be added to the abalone culture media. The best form in which to administer them remains to be defined and could be inspired by the study of Wu *et al.* (2011). As *G. turuturu* is an important

biomass along the French Atlantic coast, the exploitation of this resource constitutes an ecological and economic challenge.

2.6. Acknowledgments

The authors are grateful to Carol Robins for correcting the English of this paper. This project was partially funded by the Fundació “Obra Social la Caixa” through a doctoral scholarship to Nuria García-Bueno.

3. Seasonal variation in the antivibrio activity of two organic extracts from two red seaweed: *Palmaria palmata* and the introduced *Grateloupia turuturu* against the abalone pathogen *Vibrio harveyi*

Nuria García-Bueno, Justine Dumay, Thomas Guerin, Vincent Turpin, Christine Paillard, Valérie Stiger-Pouvreau, Yves-François Pouchus, Arnaldo Aitor Marín-Atucha, Priscilla Decottignies, Joël Fleurence.

Running title: Antivibrio activities of two red seaweed organic extracts

3.1. Abstract

The wide polarity range and highly polar compounds of two selected frondose red seaweed, *Grateloupia turuturu* and *Palmaria palmata*, were extracted using two different types of solvent, dichloromethane/methanol and methanol/water. *In vitro* antibacterial activities were studied using the microplate method against the gram-negative marine bacteria *Vibrio harveyi* strain ORM4, known to infest abalone. Inhibition, slowdown and delay of *Vibrio harveyi* growth were investigated. Polar compounds of both seaweed showed an activity against the abalone pathogen. The best activity was recorded in hydromethanolic extracts from *P. palmata* collected in spring, with an inhibition of 7.9% of the bacterial growth. Preliminary 1H NMR profiles identified the differences between the extracts.

Keywords: antibacterial activity, abalone disease, *Haliotis tuberculata*, red seaweed, *Vibrio harveyi*

3.2. Introduction

Metabolites of seaweed are an important source of organic molecules with significant biological activities (El Gamal 2010). At first, research focused on the phytochemical aspect of metabolites. For example, crude extracts of some algae have demonstrated growth inhibition on bacteria and fungi (Hellio *et al.* 2000; Maréchal *et al.* 2004; Engel *et al.* 2006; Plouguerné *et al.* 2008). In the last twenty years, a great deal of research has been devoted to the biological importance of marine algae (El Gamal 2010; De Almeida *et al.* 2011; Fleurence *et al.* 2012). For instance, several studies have highlighted their potentiality in the treatment of aquaculture diseases (Page *et al.* 2005; Das *et al.* 2008; Lipton et Pramitha 2009). In fact, diseases have a real impact on the profitability and the conservation of species in shellfish farming. It is particularly true for abalone (*Haliotis tuberculata*) in halioticulture (Huchette et Clavier 2004). Different infectious diseases have been identified in abalone caused by the herpes virus *Haplosporidium*, by bacteria of the *Rickettsia* genus (Azevedo *et al.* 2006; Balseiro *et al.* 2006) and by the bacteria *Vibrio harveyi* (Nicolas *et al.* 2002; Travers *et al.* 2009) which has caused cases of vibriosis in abalone in Australia and Japan (Handlinger *et al.* 2005; Sawabe *et al.* 2007).

Two seaweed species, *Palmaria palmata* and *Grateloupia turuturu* constitute an important resource in the north of France (Simon *et al.* 2001; Le Gall *et al.* 2004) and could be of interest in the abalone culture preservation. In fact, *P. palmata* is known to be among the best species of algae suitable for the growth of abalone (Evans et Langdon 2000). Sulfated polysaccharides extracted from *G. turuturu* have exhibited antiviral (Chattopadhyay *et al.* 2007; Wang *et al.* 2007) and anticoagulant (Shanmugam et Mody 2000) properties. Moreover, this alga has presented antibacterial activity against *Vibrio parahaemolyticus* (Pang *et al.* 2006). The study of the potential antibacterial activity of *P. palmata* and *G. turuturu* against the main abalone pathogen *V. harveyi* could then be of major interest.

Palmaria palmata is a species of red algae of the family *Palmariaceae*, present on the northern coasts of the Atlantic and Pacific (Lüning 1990), and has been consumed in the human diet for hundreds of years in northern Europe (Fleurence *et al.* 2012). *Grateloupia turuturu* Yamada (*Halymeniaceae*) is a proliferative species imported from Japan (Gavio et Fredericq 2002) which has spread rapidly along the French coast since the Erika disaster in 2000 (Barillé-Boyer *et al.* 2004). *G. turuturu* has a worldwide distribution with populations present along the Atlantic coasts of Europe and North America, in the Mediterranean Sea, Australia and New Zealand (Harlin et Villalard-Bohnsack 2001; Simon *et al.* 2001; Marston et Villalard-Bohnsack 2002; Verlaque *et al.* 2005; Barreiro *et al.* 2006)

Denis and collaborators (2010) showed that the seaweed *G. turuturu*, sampled on the French Atlantic coast, has a more seasonally stable biochemical composition than *P. palmata*. The total protein and low total lipid contents of *G. turuturu* (23 and 2.6% dry weight, respectively) are also comparable with those of *P. palmata*, with amounts of carbohydrates 15 to 30% higher than in many species of macrophytes. In fact, intraspecific differences in the concentration of secondary metabolites with antibiotic activity for instance have been reported. They had occurred in different ways: by variation in different parts of the same organism, reproductive status, different specimens of the same population, habitat and season (Rosell et Srivastava 1987; Vidyavathi et Sridhar 1991; Robles-Centeno *et al.* 1996). According to the studies of Hornsey and Hide (1976) carried out in the south-west of England, the antibacterial activity of seaweed had shown four types of temporal variation: 1) uniform and constant activity throughout the year, 2) a peak of activity in the winter; 3) a peak of activity in the spring, and 4) a peak of activity in the summer. These variations were due to climate change affecting water temperature, salinity, currents, tides, waves, etc., which could probably be transposed to France. A recent study has demonstrated the

variability of the biochemical content of seaweed according to environmental conditions (Munier *et al.* 2013).

The present study investigates the potential antibacterial activity of highly polar and wide polarity range extracts from *P. palmata* and *G. turuturu* against the main abalone pathogen *V. harveyi*, and the variations of this activity during the year. It complements the work on the water-soluble extract (unpublished data). The purpose is to determine and identify extracts presenting activity against the growth of pathogenic bacteria in the European abalone *H. tuberculata*.

3.3. Materials and methods

3.3.1. Seaweed sampling

Seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada 1941 (Rhodophyta, *Halymeniaceae*) and *Palmaria palmata* Linnaeus 1805 (Rhodophyta, *Palmariaceae*) were collected monthly between May 2011 and April 2012 at Batz-sur-Mer (47°16'34.82" N 2°29'36.64" O; Atlantic Coast, France). The harvested samples were successively rinsed with seawater, tap water and distilled water to remove epiphytes and sand particles. Samples were then freeze-dried and ground in liquid nitrogen before being frozen. The resulting fine powder was used for extractions.

3.3.2. Extractions

Two different extracts were obtained from algae: one from a polar solvent mix of methanol and water (highly polar extract (PE)) and one from a solvent mix of dichloromethane and methanol (wide polarity ranges extract (WPE)). Extractions were performed in triplicate, for monthly samples of algae and method, using the fine powder after grinding. Extraction methods were roughly similar except for the temperature. Thus, the protocol varied slightly depending on the compounds being extracted.

3.3.2.1. Extraction with methanol/water

An amount of 2.5 g of powder was transferred to a tube previously coated with aluminum to minimize the risk of oxidation related to light. Then 75 mL of the methanol/water solvent (1/1; v/v) was added to each tube. Subsequently, tubes were placed in an incubator for 3 h (Edmund Bühler® GmbH TH 30 and SM-30 CONTROL) protected from light at 40 °C under stirring (150 rpm). All samples were filtered to eliminate residues and obtain a filtrate containing the desired compounds. The filtrate was collected in a previously weighed matrass and placed in a rotary evaporator (STUART RE300B Heidolph® LABOROTA 400). The solvents in the matrass were evaporated to dryness at 40 °C, and then the matrass was immediately weighed. The matrass weight difference determines the amount of solids. Lastly, compounds were recovered with methanol in a solution of 1 g.L⁻¹.

3.3.2.2. Extraction with dichloromethane/methanol

An amount of 2.5 g of powder was transferred to a tube previously coated with aluminum to minimize the risk of oxidation related to light. Then 75 mL of the dichloromethane/methanol solvent (2/1; v/v) was added to each tube. Subsequently, tubes were placed for 3 hours at room temperature (16-18 °C) on trays stirred with a magnet. All samples were filtered to eliminate residues and obtain a filtrate containing the desired compounds. Filtration of the compounds extracted with dichloromethane/methanol was conducted with a vacuum pump due to the viscosity of *G. turuturu*, which is rich in polysaccharides. The filtrate was collected in a previously annotated matrass then weighed. Filtrates were then placed in a rotary evaporator (STUART RE300B Heidolph® LABOROTA 400). The solvents in the matrass were evaporated at 40 °C, and then the matrass was immediately weighed. The matrass weight difference determines the amount of solids. Lastly, compounds were recovered with methanol in a solution of 1 g.L⁻¹.

3.3.3. Bacterial strain

The pathogen *V. harveyi* strain ORM4 (Nicolas *et al.* 2002; Travers *et al.* 2008b) from the Culture Collection of the IUEM of Brest (UBO, France) was used for the experiment. Luria-Bertani broth (LB, Sigma) supplemented with extra NaCl (20 g.L⁻¹, final concentration) (LBS) was used for bacteria growing in a temperature-controlled shaker at 28 °C for 18 h at 180 rpm. Before preparing serial dilutions, the bacterial concentration was calculated with the following formula from Travers *et al.* (2008b), CFU (colony-forming unit) = (OD_t - OD_c) x 6.109 + 2.108 by optical density (OD) at 490 nm with a Mithras LB 940 spectrophotometer, where OD_t = main optical density of the strain ORM4 on LBS broth and OD_c = main optical density of control test LBS broth. Each well in the Bioscreen plates had the same bacterial content of 10⁵ CFU.mL⁻¹.

3.3.4. Antimicrobial assays

Growth of the pathogenic strain ORM4 confronted with PE and WPE monthly extracts of *P. palmata* and *G. turuturu* was monitored using a Bioscreen (C BIOSCREEN® MBR) to measure optical density at 490 nm every 30 min for 24 h. The extracts were incubated with the bacteria in 96-well plates (Falcon® VWR) at 20 °C. The temperature was selected according to the mean temperature of seawater when declines in abalone stocks on the French coast were observed in 1999 (Nicolas *et al.* 2002). Two controls were performed for every assay, the LBS medium and extracts, to ensure no influence of microbial growth. LBS medium + bacterial strain was used as a control. All the extracts and controls were tested on 6 replicates. From each extract, 10 µg of sample (PE and WPE) was transferred to plate wells in a hood and the solvent allowed to evaporate for around 30 min. During evaporation, the plates were covered with aluminum to minimize the light effect. Then 200 µL culture samples at 10⁵ CFU.mL⁻¹ were transferred to wells (6 wells per extraction/month/seaweed) for incubation for 24 h at 20 °C.

Bacterial growth curves produced by the Bioscreen are presented as OD plotted against time. After incubation, the intensity of growth in the presence of the tested compounds and controls was compared. Growth rate (Eq.1) was defined as the variation of population density occurred in different conditions compared to a control, and was calculated for each CE concentration (Bazes *et al.* 2006). Positive values of Eq.1 are seen as inhibition growth while negative values are seen as induced growth. Exponential Phase Speed Variation (EPSV, Eq.2) rate was defined as the variation of speed of bacterial growth during the exponential phase compared to control. Delay rate (Eq.3) was defined as the supplementary delay before the beginning of the exponential growth of the bacteria occurred in test samples compared to control.

$$\text{Eq.1- Growth (\%)} = 100 [(OD_c - OD_t) / OD_c]$$

$$\text{Eq.2- EPSV (\%)} = 100 [(S_c - S_t) / S_c] \text{ where } S = (OD_t - OD_{t-1}) / OD_{t-1}$$

$$\text{Eq.3- Delay (\%)} = 100 [(\lambda_c - \lambda_t) / \lambda_c]$$

where OD_c is mean optical density of the bacterial controls; OD_t : mean optical density of the test samples; S_c : speed of development of the bacterial controls; S_t : speed of development of the test samples; λ_c : appearance time (min) of maximal growth speed of the control; λ_t : appearance time (min) of maximal growth speed of the test samples.

3.3.5. NMR

One-Dimensional Proton Nuclear Magnetic Resonance (1D ^1H NMR) spectra were recorded at 25 °C on a Bruker Avance 400 spectrometer equipped with an inverse probe 5 mm triple resonance TBI $^1\text{H}/(\text{BB})/^{31}\text{P}$ to provide a global vision of the compounds forming the extracts. The spectra were obtained using a 2 s delay and scan 30 ° angle pulse. Chemical shifts are expressed in ppm relative to trimethylsilyl propionate (TSP) as an external reference.

G. turuturu and *P. palmata* extracts were tested by NMR. Samples were selected based on their activity (inhibition, activation or no effect) on bacterial growth. PE extracts were dissolved in deuterated methanol (CD₃OD) and WPE extracts in deuterated chloroform (CDCl₃), and then transferred into an NMR tube for analysis according to standard Bruker program acquisitions.

3.3.6. Statistical analysis

Extractions and biochemical analyses were performed in triplicates and antibacterial assays in sixplicates. Mean and standard deviations were calculated for each experiment. All calculations were based on measured concentrations of extracts. To compare results obtained with *G. turuturu* and *P. palmata*, statistical analyses were performed using SigmaStat software (3.1) with two-way ANOVAs followed by Holm-Sidak procedures. A *p*-value less than 0.05 was considered as significant.

3.4. Results

3.4.1. Evaluation of bacterial growth

G. turuturu PE induced the greatest inhibition with maximal values in March and December of 7.9% and 7.7%, respectively (Figure 35a). However, PE samples between August and October showed little or no inhibition of bacterial ORM4 growth. Conversely, a higher growth of bacteria was observed when PE between April and July were analyzed. The results for WPE showed increase bacterial growth all year round with a maximum in November of 4.2%, except for February and March when there was a slight percentage of ORM4 growth inhibition of 0.8% and 2.0%, respectively. The PE of *P. palmata* inhibited bacterial growth more throughout the year than *G. turuturu* (Figure 35b). Among the seasonal extracts tested, PE from January to May and also July, September and October exhibited an antibacterial activity toward the tested bacterial species, with an average of 4.5%. As with *G. turuturu*, WPE of *P. palmata*

improved bacterial growth throughout the year except in November and December, with a maximum in March of 6.3%.

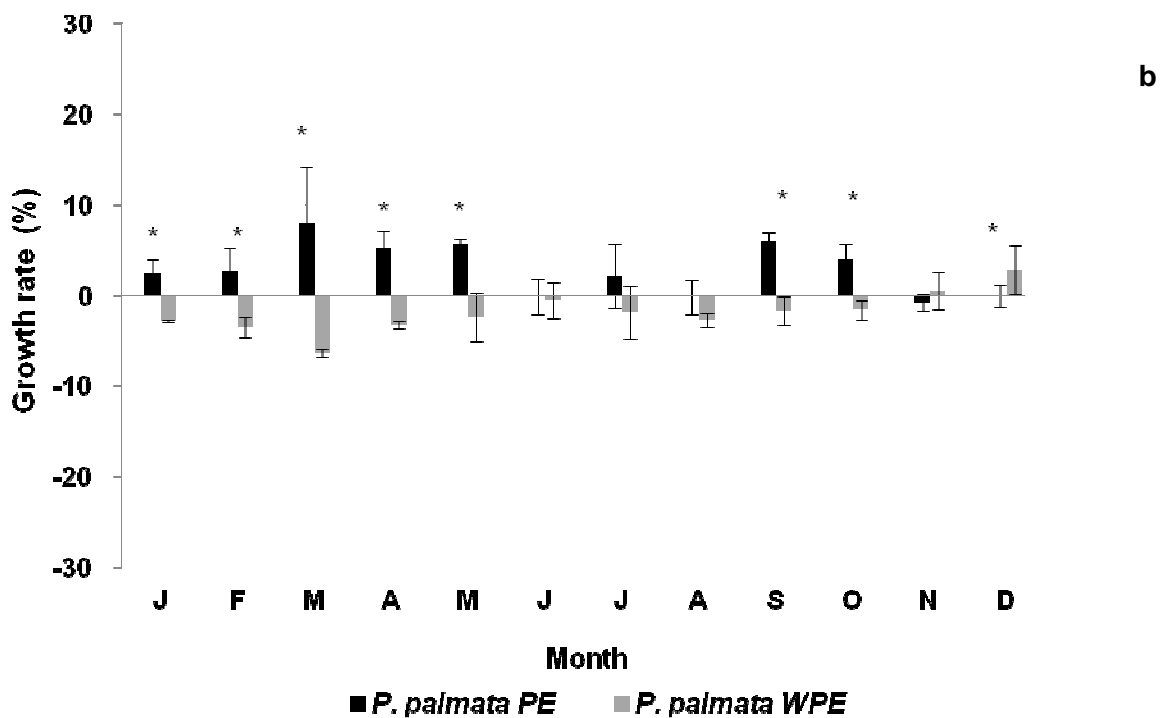
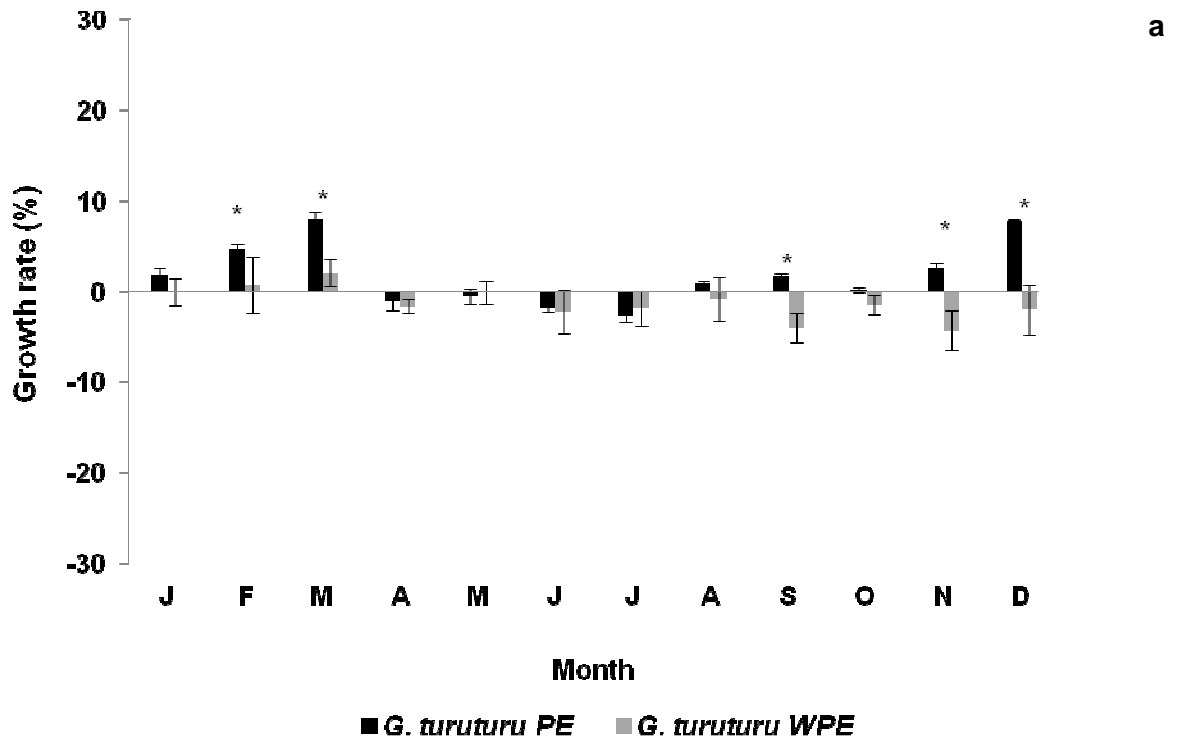


Figure 35. Percentages of growth rate of *Vibrio harveyi* strain ORM4 at 20 °C induced by PE and WPE of *Grateloupia turuturu* (a) and *Palmaria palmata* (b).

3.4.2. Evaluation of speed variation during the exponential phase

The annual trend for PE and WPE of *G. turuturu* was a decrease in the cell doubling rate with a peak for July polar compounds of 36.5% (Figure 36a). December PE showed a high peak of cell doubling of 27.9%, while September and October presented weaker percentages of 8.8% and 5.6%, respectively. Only January and February results showed a promotion of cell doubling from both extracts of 7.7% and 3.4% for PE and 8.5% and 15.1% for WPE, respectively (Figure 36a). Conversely, all *P. palmata* PE generated a decrease in the cell-doubling rate with an average of 6.0%. WPE presented a large variation throughout the year with a peak of 28.5% and 20.0% in September and October, respectively. November and December WPE presented decreased cell doubling of 12.1% and 23.9%, respectively. For the summer months of June and July, there was no change compared to the control, as shown in Figure 36b.

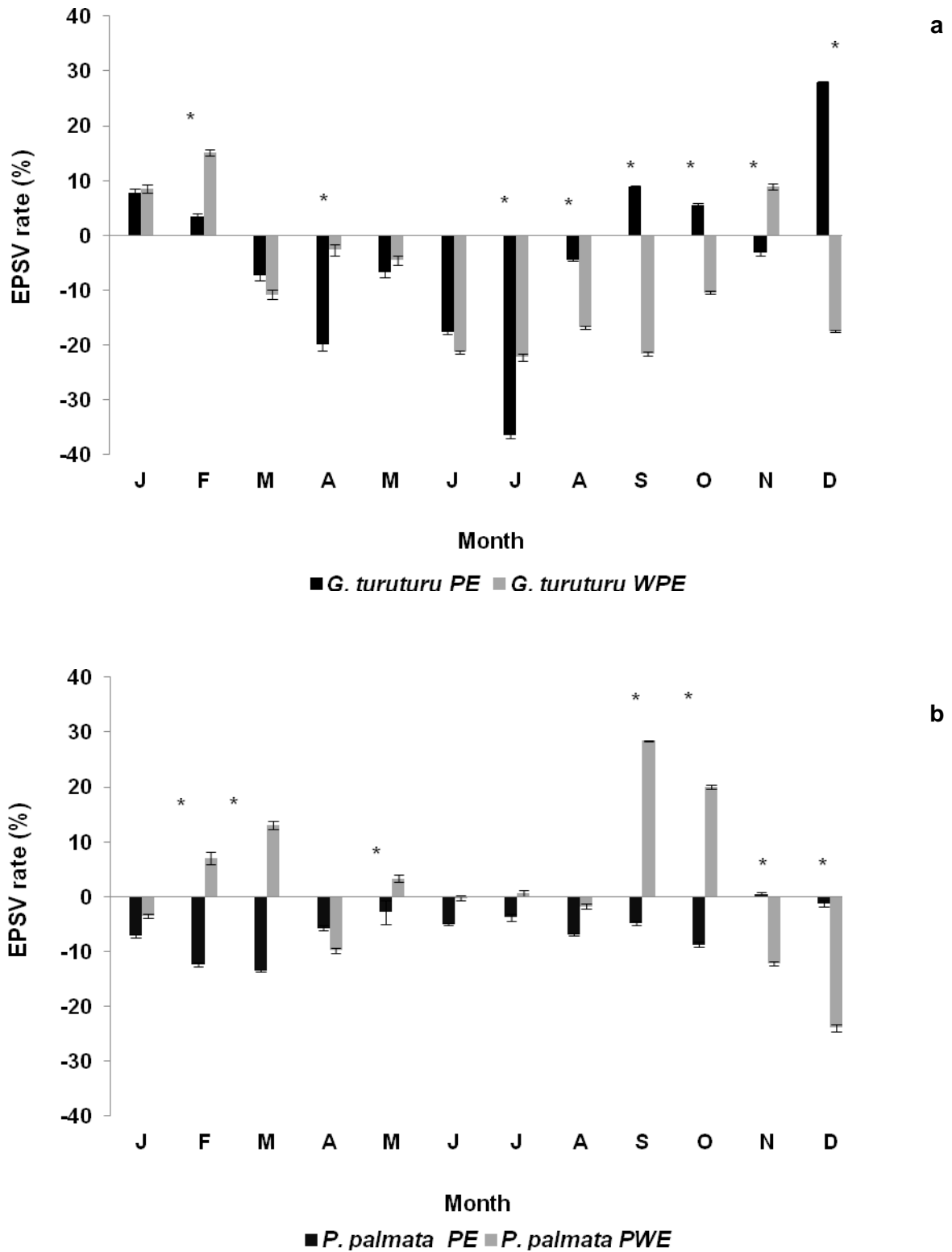
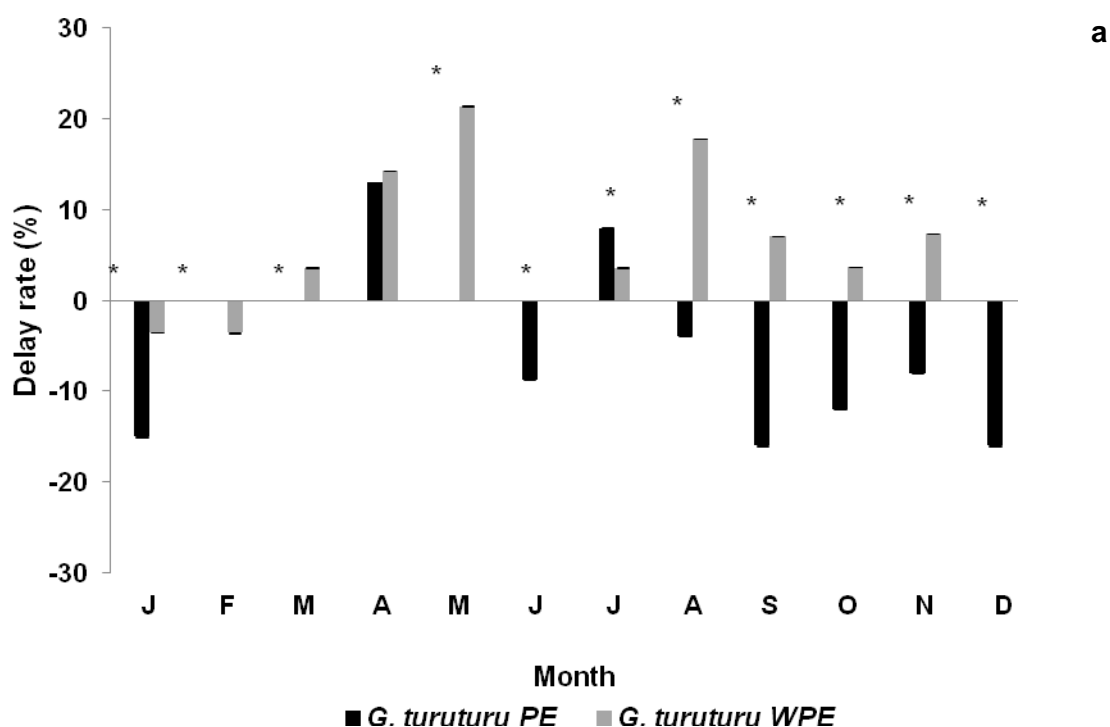


Figure 36. Percentages of EPSV rate of *Vibrio harveyi* strain ORM4 at 20 °C induced by PE and WPE of *Grateloupia turuturu* (a) and *Palmaria palmata* (b).

3.4.3. Evaluation of delay during the exponential phase

A lag time decrease of between 8.0% and 16.0% relative to the control was observed in the growth of *V. harveyi* from September to January for *G. turuturu* PE (Figure 37a). No difference in lag time appeared for February, March and May extracts compared to the control. Only April and July polar compounds showed an increase in lag time of 13.0% and 8.0%, respectively. The results observed for WPE were an increase from March to November, except for June where no difference with the control was obtained. Only January and February showed a weak decrease of around 3.5%. *P. palmata* results were more stable throughout the seasons (Figure 37b) than those for *G. turuturu*. All PE showed a decrease in lag time with an average of 6.5%; only December extracts showed no effect in comparison with the control. WPE decreased the lag time with a weaker average of 0.6%, except for January, February and August. March and November extracts showed no change with regard to the control.



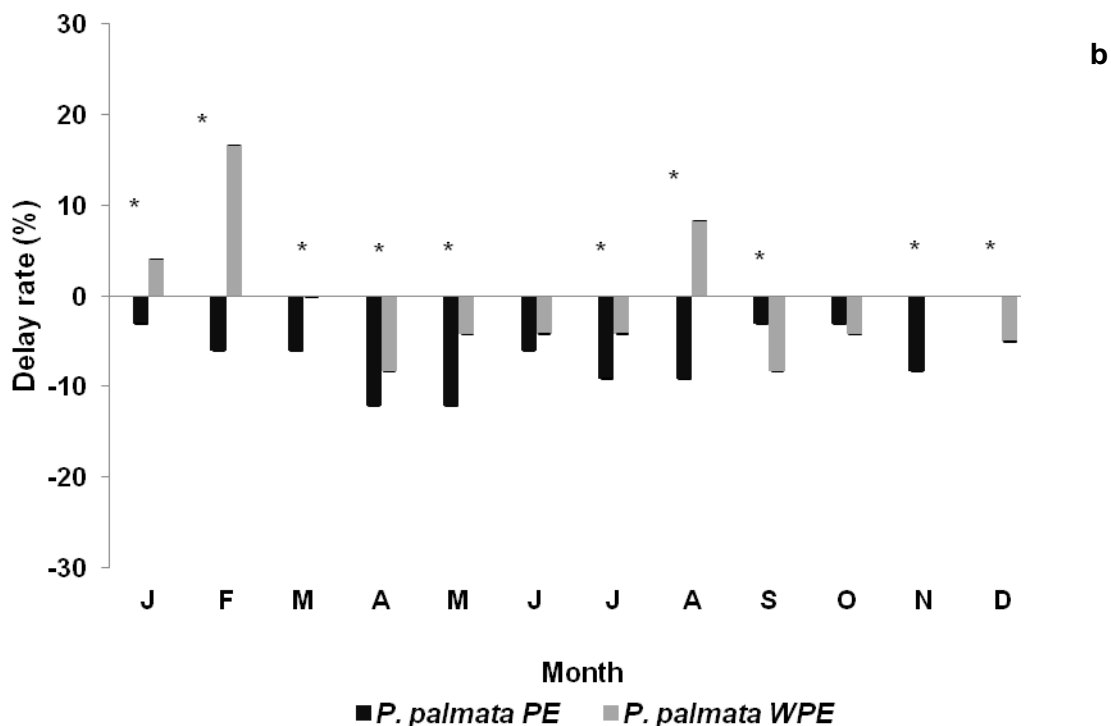


Figure 37. Percentages of delay rate of *Vibrio harveyi* strain ORM4 at 20 °C induced by PE and WPE of *Grateloupia turuturu* (a) and *Palmaria palmata* (b).

3.4.4. Nuclear magnetic resonance analysis on macroalgal extracts

¹H NMR spectra comparing inhibitor, activator and neutral samples obtained for PE and WPE of *G. turuturu* are shown in Figure 38. All the profiles were similar, with only the neutral PE spectra of *G. turuturu* showing less intense peaks.

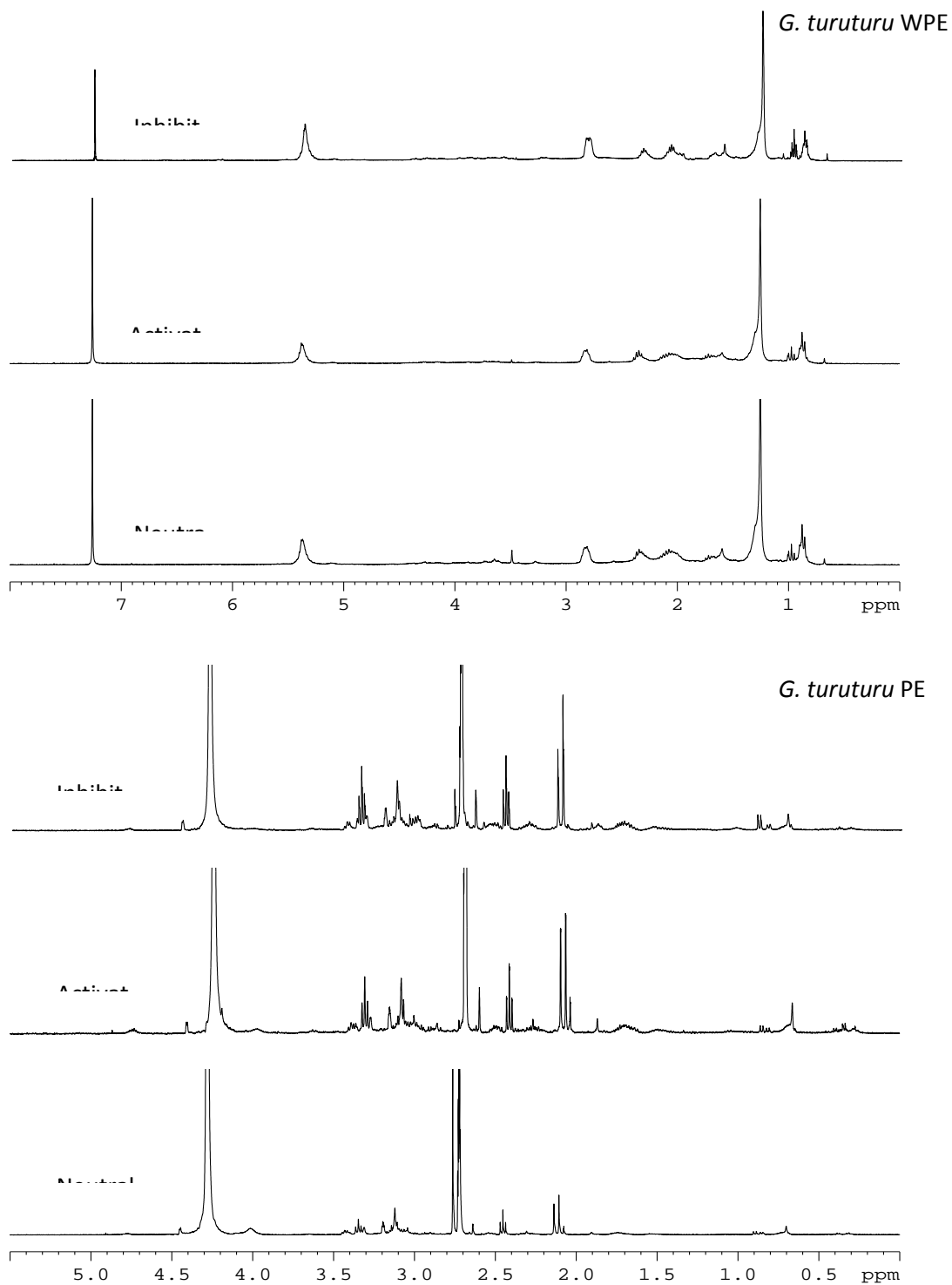


Figure 38. PE and WPE inhibitor, activator and neutral extracts of *Grateloupi turuturu* analyzed using ¹H NMR.

P. palmata ^1H NMR spectra obtained from inhibition, activation and no effect PE and WPE are shown in Figure 39.

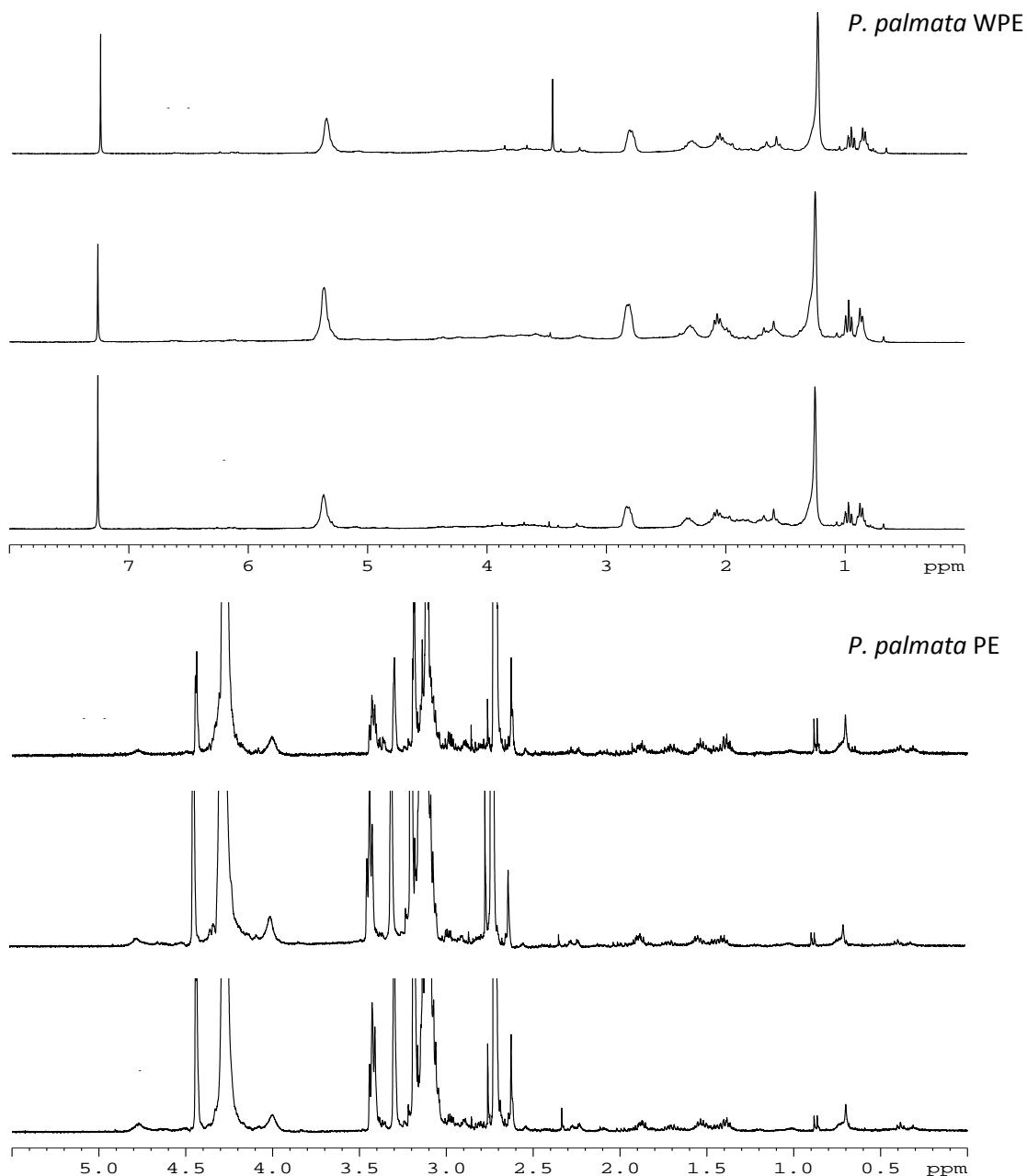


Figure 39. PE and WPE inhibitor, activator and neutral extracts of *Palmaria palmata* analyzed using ^1H NMR.

Spectra were very similar for all profiles regarding PE. Polar inhibitor spectra showed little variation in some peak intensities compared with two others. Concerning WPE *P. palmata* spectra, a peak could only be observed in the extract presenting inhibition activity. Even so, this observation was not sufficient to explain the variations in growth of bacterial strain ORM4.

3.5. Discussion

The present study confirmed the presence of active substances in extracts from the seaweed studied that have the potential to be used as a substitute for commercial antibiotics in aquaculture. The need for new solutions to prevent aquaculture disease has considerably increased since the prohibition of the use of some antibiotics. Many studies have mentioned that the extraction process plays an important role in obtaining bioactive substances (Vlachos *et al.* 1997; Val *et al.* 2001; Cox *et al.* 2010). Above all, the use of organic solvents has always provided a higher efficiency in extracting antimicrobial activities compared with water extraction (Sastry *et al.* 1994; Febles *et al.* 1995). The present study reports the antibacterial activity of interesting marine algal PE and WPE from *G. turuturu* and *P. palmata*. The response of PE (methanol/water) was found to be more effective than WPE (methanol/dichloromethane) on the growth of bacterial *V. harveyi*, in agreement with the research of Dubber *et al.* (2008). In previous studies investigating antibacterial and antifouling effects of marine seaweed, the former were detected in WPE (Hellio *et al.* 2001; Bansemir *et al.* 2006; Dubber *et al.* 2008). In contrast, in this study, the addition of WPE of *G. turuturu* and *P. palmata* in the culture medium resulted in an enhancement of the growth of *V. harveyi*. March samples of *P. palmata* showed an improved bacterial growth of 6.3% in comparison with the control strain ORM4. The rest of the WPE showed a small increase with an average of 1.3% for *G. turuturu* and 1.9% for *P. palmata*, respectively. PE from *G. turuturu* and *P. palmata* showed an antibacterial activity, with an average of 1.5% and 2.9%, respectively.

In a recent investigation (unpublished data) demonstrated the antibacterial activity of water-soluble extracts from the red alga *G. turuturu* against the same strain, ORM4. In the same study, *P. palmata* water-soluble extracts did not inhibit but increase the growth of the bacteria (unpublished data and Paillard pers.comm). In the present work, the inhibition is weaker than that presented by water-soluble extracts of *G. turuturu* with an average of 16.0%. *P. palmata* exhibited the highest inhibition in March and September with values of 7.9% and 5.9% against *V. harveyi*, respectively, in agreement with studies where antimicrobial (Hellio *et al.* 2001), antifouling (Eguía et Trueba 2007) and antioxidant (Wang *et al.* 2007) activities were demonstrated. In contrast, García-Bueno *et al.* showed a better growth of *V. harveyi*, which could reach values of 28.0% when *P. palmata* was incubated with the bacteria. *G. turuturu* PE showed the best results between November and March, with a peak in March of 7.9%, thus these seasonal results accord with those observed for *G. turuturu* water-soluble extracts where April, May and June presented the highest growth inhibition (unpublished data). Research carried out in various parts of the world with similar bacterial species, *V. anguillarum* (Naviner *et al.* 1999) and *V. parahaemolyticus* (Pang *et al.* 2006), and using different algal species showed high activity against bacterial pathogens associated with the aquaculture industry. Thus, an advantage of using algae in aquaculture is an improvement in disease resistance (Fleurence *et al.* 2012). Identification by NMR of the effective compounds revealed that the major peaks present in the spectra are not the cause of the very large variation in inhibition. This is probably due to other minor compounds not visible in the spectra and thus not characterized by our NMR analysis. As the macroalgal extracts are not characterized, further research is needed to purify and identify the active molecules responsible for this activity. Antibacterial activity in the same algal species may vary in different geographic areas and could be an indicator of the capability of seaweed to synthesize bioactive metabolites. The intraspecific variability in the production of metabolites in seaweed is seasonal, which can explain the differences shown by the biological tests.

This study has achieved an annual monitoring of the effects of polar and non-polar compounds on the growth of *Vibrio harveyi* and provided interesting results on the potential of natural molecules synthesized by *P. palmata* and *G. turuturu*, of interest to the aquaculture sector.

In conclusion, the above data provide a new way of valorizing these red algae, especially *G. turuturu*, and add new information to data already published. A large amount of biological material is needed to use natural products in aquaculture disease, which may be an important constraint. In the case of *G. turuturu*, this is not a problem because this species is proliferative and very abundant on the French coast, as has already been described (Simon *et al.* 2001). In the future, it would be interesting to characterize the metabolites in the antibacterial activity of *G. turuturu* to confirm whether they play a multiple ecological role. The exploitation of this resource constitutes an ecological and economic challenge. Indeed, the antibacterial activities highlighted in this paper and in a recent study (unpublished data), make *Grateloupia turuturu* a promising model in the search for new solutions for disease in aquaculture.

3.6. Acknowledgments

The authors are grateful to Nelly Kervarec (Service commun de RMN-RPE, UBO) who helped the first author in the description of major metabolites present on ¹H NMR spectra, and to Carol Robins for correcting the English of this paper. This project was partially funded by the Fundació "Obra Social la Caixa" through a doctoral scholarship to Nuria García-Bueno.

4. Conclusion

L'exploitation de *G. turuturu*, présente en biomasse importante le long de la côte atlantique française, constitue un défi écologique et économique. Si les travaux précédents (Chapitre II) ont montré que fournir l'algue fraîche pour assurer les besoins alimentaires des ormeaux ne présente pas d'intérêt, l'existence d'une activité antibactérienne ouvre une nouvelle voie de valorisation de cette algue rouge. L'activité antibiotique maximale enregistrée dans l'extrait hydrosoluble de *Grateloupia turuturu* n'est pas élevée, mais elle suggère la présence d'un composé avec un effet inhibiteur sur la croissance de *Vibrio harveyi*.

Nos résultats préliminaires sont prometteurs et montrent que *G. turuturu* a un potentiel antibactérien qui pourrait être utilisé pour des applications futures en aquaculture. En effet, *G. turuturu* pourrait être utilisée dans les élevages d'ormeaux sous forme d'extrait pour traiter l'eau, en forme d'aliment granulé ou co-cultivé dans un système aquacole intégré avec *Haliotis tuberculata*, grâce à ses propriétés antibactériennes potentielles contre *Vibrio harveyi*. Il sera intéressant d'approfondir la caractérisation du (ou des) métabolite(s) responsable(s) de cette activité antibactérienne. Une fois le (ou les) métabolite(s) identifié(s), il(s) devra (ont) être purifié(s) afin de caractériser sa (ou leur) nature chimique et ainsi pouvoir peut-être améliorer le niveau d'activité antibiotique.

4. Conclusión

La explotación de *G. turuturu*, presente en biomásas importantes a lo largo de la costa atlántica francesa, constituye un desafío ecológico y económico. Si el trabajo precedente (Capítulo II) demuestra que suministrar el alga fresca para asegurar las necesidades nutricionales de la oreja de mar no presenta ningún interés, la existencia de una actividad antibacteriana abre una nueva vía de valorización de esta alga roja.

La actividad antibiótica máxima registrada en los extractos hidrosolubles de Grateloupia turuturu no se muestra elevada, pero los resultados indican que existe la presencia de un compuesto inhibidor del crecimiento de Vibrio harveyi.

Nuestros resultados preliminares son prometedores, ya que muestran que G. turuturu posee un potencial antibacteriano que podría ser utilizado en aplicaciones futuras en acuicultura. Así, G. turuturu podría aplicarse a criaderos de oreja de mar en forma de extracto en el tratamiento del agua, en forma de alimento artificial o en co-cultivo formando parte de un sistema integrado junto con Haliotis tuberculata, gracias a sus propiedades antibacterianas contra Vibrio harveyi. Sería interesante también profundizar en la caracterización del/los metabolito/s responsable/s de esta actividad antibacteriana y una vez identificado/s, purificado/s con el objeto de caracterizar su naturaleza química y poder eventualmente mejorar su nivel de actividad antibiótica.

Chapitre IV

Test d'infection par baignade de deux sous-espèces d'ormeaux européens, *Haliotis tuberculata tuberculata* et *Haliotis tuberculata lamellosa*, par la souche photogène ORM4 de *Vibrio harveyi*

CHAPITRE IV : Test d'infection par baignade de deux sous-espèces d'ormeaux européens, *Haliotis tuberculata tuberculata* et *Haliotis tuberculata lamellosa*, par la souche pathogène ORM4 de *Vibrio harveyi*

1. Contexte de l'étude

Dans les systèmes de production de type aquacole, il existe une grande diversité bactérienne. C'est le genre *Vibrio* qui représente le groupe le plus important en raison de sa pathogénicité et son abondance. Ainsi, la principale maladie bactérienne infectieuse trouvée chez de nombreux mollusques dans les populations naturelles et en élevage est la vibriose, celle-ci les affectant quel que soit leur stade de développement (larve, juvénile ou adulte). Cette famille peut se rencontrer dans l'eau de mer et d'eau douce mais également dans la flore intestinale de nombreux animaux aquatiques. Les vibrions se développent en concentrations élevées lorsque la température de l'eau atteint des valeurs entre 17 et 20 °C. Par contre, à basse température, ils restent dans le sédiment des fonds marins à des concentrations inférieures à celles nécessaires pour déclencher une infection.

Dans les élevages d'ormeaux, les Vibrionaceae sont les bactéries les plus fréquemment isolées (Sawabe *et al.* 1998; Liu *et al.* 2000; Nicolas *et al.* 2002; Liu *et al.* 2004; Cai *et al.* 2007). Leur présence dans les élevages est normale, et ne représente qu'un risque latent devenant une réelle menace quand les ormeaux souffrent notamment de situations stressantes (manipulations, gamétogénèse...).

Dans ce quatrième chapitre deux expériences d'infection ont été réalisées *in vivo* par baignade en utilisant la souche pathogène ORM4 de *V. harveyi*. La première avait pour objectif de valider l'activité antibactérienne mise en évidence *in vitro* avec les

extraits hydrosolubles de *G. turuturu*. La deuxième expérience a consisté à tester la sensibilité de la sous-espèce méditerranéenne *Haliotis tuberculata lamellosa* chez qui la vibriose n'a jamais été décrite.

L'ensemble de ce travail fera l'objet de deux publications et est donc présenté sous cette forme.

CAPÍTULO IV: Test de infección por inmersión de dos especies de oreja de mar europea, Haliotis tuberculata tuberculata y Haliotis tuberculata lamellosa, por la cepa patógena ORM4 de Vibrio harveyi

1. Contexto del estudio

En los sistemas de producción acuícolas existe una gran diversidad bacteriana y es el género Vibrio el que representa el grupo más importante en cuanto a su patogenicidad y su abundancia. Así, la principal enfermedad infecciosa encontrada en numerosas especies de moluscos de poblaciones naturales y de criadero, es la vibriosis. Esta afecta los individuos en cualquiera de sus estados del desarrollo (larva, juvenil o adulto). Podemos encontrar esta familia en agua marinas y dulces e, igualmente, formando parte de la flora intestinal de numerosos animales acuáticos. El Vibrio se desarrolla en concentraciones elevadas cuando la temperatura del agua alcanza valores entre los 17 °C y los 20 °C. Sin embargo, a bajas temperaturas, permanecen en el sedimento de los fondos marinos en concentraciones inferiores a las necesarias para desencadenar una infección.

En los criaderos de oreja de mar, los Vibrionaceae son las bacterias más frecuentemente aisladas (Sawabe et al. 1998; Liu et al. 2000; Nicolas et al. 2002; Liu et al. 2004; Cai et al. 2007). Su presencia en los criaderos es normal, pero esta

representa una amenaza potencial para las orejas de mar, especialmente cuando pasan por situaciones estresantes (manipulación, gametogénesis...).

En este cuarto capítulo, se presenta la realización de dos ensayos de infección in vivo por inmersión utilizando la cepa ORM4 de V. harveyi. El primero tiene por objetivo comprobar la actividad antibacteriana que ya había sido probada in vitro gracias a los extractos hidrosolubles de G. turuturu. El segundo ensayo se llevó a cabo para mostrar la posible sensibilidad de la sub-especie mediterránea Haliotis tuberculata lamellosa, para la que la vibriosis nunca ha sido descrita.

El conjunto de este trabajo formará parte en el futuro de dos publicaciones científicas, por lo que en el presente lo presentamos de esta manera.

2. Effet d'un extrait hydrosoluble de *Grateloupia turuturu* sur l'infection par balnéation de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata tuberculata* avec la souche pathogène ORM4 de *Vibrio harveyi*

Nuria García-Bueno, Priscilla Decottignies, Vincent Turpin, Justine Dumay, Agnès Travers, Arnaldo Aitor Marín-Atucha, Joël Fleurence.

2.1. Introduction

L'apparition des maladies dans les élevages aquacoles est une préoccupation majeure pour le développement durable de la filière. L'augmentation de la production aquacole et son intensification ont conduit à une forte prévalence des maladies causées par des virus, bactéries et autres agents pathogènes (Bondad-Reantaso *et al.* 2005). Parmi elles, nombreuses sont celles causées par des bactéries pathogènes (Defoirdt *et al.* 2004), le genre *Vibrio* étant le plus présent dans les élevages de poissons, d'ormeaux, d'oursins et d'huîtres (Nicolas *et al.* 2002; Vandenberghe *et al.* 2003). Malgré quelques exemples de réussite d'utilisation des vaccins en aquaculture afin de prévenir l'apparition d'infections bactériennes chez les poissons, le recours aux antibiotiques s'est largement généralisé, en particulier dans l'industrie de l'écloserie (Bachère 2003). Le développement de diverses solutions contre les maladies, autres que l'utilisation d'antibiotiques, est aujourd'hui une priorité. Par exemple, certains probiotiques permettent de limiter ou inhiber la croissance des espèces pathogènes du genre *Vibrio* (Kesarcodi-Watson *et al.* 2008; Wang *et al.* 2008; Prado *et al.* 2010; Jiang *et al.* 2013). De nombreuses études se sont centrées sur l'étude des macroalgues comme source de métabolites bioactifs inhibiteurs de la croissance bactérienne (Arun Kumar et Rengasamy 2000; Val *et al.* 2001; Freile-Pelegrin et Morales 2004; Bansemir *et al.* 2006; Pang *et al.* 2006; Plouguerné *et al.* 2008; Goecke *et al.* 2010). Une amélioration notable de la résistance à la vibriose a ainsi été obtenue chez les crevettes suite à l'utilisation de plusieurs macroalgues telles *Sargassum hemiphyllum*, *Gelidium amansii*,

Gracilaria tenuistipitata, *Gracilaria textorii*, *Gracilaria fisheri* et *Ulva fasciata* (Hou et Chen 2005; Fu *et al.* 2007; Huynh *et al.* 2011; Kanjana *et al.* 2011; Selvin *et al.* 2011; Siirustananun N *et al.* 2011). Celles-ci ont été utilisées sous forme d'apport alimentaire, d'injection des extraits algaux dans les animaux ou d'immersion des animaux dans une eau contenant des extraits algaux.

En halioticulture, une étude menée par des chercheurs japonais a montré l'activité de la macroalgue rouge *Gracilaria textorii*, contre des bactéries du genre *Vibrio* dans un système de co-culture macroalgue-ormeau (Liu et Pang 2010). D'autres travaux de la même équipe ont mis en évidence que des thalles de la macroalgue rouge *G. turtururu* immergés dans des bacs contenant la bactérie pathogène *Vibrio parahaemolyticus* inhibaient la croissance de celle-ci (Pang *et al.* 2006). De plus, des extraits hydrosolubles de *G. turtururu* ont montré une activité inhibitrice *in vitro* sur la croissance de la souche pathogène ORM4 de *V. harveyi* (García *et al.*, 2014). Dans le contexte d'une possible future utilisation de cette algue rouge dans l'aquaculture de l'ormeau européen *H. tuberculata*, les effets de l'activité d'extraits hydrosolubles de *Grateloupia turtururu* ont été testés sur la croissance de la souche ORM4 de la bactérie pathogène *V. harveyi*.

2.2. Matériel et méthodes

2.2.1. Récolte des algues et extraction

La macroalgue rouge *Grateloupia turtururu* Yamada 1941 (Rhodophyta, Halymeniaceae) a été récoltée en Avril, Mai et Juin 2011, dans la zone médiolittorale de Batz-sur-Mer (47°16'34.82" N 2°29'36.64" O, Côte Atlantique, France). Ces dates d'échantillonnage sont celles pour lesquelles des extraits hydrosolubles issus de *G. turturu* ont présenté les plus fortes activités antivibrio *in vitro* (García-Bueno *et al.*, 2014). Les thalles récoltés ont été successivement rincés avec de l'eau de mer, de l'eau du robinet et de l'eau distillée avant d'être lyophilisés. Ces échantillons ont ensuite été broyés dans l'azote liquide. La poudre fine obtenue a été utilisée pour l'extraction des composées hydrosolubles pendant 20 minutes

dans un rapport 1/20 (masse/volume) de tampon phosphate (20 mM; pH 7,1) avant d'être centrifugée à 25 000 g à 4 °C pendant 20 minutes. Le surnageant a ensuite été conservée à -20 °C jusqu'à utilisation.

2.2.2. Animaux expérimentaux

Cent quatre-vingt ormeaux de la sous-espèce *Haliotis tuberculata tuberculata* (56.0 ± 2.2 mm, 23.7 ± 1.6 g, 2 ans) en provenance de l'entreprise d'élevage aquacole France Haliotis (Plouguerneau, Côté Atlantique Nord, France) ont été ramenés au laboratoire IFREMER de La Tremblade en Avril 2014.

2.2.3. Acclimatation et désinfection

Les ormeaux ont été acclimatés au laboratoire pendant huit semaines avant le début des expériences. Pendant la période d'acclimatation, les animaux ont été stockés dans deux bacs de 110 L alimentés en continu avec de l'eau de mer filtrée, aérée et traitée aux UV.

La température de l'eau était de 15.4 °C au début de l'expérience. Des augmentations progressives de la température de 1,5 °C tous les deux jours ont été réalisées jusqu'à atteindre la température de 18 °C, désirée pour l'infection. La température a ensuite été maintenue à 18 jusqu'à la fin des manipulations.

En ce qui concerne la salinité, celle-ci était de 31.5 pendant toute l'expérimentation.

Les animaux ont été alimentés *ad libitum* pendant cette période avec de la nourriture formulée pour ormeaux (provenant de l'entreprise Le Gouessant, Bretagne) afin d'éviter de possibles infections bactériennes pouvant venir des macroalgues qui auraient été récoltées en milieu naturel.

Pour s'assurer de l'absence d'infection bactérienne préexistante chez les animaux, un traitement antibiotique leur a été appliqué selon le protocole de Handler (2006). Pendant les cinq derniers jours d'acclimatation, une dose d'oxytétracycline de 200 mg.kg⁻¹.jr⁻¹ a ainsi

été administrée par balnéation chaque matin. Un renouvellement d'eau était alors effectué une fois par jour le soir.

2.2.4. Souche bactérienne

La souche pathogène ORM4 de *V. harveyi*, isolée en 2002 chez des ormeaux moribonds de la sous-espèce *H. tuberculata tuberculata* en Normandie (France), a été utilisée dans les expérimentations (Nicolas *et al.* 2002). La souche bactérienne a été cultivée à 22 °C sous agitation à 100 rpm pendant 18 h dans du milieu Luria-Bertani enrichi en sel (LBS) à une concentration final en NaCl de 20 g.L⁻¹) et lavée deux fois dans l'eau de mer filtrée et stérile (EMFS). La concentration de la suspension bactérienne a ensuite été déterminée par lecture de la DO à 600 nm et ajustée par dilution dans EMFS à 10⁵ UFC.mL⁻¹.

2.2.5. Infection bactérienne

Après la phase d'acclimatation, dix-huit groupes de 10 ormeaux chacun ont été maintenus dans des bacs de 3 L pendant deux semaines dans les conditions expérimentales de la phase d'infection à venir, à savoir sans alimentation, à une température de 18 °C et avec des changements d'eau journaliers matinaux. Deux conditions différentes ont été évaluées :

- « **Effet antibiotique de *G. turuturu*** » : un extrait hydrosoluble de *G. turuturu* a été déposé dans chacun de six bacs.

- « **Effet sans extrait de *G. turuturu*** » : Durant toute l'expérience aucun extrait d'algue n'a été déposé dans ces six bacs. Seulement la souche pathogène ORM4 était présente.

Pour chaque condition, trois lots contrôles et trois lots tests ont été utilisés. Les lots test ont été exposés pendant 24 h dans un bain de *V. harveyi* ORM4 à 10⁵ CFU.mL⁻¹

(concentration finale) dans EMFS. Un suivi de mortalité a été effectué deux fois par jour tout au long de cette phase d'infection, les ormeaux moribonds ou morts étant retirés des lots.

2.2.6. Identification bactérienne

La détection de *V. harveyi* dans les ormeaux moribonds ou morts retirés des lots, a été effectuée selon le protocole de Travers et al. (2009). L'hémolymphe a été extraite du sinus céphalique situé à l'avant du muscle pédieux à l'aide d'une aiguille de calibre 25 et d'une seringue de 5 mL (Figure 40), étalée sur du milieu LBS et cultivée pendant 24 à 48 h à 28 °C pour identification (Figure 41).

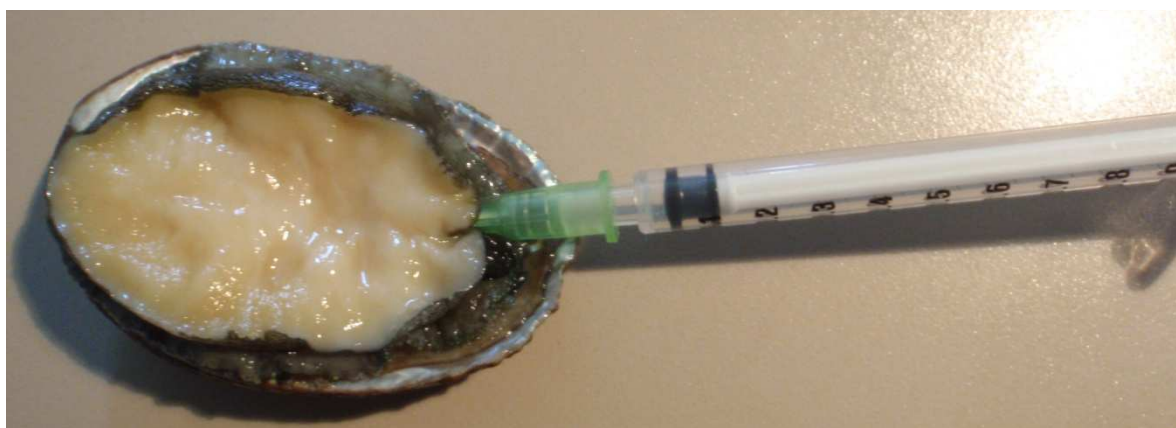


Figure 40. Extraction de l'hémolymphe du sinus céphalique d'un ormeau moribond.

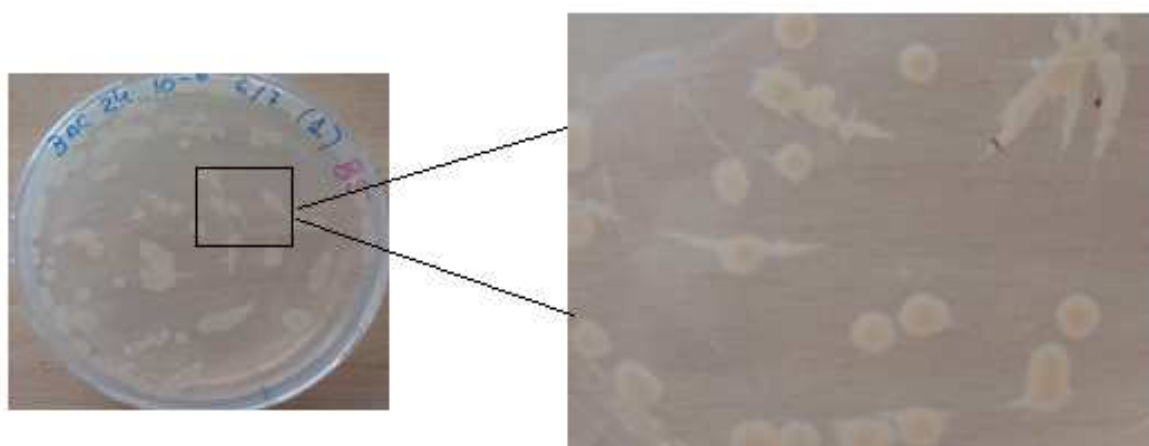


Figure 41. Colonies bactériennes développées après étalement de l'hémolymphe extraite du sinus d'un ormeau moribond.

2.2.7. PCR quantitative (QPCR)

Des analyses en QPCR ont été réalisées afin de déterminer la présence ou non de *Vibrio harveyi* dans l'eau de mer des lots où des extraits de *G. turuturu* avaient été ajoutés depuis le premier jour. Des échantillons d'eau de chacun de ces lots ont donc été récupérés chaque jour afin d'en extraire l'ADN. Une fois l'extraction d'ADN de l'échantillon réalisé, 5 µL de ce dernier et 15 µL d'un mélange pour QPCR ont été distribués dans chaque puits de la plaque. La composition du mélange pour QPCR était la suivante : 440 µL de 2X Mastermix Ultrafast Brilliant III, 160 µL d'H₂O, 2.64 µL de l'amorce ToxRF1 100 µM, 2.64 µL de l'amorce ToxR R1 100 µM et 1.76 µL de ToxR P1 probe 100 µM. Des contrôles négatifs ont été réalisés avec de l'eau de qualité biologie moléculaire (5 µL pour 15 µL de mix de PCR en temps réel), permettant de détecter des contaminations potentielles des réactifs ou de l'environnement.

2.3. Résultats

2.3.1. Mortalités des ormeaux

Des mortalités plus importantes ont eu lieu en présence de l'extrait de *Grateloupia turuturu*. Cinq jours après l'infection, un pourcentage de mortalité de 33.3% a été mis en évidence pour les lots test contenant l'extrait d'algue tandis que pour les lots sans extrait, seulement 10% de mortalité a été observé (Figure 42).

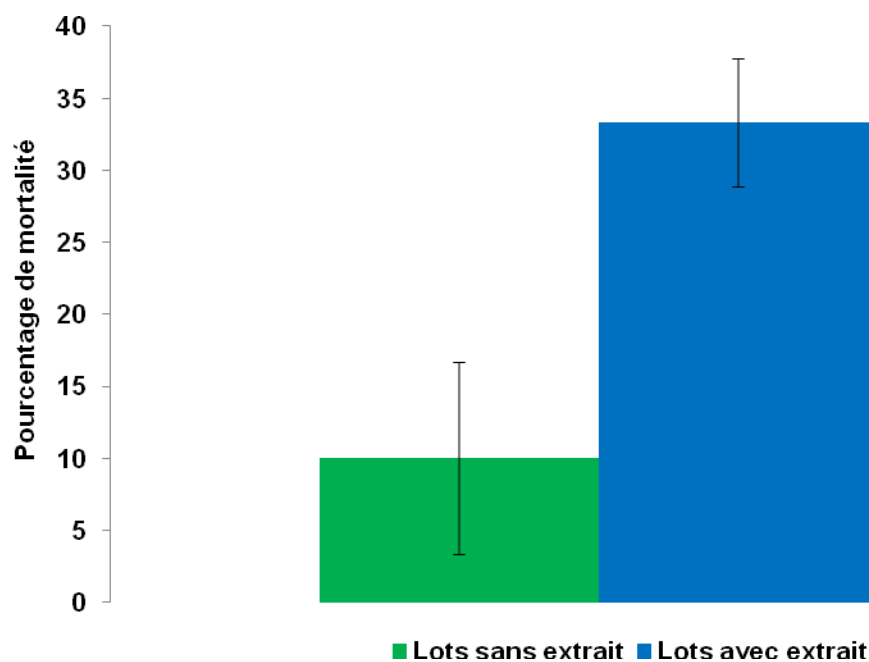


Figure 42. Pourcentage de mortalité des ormeaux après cinq jours d'expérience. Les moyennes sont présentées avec leur écart-type.

À la fin de l'expérimentation les mortalités cumulées ont été estimées. Les résultats ont montré des mortalités plus importantes pour les lots tests où l'extrait d'algue était présent (Figure 43). Pour ces derniers, une mortalité de 60% a été enregistrée au bout 9 neuf jours, contre 36% pour les lots sans l'extrait. Les taux de survie dans tous les lots contrôles étaient de 100%.

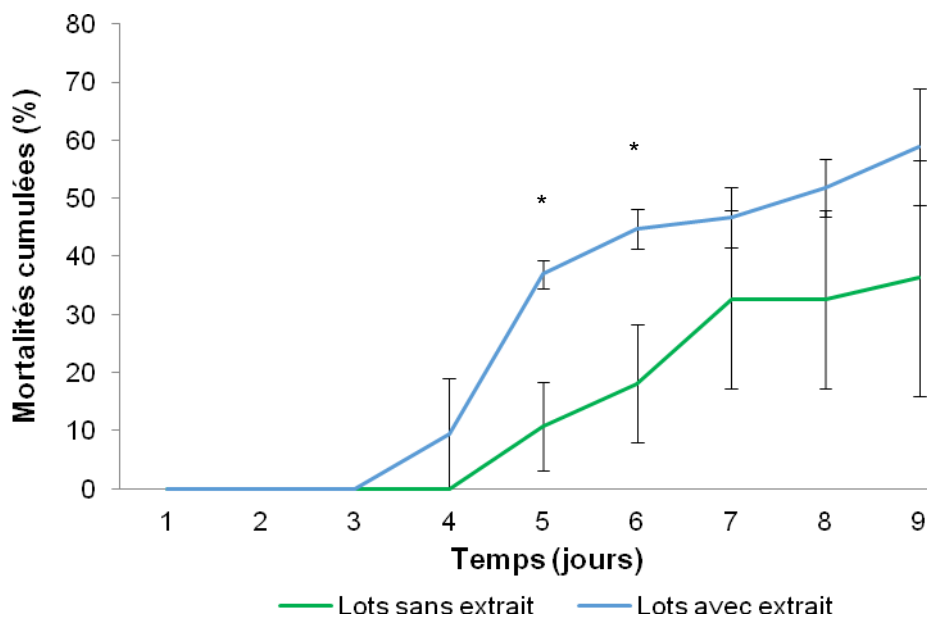


Figure 43. Suivi de la mortalité des ormeaux de la sous-espèce *Haliotis tuberculata tuberculata* à partir de la balnéation pendant 24 h (J0) avec *V. harveyi*. Les moyennes sont présentées avec leur écart-type, * = différence significative.

Le premier symptôme observé chez les animaux des lots tests a été une perte de tonicité du muscle pédieux, qui s'est accompagné rapidement de l'apparition de pustules blanches (Figure 44). Ces dernières étaient présentes chez tous les animaux moribonds ou morts. Les tests réalisés sur l'hémolymphe (étalement dans du milieu LBS) de tous les animaux moribonds et morts ont permis d'établir la présence de *Vibrio harveyi* comme agent causal de leur mortalité.

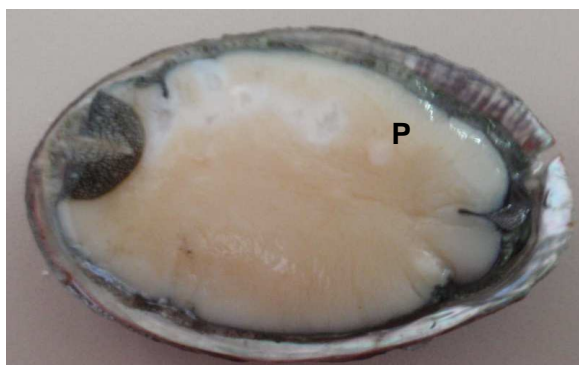


Figure 44. Ormeau moribond présentant des pustules blanches (P) caractéristiques de l'infection par *V. harveyi*.

2.3.2. Identification et quantification de *Vibrio harveyi* dans les lots

Les résultats des analyses par QPCR de l'eau ont montré que les lots contenant les extraits hydrosolubles de *Grateloupia turuturu* présentaient une quantité de *V. totaux* (Figure 45) ainsi que de *V. harveyi* (Figure 46) inférieure à celle des lots contrôles. Les tests ont été réalisés sur deux jours différents, résultant des profils de croissance similaires pour *V. harveyi* et *V. totaux*. La quantité de *V. harveyi* dans les lots avec l'extrait était significativement différente les deux jours par rapport au contrôle, tandis que pour *V. totaux* cela ne l'était que le J+3.

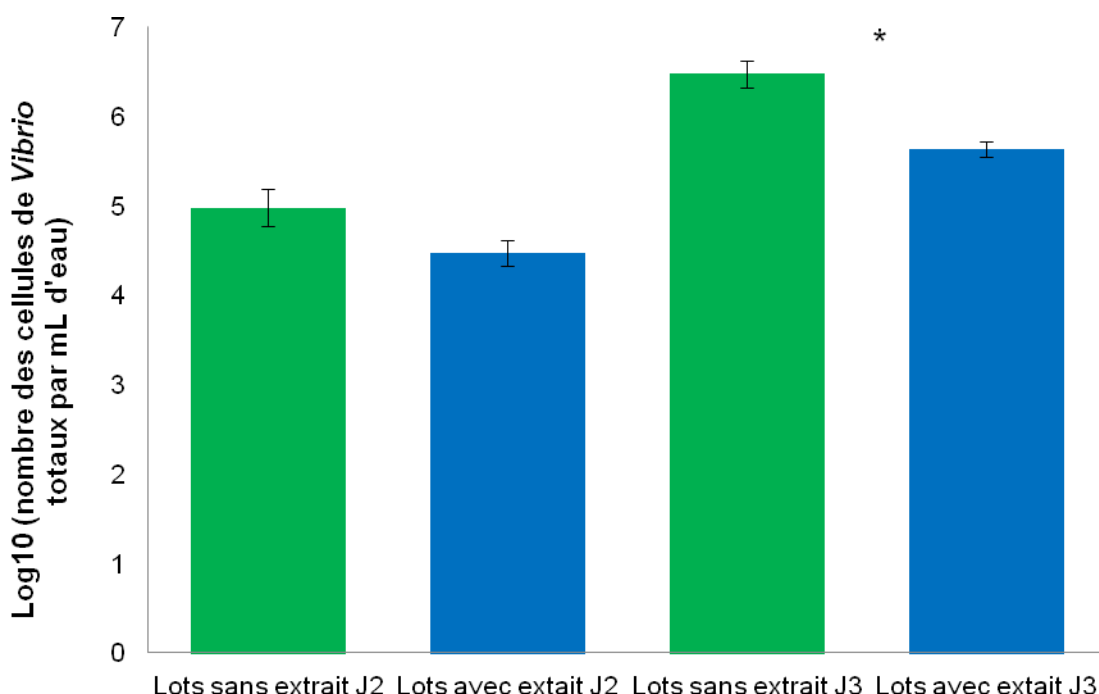


Figure 45. Quantité de *Vibrio* totaux présente dans l'eau à J2 et J3, exprimée en log10 de la concentration, en présence ou non de l'extrait hydrosoluble de *Grateloupia turuturu*. Les moyennes sont présentées avec leur écart-type, * = différence significative.

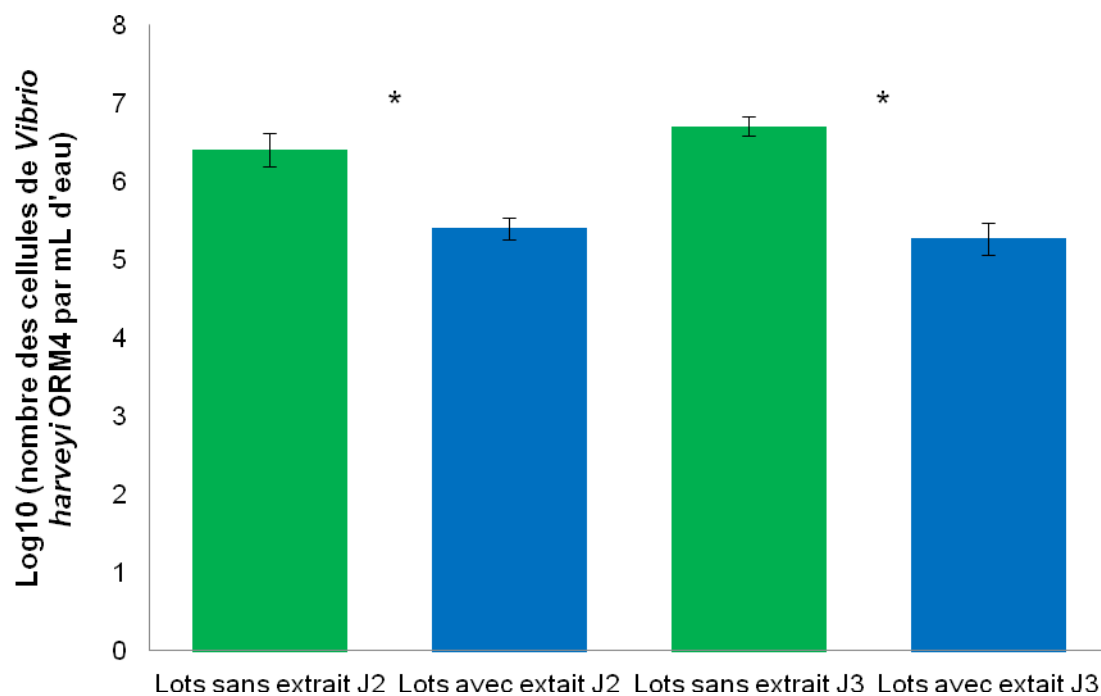


Figure 46. Quantité de *Vibrio harveyi* présente dans l'eau à J2 et J3, exprimée en log10 de la concentration, en présence ou non de l'extrait hydrosoluble de *Grateloupia turuturu*. Les moyennes sont présentées avec leur écart-type, * = différence significative.

2.4. Discussion

Lors de l'infection par balnéation de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata* avec la souche ORM4 de la bactérie pathogène *Vibrio harveyi*, la présence d'un extrait hydrosoluble de *Grateloupia turuturu* a diminué significativement la quantité d'ADN bactérien présent dans le milieu, en particulier celui de cette souche. Ce résultat confirme l'activité antibactérienne de *G. turuturu* qui avait été mise en évidence par des chercheurs japonais (Pang *et al.* 2006) en utilisant des thalles entiers et un autre vibron *Vibrio parahaemolyticus*. Il corrobore également *in vivo* et dans les conditions d'élevage de l'ormeau l'effet inhibiteur sur la croissance bactérienne qui avait été trouvé *in vitro* avec le même type d'extrait (Garcia-Bueno *et al.*, 2014). Cette algue présente donc un intérêt dans la lutte contre la bactérie *Vibrio harveyi* pathogène de l'ormeau européen.

Cependant, dans les bacs où était présent l'extrait hydrosoluble, la mortalité des ormeaux a été supérieure à celle obtenue sans l'extrait. Ce résultat peut être expliqué soit par une

virulence accrue de la bactérie dont les facteurs de virulence seraient stimulés par des molécules présentes dans l'extrait, soit par une plus grande sensibilité des ormeaux à l'infection en présence de l'extrait. Ce constat est contradictoire avec l'utilisation de *Grateloupia turuturu* sous cette forme pour combattre le pathogène *V. harveyi* dans les élevages.

Les macroalgues sont utilisées avec succès dans des systèmes intégrés où elles sont co-cultivées avec des animaux. Elles peuvent alors avoir un impact sur les propriétés microbiologiques de l'eau dans les systèmes d'élevages (Troell *et al.* 2003) et en particulier modifier la communauté bactérienne, à la fois en quantité et en composition, et donc l'exposition des animaux aux vibrioses. De plus, dans ces systèmes intégrés, les algues sont utilisées pour assurer d'autres fonctions possibles : filtre biologique supprimant les nutriments inorganiques, producteur d'oxygène permettant le maintien de l'équilibre biologique et comme source d'aliment (Neori *et al.* 2003; Schuenhoff *et al.* 2003). Un exemple de réussite de ce type de système a été démontré par Evans et Langdon (2000) avec la culture de la macroalgue rouge *Palmaria mollis* et de l'ormeau rouge *Haliotis rufescens*. Dans ce système, l'ammoniaque libéré par les ormeaux est assimilé par l'algue et converti en biomasse algale qui est ensuite redistribuée aux animaux. Un autre exemple est la co-culture de la dorade royale *Sparus aurata*, de l'ormeau noir *Haliotis discus hannai* et de l'algue *Ulva lactuca* (Neori *et al.* 2003). L'azote et le phosphate inorganique libérés par les poissons sont ensuite utilisés pour la production de biomasse algale utilisée comme aliment pour l'ormeau.

Mais il apparaît, au vu du Chapitre II, que fournir l'algue sous forme fraîche n'est pas adapté. Celle-ci pourrait être fournie sous la forme d'un aliment artificiel formulé à partir de l'algue entière provenant des systèmes intégrés (permettant le traitement de l'eau).

Il peut être également envisagé d'approfondir la recherche du (ou des) métabolite(s) responsable(s) de l'activité antibactérienne. Ce (ou ces) métabolite(s) identifié(s) et purifié(s) pourra (ou pourront) être utilisé(s) pour traiter l'eau.

3. La sous-espèce d'ormeaux européens *Haliotis tuberculata lamellosa* est-elle sensible à la souche pathogène ORM4 de *Vibrio harveyi*?

Nuria García-Bueno, Priscilla Decottignies, Vincent Turpin, Justine Dumay, Agnès Travers, Arnaldo Aitor Marín-Atucha, Joël Fleurence.

3.1. Introduction

Selon la FAO, la consommation mondiale de poissons, mollusques et crustacés pourrait s'établir à 179 millions de tonnes en 2015. L'essentiel de cette demande devra être satisfait par l'aquaculture, qui pourrait assurer 39 % de la production totale en 2015 (FAO 2007; 2011). L'apparition de maladies dans les élevages, liée au développement spectaculaire de l'aquaculture ces trois dernières décennies de façon intensive, reste une préoccupation majeure pour les entreprises aquacoles. Pour ces raisons, ces maladies doivent bénéficier d'une attention et d'un effort de recherche particuliers pour tenter d'en réduire l'impact économique et environnemental. Parmi les maladies identifiées, les responsables des plus grosses pertes en aquaculture sont les pathologies infectieuses (Murray et Peeler 2005). Celles-ci influent sur la survie des animaux conduisant à la perte d'une partie ou de la totalité des productions en élevage mais également les performances zootechniques en affectant plus particulièrement la croissance des animaux. Le réchauffement climatique est souvent associé à une augmentation de l'incidence des maladies touchant les populations en élevage mais aussi en milieu naturel (Degerman *et al.* 2013). De nombreuses bactéries marines pathogènes, comme les vibrions, prolifèrent dans les eaux chaudes (Vezzulli *et al.* 2013). Ce réchauffement climatique global est donc le moteur de l'émergence de maladies causées par ce type de bactéries plus particulièrement aux hautes latitudes (Baker-Austin *et al.* 2013). Les bactéries du genre *Vibrio* sont les agents responsables des maladies les plus

fréquentes et les plus graves dans l'aquaculture des mollusques du monde entier (Shruti 2012). En fait, ces bactéries sont souvent considérées comme des opportunistes se développant dans les conditions intensives d'élevage ou lors d'événements climatiques particuliers (Wendling et Wegner 2011; Frydenborg *et al.* 2014). Les vibrioses sont décrites chez les trois principales classes de mollusques (Gastéropodes, Céphalopodes et Bivalves). Ainsi, chez les ormeaux plusieurs espèces de *Vibrio* ont été isolées lors d'épisodes de mortalités en Australie, Japon, France, Chine, Afrique du Sud (Nicolas *et al.* 2002; Anguiano-Beltrán *et al.* 2012; Jiang *et al.* 2013). Ces épisodes sont associés à des souches virulentes de *Vibrio* provoquant différents symptômes : pustules blanches (Li *et al.* 1998; Nicolas *et al.* 2002), abcès ou ulcères du manteau (Liu *et al.* 2000; Lee *et al.* 2002), syndrome de blanchissement (Liu *et al.* 2000; Huang *et al.* 2001) et perte de tonicité des muscles, des tentacules et de la bouche (Elston 1983). L'hémolymphe et les organes des animaux malades sont infectés par une grande quantité de bactéries. Les tissus apparaissent dégénérés et nécrosés par les bactéries qui semblent se développer en suivant le trajet du système nerveux (Travers 2008). Certaines conditions environnementales et plus particulièrement les conditions présentes en élevage intensif, stressantes pour les animaux, favorisent les interactions entre pathogènes et animaux (Travers *et al.* 2009).

En Europe, parmi les trois sous-espèces d'ormeaux européens, *Haliotis tuberculata tuberculata* semble être la seule touchée par *V. harveyi*, que cela soit dans les populations naturelles ou en élevage. Un lien direct a été démontré entre la température de l'eau de mer et l'émergence de cette vibriose (Travers *et al.* 2009).

Dans tous les cas décrits depuis 1998 sur les côtes françaises, les mortalités ont eu lieu lorsque la température de l'eau de mer dépassait le seuil de 17°C (Nicolas *et al.* 2002). Alors que la température de l'eau de mer présente des valeurs supérieures à 18 °C pendant de longues périodes de l'année sur les côtes des Îles Canaries, des Açores et de la Méditerranée, aucune épisode de mortalité anormale n'a été signalée chez les deux sous-espèces y habitant, *Haliotis tuberculata coccinea* et *Haliotis tuberculata lamellosa*. Des

études menées par des chercheurs français ont pu démontrer que durant la gamétogénèse les ormeaux de la sous-espèce *H. tuberculata tuberculata* présentent un phénomène d'immunodépression les rendant plus sensibles à la vibriose (Travers *et al.* 2008b; Travers *et al.* 2009).

Dans ce contexte, des expériences d'infection par la souche pathogène ORM4 de *V. harveyi* ont été effectuées afin de comparer la sensibilité d'ormeaux des deux sous-espèces *H. tuberculata tuberculata* de l'Atlantique Nord et *H. tuberculata lamellosa* de la Méditerranée.

3.2. Matériel et méthodes

3.2.1. Animaux expérimentaux

Quatre-vingt-dix ormeaux de la sous-espèce *Haliotis tuberculata tuberculata* (56.0 ± 2.2 mm, 23.7 ± 1.6 g, 2 ans) en provenance de l'entreprise d'élevage aquacole France Haliotis (Plouguerneau, Côté Atlantique Nord, France) ont été ramenés au laboratoire IFREMER de La Tremblade en Avril 2014.

Cent vingt ormeaux de la sous-espèce *Haliotis tuberculata lamellosa* (32.6 ± 2.5 mm, 4.9 ± 1.1 g, âge indéterminé) ont été récoltés en plongée à La Azohía à une profondeur entre 4 et 9 mètres ($37^\circ 33' 00''$ N $11^\circ 10' 00''$ W, Mer Méditerranée, Espagne) et ont été ramenés au laboratoire IFREMER de La Tremblade en Avril 2014.

3.2.2. Acclimatation et désinfection

Les ormeaux ont été acclimatés au laboratoire pendant huit semaines avant le début des expériences (Figure 47). Pendant la période d'acclimatation, les animaux ont été stockés dans quatre bacs (deux pour *Haliotis tuberculata tuberculata* et deux pour *Haliotis tuberculata lamellosa*) de 110 L alimentés en continu avec de l'eau de mer filtrée, aérée et traitée aux UV.

La température de l'eau était de 15.4 °C au début de l'expérience. Des augmentations progressives de la température de 1,5 °C tous les deux jours ont été réalisées jusqu'à atteindre les températures respectives désirées pour les différentes infections (18 et 24 °C). Les températures ont ensuite été maintenues à 18 et 24 °C jusqu'à la fin des manipulations.

En ce qui concerne la salinité, les ormeaux de la sous espèce *Haliotis tuberculata lamellosa*, récoltés à une salinité de 36.7 ont aussi été acclimatés aux conditions d'expérimentation (31.5) en raison d'une diminution de la salinité de 1 unité tous les deux jours pendant 10 jours.

Les animaux ont été alimentés *ad libitum* pendant cette période avec de la nourriture formulée pour ormeaux (provenant de l'entreprise Le Gouessant, Bretagne) afin d'éviter de possibles infections bactériennes pouvant venir des macroalgues qui auraient été récoltées en milieu naturel.

Pour s'assurer de l'absence d'infection bactérienne préexistante chez les animaux, un traitement antibiotique leur a été appliqué selon le protocole de Handler (2006). Pendant les cinq derniers jours d'acclimatation, une dose d'oxytétracycline de 200 mg.kg⁻¹.jr⁻¹ a été administrée par balnéation chaque matin. Un renouvellement d'eau était alors effectué une fois par jour le soir.

3.2.3. Souche bactérienne

La souche pathogène ORM4 de *V. harveyi*, isolée en 2002 chez des ormeaux moribonds de la sous-espèce *H. tuberculata tuberculata* en Normandie (France), a été utilisée dans les expérimentations (Nicolas *et al.* 2002). La souche bactérienne a été cultivée à 22 °C sous agitation à 100 rpm pendant 18 h dans du milieu Luria-Bertani enrichi en sel (LBS) à une concentration final en NaCl de 20 g.L⁻¹ et lavée deux fois dans l'eau de mer filtrée et stérile (EMFS). La concentration de la suspension bactérienne a ensuite été déterminée par lecture de la DO à 600 nm et ajustée par dilution dans EMFS à 10⁵ UFC.mL⁻¹.

3.2.4. Infection bactérienne

Après la phase d'acclimatation, dix-huit groupes de 10 ormeaux chacun ont été maintenus dans des bacs de 3 L pendant deux semaines (Figure 1) dans les conditions expérimentales de la phase d'infection à venir, à savoir sans alimentation, à une température de 18 ou 24 °C selon les lots et avec des changements d'eau journalier matinaux. L'infection a ensuite été conduite pendant deux semaines dans deux conditions de température : 18 °C pour *H. tuberculata tuberculata*, et 18 et 24 °C pour *H. tuberculata lamellosa*.

Pour chaque sous-espèce et chaque température, trois lots contrôles et trois lots tests ont été utilisés. Les lots test ont été exposés pendant 24 h dans un bain de *V. harveyi* ORM4 à 10^5 CFU.mL⁻¹ (concentration finale) dans EMFS. Un suivi de mortalités a été effectué deux fois par jour tout au long de cette phase d'infection, les ormeaux moribonds ou morts étant retirés des lots.

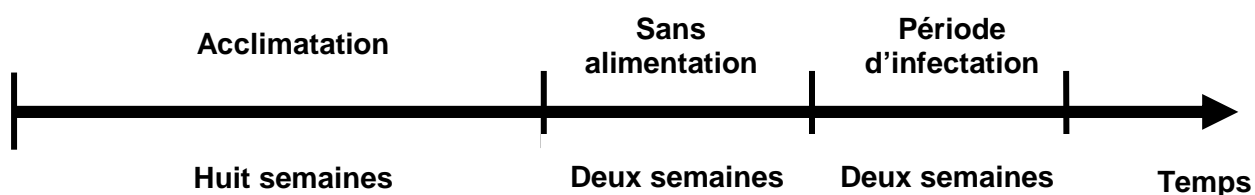


Figure 47. Schéma du déroulement de l'expérience.

3.2.5. Identification bactérienne

La détection de *V. harveyi* dans les ormeaux moribonds ou morts retirés de lots, a été effectuée selon le protocole de Travers et al., (2009). L'hémolymphe a été extraite du sinus céphalique situé à l'avant du muscle pédieux à l'aide d'une aiguille de calibre 25 et d'une

seringue de 5 mL (Figure 48), étalée sur du milieu LBS et cultivée pendant 24 à 48 h à 28 °C pour identification (Figure 49).

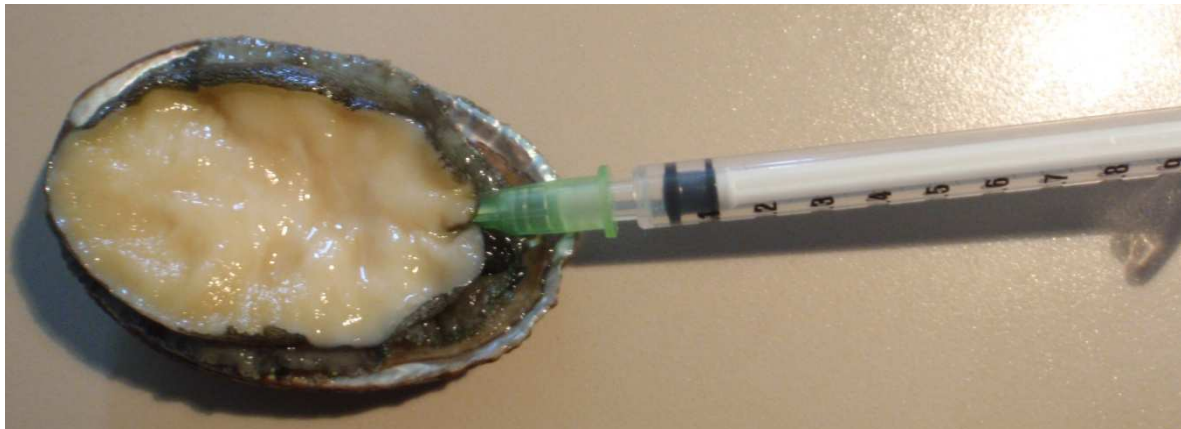


Figure 48. Extraction de l'hémolymphe du sinus céphalique d'un ormeau moribond.

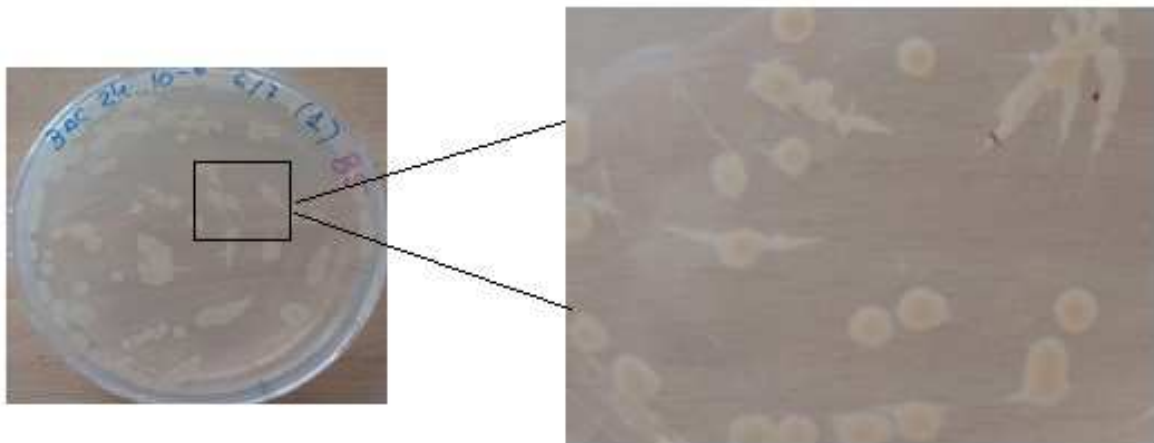


Figure 49. Colonies bactériennes développées après étalement de l'hémolymphe extraite du sinus d'un ormeau moribond.

3.3. Résultats

3.3.1. Mortalités des ormeaux

Aucune mortalité n'a été rencontrée chez *Haliotis tuberculata lamellosa* quel que soit la température testée (18 et 24 °C).

Chez *Haliotis tuberculata tuberculata*, les taux de survie de tous les lots contrôles a été de 100% alors que dans les lots test des individus sont morts tous les jours du 3^e au 9^e (Figure 50).

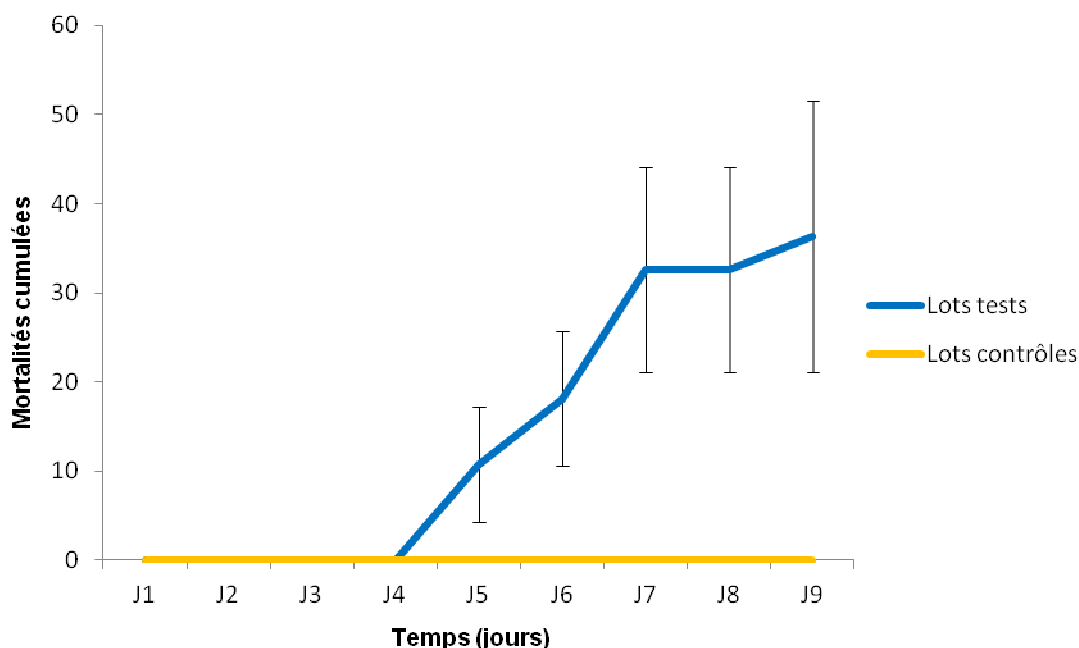


Figure 50. Suivi de la mortalité des ormeaux de la sous-espèce *Haliotis tuberculata tuberculata* à partir de la balnéation pendant 24 h (J0) avec *V. harveyi*. Les moyennes sont présentées avec leur écart-type.

Le premier symptôme observé chez les animaux des lots tests a été une perte de tonicité du muscle pédieux, qui s'est accompagné rapidement de l'apparition de pustules blanches (Figure 51). Ces dernières étaient présentes chez tous les animaux moribonds ou morts. Les tests réalisés sur l'hémolymphe de tous les animaux moribonds et morts ont permis d'établir la présence de *Vibrio harveyi* comme agent causal de leur mortalité.



Figure 51. Ormeau moribond présentant des pustules blanches (P) caractéristiques de l'infection par *V. harveyi*.

3.4. Discussion

Ces travaux préliminaires sont les premiers à avoir testé la sensibilité de la sous-espèce d'ormeau européen *Haliotis tuberculata lamellosa* (Méditerranée) vis-à-vis de la bactérie pathogène *Vibrio harveyi*. Les différentes infections par balnéation réalisées avec la souche ORM4 ont permis de montrer l'absence de mortalité dans les conditions expérimentales (18 et 24 °C) pour cette sous-espèce.

La vibriose, principale maladie affectant les élevages d'*Haliotis tuberculata tuberculata* en France, apparaît lorsque la température de l'eau dépasse le seuil de 17 °C (Nicolas *et al.* 2002; Travers *et al.* 2009). Ce facteur est l'élément clé du déclenchement des mortalités : des températures inférieures ou égales à 17 °C ne permettent pas d'observer le développement de la maladie suite à des balnéations en laboratoire, alors que des températures de 18 °C conduisent à des mortalités pouvant atteindre 80% (Travers *et al.* 2008a). En le milieu naturel, ce même seuil de température a pu être constaté. L'état de maturité sexuelle des ormeaux est également un paramètre très important puisque des animaux non matures ne sont pas sensibles à la vibriose (Travers *et al.* 2009). La gamétogenèse influencée par la température, s'accompagne d'un affaiblissement des individus les rendant immunodéprimés. La période de maturation est ainsi associée à

l'augmentation de la prévalence de différentes maladies. Ceci a déjà été montré chez d'autres mollusques comme l'huître (Samain et McCombie 2008) et a pu être associée à un déficit énergétique ou immunitaire pendant cette période (Soletchnik *et al.* 1997; Li *et al.* 2007). Chez les ormeaux, le seuil de susceptibilité se situe autour de leur période de ponte avec une sensibilité maximale juste après la ponte totale (Travers *et al.* 2008b). Les ormeaux méditerranéens utilisés dans cette étude récoltés au sud-est de l'Espagne, vivent à une température moyenne annuelle de 18,5 °C. Aucune étude sur sa maturation n'a été, à notre connaissance, réalisée jusqu'à maintenant. Ainsi il n'est pas possible de relier l'effet de la température à la maturation des gonades chez cette sous-espèce. Cependant, des travaux sur la maturité de l'autre sous-espèce européenne *Haliotis tuberculata coccinea*, endémique des Îles Canaries et vivant dans des conditions thermiques comparables, ont montré qu'elle est mature toute l'année (Bilbao *et al.* 2010). De plus, aucun cas de mortalité anormale causée par *V. harveyi* n'a été enregistré pour ces deux sous-espèces (*Haliotis tuberculata lamellosa* et *Haliotis tuberculata coccinea*). Même pour des conditions encore plus favorables au développement de *V. harveyi* (Température de 24 °C), aucune mortalité n'a été constaté durant notre expérience pour *H. tuberculata lamellosa*.

Tous ces résultats nous permettent d'émettre **l'hypothèse** suivante : *Haliotis tuberculata lamellosa* serait une espèce résistante au *V. harveyi*, puisque nous n'avons pas constaté par balnéation de mortalités lors des expérimentations. Ceci doit être confirmé par infection par injection de la bactérie selon le protocole de Travers *et al.* (2008a). De plus il serait nécessaire de vérifier si *Haliotis tuberculata lamellosa* présente une maturité sexuelle toute l'année en milieu naturel comme *Haliotis tuberculata coccinea*, ce qui confirmerait également qu'en milieu naturel cette espèce soit résistante au *V. harveyi*.

4. Conclusion

Les deux expériences d'infection réalisées *in vivo* par baignade dans ce quatrième chapitre ouvrent de nouvelles perspectives pour l'aquaculture de l'ormeau européen.

Alors que le développement de nouvelles substances, autres que les antibiotiques, pour combattre les maladies émergentes dans l'aquaculture est aujourd'hui un défi, nous avons démontré l'intérêt de *Grateloupia turuturu* pour limiter la quantité de bactéries pathogènes dans les élevages d'ormeaux. Cette alternative naturelle pourrait être utilisée pour le traitement de l'eau ou en prophylaxie chez les animaux en élevage.

Par ailleurs, des travaux chez *Haliotis tuberculata tuberculata* ont déjà été menés afin d'identifier des marqueurs génétiques de résistance au pathogène *Vibrio harveyi* permettant de sélectionner de futurs géniteurs résistants. (Meistertzheim *et al.* 2014) En complément, il conviendrait donc de s'intéresser à la sous-espèce *H. tuberculata lamellosa* qui n'a montré aucune mortalité face à la souche ORM4 dans nos expériences et ne semble donc pas sensible à ce pathogène.

4. Conclusión

Las dos infecciones realizadas in vivo por inmersión en este cuarto capítulo, abren nuevas perspectivas para la acuicultura de la oreja de mar europea.

Aunque el desarrollo de nuevas sustancias, a parte de los antibióticos, para combatir las enfermedades emergentes en acuicultura es hoy en día un desafío, en este estudio demostramos el interés de Grateloupia turuturu para limitar la cantidad de bacterias patógenas asociadas a la cría de oreja de mar. Esta alternativa natural podría utilizarse en el tratamiento del agua o como profiláctico en las instalaciones acuícolas.

Se han llevado a cabo trabajos con Haliotis tuberculata tuberculata para identificar los marcadores genéticos de resistencia al patógeno Vibrio harveyi permitiendo seleccionar los futuros reproductores resistentes (Meistertzheim et al. 2014). Además, resulta interesante también la observación de la sub-especie Haliotis tuberculata lamellosa, la cual no ha mostrado mortalidad frente a la cepa ORM4 durante nuestros ensayos y que por lo tanto parece no ser susceptible a este patógeno.

Conclusion générale



CONCLUSION GENERALE

L'objectif général de ce travail de thèse était la valorisation de l'algue rouge *Grateloupia turuturu* au travers de l'élevage de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata*. Les principaux freins à la production et à la réussite économique de l'élevage de ce mollusque gastéropode demeurent sa croissance lente et sa sensibilité aux maladies.

L'algue rouge *Grateloupia turuturu*, d'origine japonaise, est une algue présente sur la façade atlantique européenne. Introduite en Europe par le biais d'importations de naissains d'huitres, elle constitue aujourd'hui une biomasse disponible peu valorisée à ce jour en France. Suite à l'étude pluridisciplinaire menée lors de cette thèse, se profilent de nouvelles voies de valorisation pour cette macroalgue proliférante.

Malgré une composition biochimique correspondant aux besoins alimentaires de l'ormeau européen *Haliotis tuberculata*, aucune étude n'avait jusqu'à présent évalué la valeur nutritionnelle de la macroalgue rouge *G. turuturu* comme aliment pour ce mollusque. La première partie de cette thèse a permis de montrer que *G. turuturu* ne peut être utilisée à l'état frais comme aliment monospécifique pour l'ormeau *H. tuberculata tuberculata*. Le principal problème observé a été la dégradation rapide des thalles frais dans les conditions d'élevage. Cependant, l'utilisation de *G. turuturu* en régime mixte avec une autre algue rouge *P. palmata*, connue pour être très appréciée par les ormeaux, a conduit à l'obtention d'ormeaux ayant une teneur plus élevée en lipides que celle d'ormeaux nourris de façon monospécifique avec *P. palmata*. Cela peut suggérer une amélioration qualitative de l'aliment quand ces deux algues rouges sont mélangées. Il faudrait donc tester d'autres façons d'alimenter les ormeaux en élevage avec *G. turuturu*, à savoir sous forme d'aliment artificiel ou dans un système intégré de co-culture avec l'ormeau *H. tuberculata* en trouvant une manière de leur permettre de brouter les thalles en croissance sans avoir à les arracher comme lors de leur récolte en milieu naturel.

D'autre part, la recherche d'alternatives à la lutte contre les espèces de *Vibrio* pathogènes étant une préoccupation majeure, du fait de l'apparition de résistances aux antibiotiques chez ces bactéries dans les élevages aquacoles et la volonté de produire plus durablement, les macroalgues font de plus en plus l'objet de recherche concernant leurs propriétés antibactériennes. Dans ce contexte, la deuxième partie de cette thèse a porté sur l'évaluation des effets *in vitro* de différents extraits de deux algues rouges *G. turuturu* et *P. palmata* sur la croissance de la bactérie pathogène de l'ormeau *Vibrio harveyi*, le principal agent causal des fortes mortalités chez *H. tuberculata*. Nos résultats sur l'effet *in vitro* d'extraits hydrosolubles de *G. turuturu* sur la croissance de *Vibrio harveyi* sont prometteurs : cette macroalgue rouge présente un potentiel antibactérien qui pourrait être mis à profit dans des applications en aquaculture. Cette étude a donc apporté une nouvelle voie de valorisation pour cette macroalgue, démontrant l'existence de son activité biologique contre la bactérie pathogène *Vibrio harveyi*.

C'est ainsi que la troisième partie expérimentale du présent travail a consisté en l'étude de l'effet *in vivo* et en condition d'élevage aquacole de ces extraits hydrosolubles de *G. turuturu*. Dans les bacs d'élevage où les extraits de *Grateloupia turuturu* étaient présents, nous avons montré une activité antibactérienne significative sur la croissance de la bactérie pathogène *V. harveyi*, corroborant ainsi l'étude antérieure menée *in vitro*. En outre, la présence de ces extraits dans les bacs ayant provoqué une surmortalité des ormeaux, la mise à profit du potentiel antibactérien de *G. turuturu* ne pourra passer que par une utilisation de la macroalgue sous une autre forme. Deux pistes paraissent envisageables : 1) le traitement de l'eau dans des systèmes intégrés de co-culture macroalgue-ormeau, ou la mise au point d'une solution de traitement de l'eau contenant uniquement le (ou les) métabolite(s) purifié(s) responsable (s) de cette activité, 2) la prophylaxie dans les élevages par la formulation d'un aliment artificiel permettant de contrecarrer la rapide dégradation observée lors des expériences d'alimentation (cf Chapitre II).

Bien que l'activité antibiotique maximale enregistrée reste faible (16% *in vitro* et 6.6% *in vivo* en élevage), elle suggère la présence d'un (ou plusieurs) composé(s) ayant un effet inhibiteur de la croissance de *Vibrio harveyi*. D'autres études, en particulier de caractérisation et de purification seront nécessaires, notamment afin d'améliorer le niveau d'activité antibactérienne.

Il semble donc, à partir de tous ces résultats, que la fourniture la plus adaptée de *G. turuturu* aux ormeaux se fasse sous forme d'un aliment artificiel déshydraté (poudre ou granulé), qu'il conviendra d'élaborer et de tester *in vivo* dans le but de vérifier son intérêt nutritionnel mais aussi prophylactique pour les individus en élevage.

D'autres pistes de recherche doivent être explorées, notamment celle concernant la résistance au pathogène *Vibrio harveyi*, observée pour l'ormeau méditerranéen *Haliotis tuberculata lamellosa*. Cette résistance à l'exposition par balnéation de cette sous-espèce de l'ormeau européen doit être identifiée, en recherchant des marqueurs génétiques de résistance. La technique HRM (High-Resolution Melting) a permis récemment chez *Haliotis tuberculata tuberculata* d'identifier, en étudiant le polymorphisme des gènes, un certain nombre de ces marqueurs. Cette technique présente l'avantage par rapport aux méthodes classiques d'être plus rapide et beaucoup moins onéreuse. Elle pourrait donc être utilisée pour réaliser ce travail sur *Haliotis tuberculata lamellosa*, permettant ainsi une comparaison de ces deux sous-espèces vis à vis de leur résistance au pathogène *Vibrio harveyi*.

Ces différentes pistes de réflexion vont dans le sens du développement de la filière halioticole française dans le cadre d'une aquaculture durable en permettant :

- la valorisation d'une ressource naturelle en l'occurrence la macroalgue rouge *G. turuturu* sous sa forme fraîche ou sous forme d'aliment artificiel déshydraté.
- l'amélioration de la santé des animaux en élevage en limitant l'apparition et le développement de pathogènes, notamment la vibriose.

- l'amélioration génétique par sélection et/ou croisement des géniteurs utilisés en élevage par la recherche de gènes de résistance à ces pathogènes.
- l'amélioration de la qualité sanitaire des eaux des fermes d'élevage par la mise en place de systèmes intégrés de production (co-culture macroalgues-ormeaux et pourquoi pas poissons) avec les avantages que procurent ce type de système. Ce qui limiterait également l'impact écologique de ces élevages sur l'environnement côtier notamment en améliorant la qualité de leurs effluents.

CONCLUSIÓN GENERAL

El objetivo general de esta tesis ha sido la valoración del alga roja Grateloupia turuturu a través de la cría en cautividad de la oreja de mar europea Haliotis tuberculata. Los principales obstáculos a la producción de este molusco gasterópodo y a su éxito económico recaen en su crecimiento lento y su sensibilidad a las enfermedades.

El alga roja Grateloupia turuturu, de origen japonesa, se encuentra presente en las costas atlánticas europeas. Introducida en Europa entre las importaciones de semillas de ostras, constituye hoy una biomasa disponible y poco valorizada en Francia. Gracias al estudio pluridisciplinar llevado a cabo durante la presente tesis, han surgido nuevas vías de valorización de esta macroalga proliferante.

A pesar de contar con una composición bioquímica correspondiente a las necesidades alimenticias de la oreja de mar europea Haliotis tuberculata, ningún estudio hasta el presente había evaluado el valor nutricional de G. turuturu como alimento para este molusco. El primer estudio que compone esta tesis ha permitido mostrar que el alga fresca no podría ser utilizada como alimento monoespecífico para la oreja de mar H. tuberculata tuberculata. El principal problema observado ha sido la rápida degradación de sus tallos frescos en las condiciones de las instalaciones acuícolas. No obstante, la utilización de G.

turuturu en una dieta mixta junto con otra alga roja P. palmata, conocida por ser muy apreciada por la oreja de mar, ha conducido a la obtención de individuos adultos con un mayor contenido lipídico que aquellos obtenidos mediante dietas monoespecíficas con P. palmata. Este hecho sugiere la obtención de una mejora cualitativa del alimento cuando mezclamos estas dos algas rojas. Por lo tanto, habría que probar otras formas de alimentación para las orejas de mar en cautividad con G. turuturu, como, por ejemplo, suministrando el alga bajo la forma de alimento artificial o formando parte de un sistema integrado de co-cultivo con el molusco, encontrando una manera de permitirles el acceso a los tallos en crecimiento sin necesidad de arrancarlos.

Por otro lado, la aparición de resistencia a los antibióticos por parte de las especies Vibrio patógenas que proliferan entre las instalaciones acuícolas y la voluntad de desarrollar una acuicultura más sostenible, hacen de la investigación de alternativas contra el Vibrio una de las principales metas. Por este motivo, y debido a sus propiedades antibacterianas, las macroalgas son, cada vez más, objeto de estas investigaciones. En este contexto, la segunda parte de la tesis ha consistido en la evaluación de los efectos in vitro de diferentes extractos de dos algas rojas, G. turuturu y P. palmata, sobre el crecimiento de la bacteria patógena de la oreja de mar Vibrio harveyi, el principal agente causante de fuertes mortandades de H. tuberculata. Nuestros resultados sobre el efecto in vitro de los extractos hidrosolubles de G. turuturu sobre el crecimiento de Vibrio harveyi han sido prometedores: esta macroalga roja presenta un potencial antibacteriano que podría ser aprovechado en aplicaciones en acuicultura. Este estudio ha, por lo tanto, aportado una nueva vía de valorización de esta macroalga demostrando la existencia de su actividad biológica contra la bacteria patógena Vibrio harveyi. Así mismo, la tercera parte experimental del presente trabajo ha consistido en el estudio del efecto in vivo y en condiciones de cría en cautividad de los extractos hidrosolubles de G. turuturu. En los tanques donde los extractos de Grateloupia turuturu estaban presentes, hemos podido demostrar una actividad antibacteriana significativa sobre el crecimiento de la bacteria patógena V. harveyi,

corroborando así el estudio anterior *in vitro*. No obstante y debido a que la presencia de estos extractos en los tanques provocaron una mortalidad elevada de los individuos de oreja de mar, este potencial antibacteriano solo podrá ser aprovechado bajo la utilización de las algas en una forma diferente. Dos opciones nos parecieron posibles:

1) el tratamiento del agua en sistemas integrados de co-cultivo macroalga-oreja de mar, o el desarrollo de una solución para el tratamiento del agua conteniendo únicamente el/los metabolito/s purificado/s, y 2) la profilaxis en los sistemas de producción mediante la formulación de dietas artificiales que permitan contrarrestar la rápida degradación observada durante los ensayos de nutrición (ver Capítulo II).

Sin embargo, y a pesar de que la actividad antibiótica máxima registrada resulto no ser elevada (16% *in vitro* y 6.6% *in vivo*), este resultado evidencia la presencia de uno o varios compuestos inhibidores del crecimiento de Vibrio harveyi. Otros estudios, en particular de caracterización y purificación serían necesarios para mejorar este nivel de actividad antibacteriana. Parece, por lo tanto, que la presentación más adecuada de G. turuturu para la oreja de mar sea la de un alimento artificial deshidratado (en polvo o granulado), el cual sería conveniente elaborar y probar *in vivo* con el objeto de valorar su interés nutricional y su efecto profiláctico para los individuos en cautividad.

Además, otro tipo de estudios podrían ser explorados, especialmente aquellos vinculados a la resistencia al patógeno Vibrio harveyi observado en la oreja de mar del Mediterráneo Haliotis tuberculata lamellosa. La resistencia a la exposición por emersión de esta sub-especie de la oreja de mar europea debe ser puesta en evidencia identificando los marcadores genéticos de resistencia. La técnica HRM (High-Resolution Melting) ha permitido recientemente en Haliotis tuberculata tuberculata identificar, estudiando el polimorfismo de sus genes, un determinado número de estos marcadores. Esta técnica presenta la clara ventaja frente a los métodos clásicos de ser más rápida y menos costosa, por lo que podría ser utilizada para llevar a cabo este trabajo con Haliotis tuberculata

lamellosa, permitiendo así una comparación de las dos sub-especies en cuanto a su resistencia al patógeno *Vibrio harveyi*.

Estas diferentes vías de reflexión están orientadas hacia el desarrollo del sector haliotícola francés en el marco de una acuicultura sostenible y que permita:

- la valorización de un recurso natural como lo es la macroalga roja *G. turuturu* en su estado fresco o bajo la forma de alimento artificial deshidratado.
- la mejora de la salud de los animales en cautividad limitando la aparición y el desarrollo de patógenos, concretamente la vibriosis.
- la mejora genética por selección y/o cruce de reproductores utilizados en la cría mediante la búsqueda de genes de resistencia a estos patógenos.
- la mejora de la calidad sanitaria de las aguas de las instalaciones acuícolas con la puesta en marcha de sistemas integrados de producción (co-cultivo macroalgas-orejas de mar y eventualmente peces) con las ventajas que conlleva este tipo de sistemas. Esto limitaría igualmente el impacto ecológico de las instalaciones sobre el entorno costero mejorando la calidad de sus efluentes.

Bibliographie



BIBLIOGRAPHIE

-A-

- Aguirre-Guzmán, G., Mejía Ruíz, H. et Ascencio, F., (2004). A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. *Aquaculture Research* 35, 1395-1404.
- Alcaide, E., Gil-Sanz, C., Sanjuan, E., Esteve, D., Amaro, C. et Silveira, L., (2001). *Vibrio harveyi* causes disease in seahorse, *Hippocampus sp.* *Journal of Fish Diseases* 24, 311-313.
- Alcantara, L. et Noro, T., (2006). Growth of the abalone *Haliotis diversicolor* (Reeve) fed with macroalgae in floating net cage and plastic tank. *Aquaculture Research* 37, 708-717.
- Anguiano-Beltrán, C., Searcy-Bernal, R., García-Ortega, A. M., García-Esquivel, Z. et Valenzuela-Espinoza, E., (2012). Effect of three bacterial isolates from a commercial hatchery on early red abalone (*Haliotis rufescens*) postlarvae. *Aquaculture International* 20, 993-1001.
- Anon, (2012). Inventaire national du Patrimoine naturel. *Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris*
- Araújo, R., Barbara, I., Tibaldo, M., Berecibar, E., Tapia, P. D., Pereira, R., Santos, R. et Pinto, I. S., (2009). Checklist of benthic marine algae and cyanobacteria of northern Portugal. *Botanica Marina* 52, 24-46.
- Araújo, R., Violante, J., Pereira, R., Abreu, H., Arenas, F. et Sousa-Pinto, I., (2011). Distribution and population dynamics of the introduced seaweed *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta) along the Portuguese coast. *Phycologia* 50, 392-402.
- Arun Kumar, K. et Rengasamy, R., (2000). Antibacterial activities of seaweed extracts/fractions obtained through a TLC profile against the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. *Botanica Marina* 43, 417-421.
- Austin, B. et Zhang, X. H., (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology* 43, 119-124.
- Azandegbe, A., (2010). Etude de la structure des communautés bactériennes du sédiment et de l'écologie de *Vibrio aestuarianus* pathogène de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans deux sites ostréicoles. *Université Européenne de Bretagne. Rennes-France*.

Azevedo, C., Balseiro, P., Casal, G., Gestal, C., Aranguren, R., Stokes, N. A., Carnegie, R. B., Novoa, B., Burrenson, E. M. et Figueras, A., (2006). Ultrastructural and molecular characterization of *Haplosporidium montforti* n. sp., parasite of the European abalone *Haliotis tuberculata*. *Journal of Invertebrate Pathology* 92, 23-32.

-B-

Bachère, E., (2003). Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. *Aquaculture* 227, 427-438.

Baker-Austin, C., Trinanés, J. A., Taylor, N. G., Hartnell, R., Siitonen, A. et Martínez-Urtaza, J., (2013). Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nature Climate Change* 3, 73-77.

Balseiro, P., Aranguren, R., Gestal, C., Novoa, B. et Figueras, A., (2006). *Candidatus xenohaliotis californiensis* and *Haplosporidium montforti* associated with mortalities of abalone *Haliotis tuberculata* cultured in Europe. *Aquaculture* 258, 63-72.

Bansemir, A., Blume, M., Schröder, S. et Lindequist, U., (2006). Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture* 252, 79-84.

Barbara, I. et Cremades, J., (2004). *Grateloupia lanceola* versus *Grateloupia turuturu* (Gigartinales, Rhodophyta) en la Península Ibérica. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61, 103-118.

Bárbara, I., Cremades, J., Calvo, S., López-Rodríguez, M. C. et Dosil, J., (2005). Checklist of the benthic marine and brackish Galician algae (NW Spain). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 62, 69-100.

Barillé-Boyer, A.-L., Gruet, Y., Barillé, L. et Harin, N., (2004). Temporal changes in community structure of tide pools following the "Erika" oil spill. *Aquatic Living Resources* 17, 323-328.

Barreiro, R., Quintela, M., Barbara, I. et Cremades, J., (2006). RAPD differentiation of *Grateloupia lanceola* and the invasive *Grateloupia turuturu* (Gigartinales, Rhodophyta) in the Iberian Peninsula. *Phycologia* 45, 213-217.

Basuyaux, (1997). Study and modelisation of the physico-chemical parameters influencing the growth of the ormer (*Haliotis tuberculata*) reared in a semi-closed system. *Université de Caen. FRANCE*

- Bates, C. R., Saunders, G. W. et Chopin, T., (2005). An assessment of two taxonomic distinctness indices for detecting seaweed assemblage responses to environmental stress. *Botanica Marina* 48, 231-243.
- Baumann, P., Furniss, A. et Lee, J. V., (1984). Genus I. *Vibrio*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 1, 518-538.
- Bazes, A., Silkina, A., Defer, D., Bernède-Bauduin, C., Quéméner, E., Braud, J.-P. et Bourgougnon, N., (2006). Active substances from *Ceramium botryocarpum* used as antifouling products in aquaculture. *Aquaculture* 258, 664-674.
- Belhsen, O. K., (2000). Étude cytologique de la gametogenese, du système nerveux central et du cycle de reproduction de l'ormeau europeen *Haliotis tuberculata* (L.). *Université de Caen/Basse-Normandie. France*
- Bhakuni, D. S. et Rawat, D. S., (2005). Bioactive marine natural products. *Springer*
- Bidri, M. et Choay, P., (2003). La taurine: un aminoacide particulier aux fonctions multiples. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 61, 385-391.
- Bilbao, A., Tuset, V., Viera, M., Vico, G. C. D., Fernández-Palacios, H., Haroun, R. et Izquierdo, M., (2010). Reproduction, Fecundity, and Growth of Abalone (*Haliotis Tuberculata Coccinea*, Reeve 1846) in the Canary Islands. *Journal of Shellfish Research* 29, 959-967.
- Bligh, E. G. et Dyer, W. J., (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911-917.
- Bondad-Reantaso, M. G., Subasinghe, R. P., Arthur, J. R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z. et Shariff, M., (2005). Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology* 132, 249-272.
- Booolootian, R. A., Farmanfarmanian, A. et Giese, A., (1962). On the reproductive cycle and breeding habits of two western species of *Haliotis*. *The Biological Bulletin* 122, 183-193.
- Bourgau, F., Gravot, A., Milesi, S. et Gontier, E., (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sciences* 161, 839-851.
- Bourgougnon, N. et Stiger-Pouvreau, V., (2012). Red and Brown Macroalgae Along the French Coasts, Metropole and Overseas Departments and Territories. *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology* 58-105.

Bower, S. M., (2003). Update on emerging abalone diseases and techniques for health assessment. *Journal of Shellfish Research* 22, 805-810.

Bradford, M. M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Britz, P., Hecht, T., Knauer, J. et Dixon, M., (1994). The development of an artificial feed for abalone farming. *South African Journal of Science*

Brock, J. et Lightner, D., (1990). Diseases of crustacea. Diseases caused by microorganisms. *Diseases of Marine Animals* 3, 245-349.

Burritt, D. J., Larkindale, J. et Hurd, C. L., (2002). Antioxidant metabolism in the intertidal red seaweed *Stictosiphonia arbuscula* following desiccation. *Planta* 215, 829-838.

-C-

Cabioc'h, J., Floc'h, J. Y., Toquin, A. L., Boudouresque, C. F., Meinesz, A. et Verlaque, M. (2006). Guide des algues des mers d'Europe, Delachaux et Niestlé.

Caccamese, S., Azzolina, R., Furnari, G., Cormaci, M. et Grasso, S., (1980). Antimicrobial and antiviral activities of extracts from mediterranean algae. *Botanica Marina* 23, 285-288.

Cai, J., Li, J., Thompson, K. D., Li, C. et Han, H., (2007). Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from diseased post-larvae of abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Journal of Basic Microbiology* 47, 84-86.

Campbell, A., Lessard, J. et Jamieson, G., (2003). Fecundity and seasonal reproduction of northern abalone, *Haliotis kamtschatkana*, in Barkley Sound, Canada. *Journal of Shellfish Research* 22, 811-818.

Caram, B. et Jónsson, S., (1972). Nouvel inventaire des algues marines de l'Islande. *Acta botanica islandica* 1, 5-31.

Cardozo, K. H., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P. et Pinto, E., (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol* 146, 60-78.

Clavier, J. (1992). Fecundity and optimal sperm density for fertilization in the ormer (*Haliotis tuberculata* L.), In :Shepherd S.A. (ed.), Tegner M.J. (ed.), Guzman del Proo S.A. (ed.) Abalone

of the world : biology, fisheries and culture : supplementary papers. Adelaide : Department of Fisheries, 1992, (24), p. 86-92. (Fisheries Research Paper - Departement of Fisheries ; 24). International Symposium on Abalone, 1., La Paz (BOL), 1989/11/21-25.

- Clavier, J. et Chardy, P., (1989). Investigation into the ecology of the ormer - (*Haliotis tuberculata* L.), factors influencing spatial distribution. *Aquatic Liring Resources* 2, 191-197.
- Clavier, J. et Richard, O., (1986). Growth of juvenile *Haliotis tuberculata* (Mollusca: Gastropoda) in their natural environment. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 66, 497-503.
- Coleman, A. W. et Vacquier, V. D., (2002). Exploring the phylogenetic utility of ITS sequences for animals: a test case for abalone (*Haliotis*). *Journal of Molecular Evolution* 54, 246-257.
- Cook, P. A. et Roy Gordon, H., (2010). World abalone supply, markets, and pricing. *Journal of Shellfish Research* 29, 569-571.
- Corey, P., Kim, J. K., Duston, J. et Garbary, D. J., (2014). Growth and nutrient uptake by *Palmaria palmata* integrated with Atlantic halibut in a land-based aquaculture system. *Algae. An International Journal of Algal Research* 29, 35-45.
- Cox, K. W., (1962). California abalones, family *Haliotidae*. *California Explores the Ocean: Fish Bulletin* 1, 8-133.
- Cox, S., Abu-Ghannam, N. et Gupta, S., (2010). An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *International Food Research Journal* 17, 205-220.
- Cronin, G. et Hay, M. E., (1996). Susceptibility to herbivores depends on recent history of both the plant and animal. *Ecology* 77, 1531-1543.
- Cronin, G., Paul, V. J., Hay, M. E. et Fenical, W., (1997). Are tropical herbivores more resistant than temperate herbivores to seaweed chemical defenses? Diterpenoid metabolites from *Dictyota acutiloba* as feeding deterrents for tropical versus temperate fishes and urchins. *Journal of Chemical Ecology* 23, 289-302.
- Culley, M. et Peck, L., (1981). The feeding preferences of the ormer, *Haliotis tuberculata* L. *Kieler Meeresforschungen Sonderheft* 5, 2.
- Chang, P. H., Kuo, S. T., Lai, S. H., Yang, H. S., Ting, Y. Y., Hsu, C. L. et Chen, H. C., (2005). Herpes-like virus infection causing mortality of cultured abalone *Haliotis diversicolor supertexta* in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms* 65, 23-27.

Chattopadhyay, K., Mateu, C. G., Mandal, P., Pujol, C. A., Damonte, E. B. et Bimalendu, R., (2007). Galactan sulfate of *Grateloupia indica*: Isolation, structural features and antiviral activity. *Phytochemistry* 68, 1428-1435.

Cheng, W., Hsiao, I. S., Hsu, C.-H. et Chen, J.-C., (2004). Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology* 17, 235-243.

Cho, J. Y., Jin, H.-J., Lim, H. J., Whyte, J. N. et Hong, Y.-K., (1998). Growth activation of the microalga *Isochrysis galbana* by the aqueous extract of the seaweed *Monostroma nitidum*. *Journal of Applied Phycology* 10, 561-567.

-D-

D'Archino, R., Nelson, W. A. et Zuccarello, G. C., (2007). Invasive marine red alga introduced to New Zealand waters: first record of *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 41, 35-42.

Dang, V. T., Speck, P., Doroudi, M., Smith, B. et Benkendorff, K., (2011). Variation in the antiviral and antibacterial activity of abalone *Haliotis laevigata*, *H. rubra* and their hybrid in South Australia. *Aquaculture* 315, 242-249.

Das, S., Ward, L. et Burke, C., (2008). Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. *Applied of Microbiology and Biotechnology* 81, 419-429.

De Almeida, C. L. F., Falc, D. S., Lima, D. M., Gedson, R., Montenegro, D. A., Lira, N. S., De Athayde-Filho, P. F., Rodrigues, L. C., De Souza, M. d. F. et Barbosa-Filho, J. M., (2011). Bioactivities from marine algae of the genus *Gracilaria*. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 4550-4573.

Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P. et Verstraete, W., (2004). Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture* 240, 69-88.

Degerman, R., Dinasquet, J. V., Riemann, L., Sjöstedt de Luna, S. et Andersson, A., (2013). Effect of resource availability on bacterial community responses to increased temperature. *Aquatic Microbial Ecology* 68, 131-142.

Demetropoulos, C. et Langdon, C., (2004). Pacific dulse (*Palmaria mollis*) as a food and biofilter in recirculated, land-based abalone culture systems. *Aquaculture Engineering* 32, 57-75.

- Demetropoulos, C. L. et Langdon, C. J., (2004). Effects of nutrient enrichment and biochemical composition of diets of *Palmaria mollis* on growth and condition of Japanese abalone, *Haliotis discus hannai* and red abalone, *Haliotis rufescens*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 308, 185-206.
- Denis, C., (2009). Caractérisation biochimique de l'algue *Grateloupia turuturu*, évaluation de ses potentialités de valorisation via un procédé de digestion enzymatique et la purification partielle d'un pigment d'intérêt (R-phycoéthytrine). *Université de Nantes, Nantes-France*.
- Denis, C., Morançais, M., Gaudin, P. et Fleurence, J., (2009). Effect of enzymatic digestion on thallus degradation and extraction of hydrosoluble compounds from *Grateloupia turuturu*. *Botanica Marina* 52, 262-267.
- Denis, C., Morançais, M., Li, M., Deniaud, E., Gaudin, P., Wielgosz-Colin, G., Barnathan, G. et Fleurence, J., (2010). Study of the chemical composition of edible red macroalgae *Grateloupia turuturu* from Brittany (France). *Food Chemistry* 119, 913-917.
- Dhargalkar, V. et Verlecar, X., (2009). Southern Ocean seaweeds: A resource for exploration in food and drugs. *Aquaculture* 287, 229-242.
- Diggles, B., Moss, G., Carson, J. et Anderson, C., (2000). Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda: Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms* 43, 127-137.
- Diggles, B., Nichol, J., Hine, P., Wakefield, S., Cochenec, N., Roberts, R. et Friedman, C., (2002). Pathology of cultured paua *Haliotis iris* infected with a novel haplosporidian parasite, with some observations on the course of disease. *Diseases of Aquatic Organisms* 50, 219-231.
- Dubber, D. et Harder, T., (2008). Extracts of *Ceramium rubrum*, *Mastocarpus stellatus* and *Laminaria digitata* inhibit growth of marine and fish pathogenic bacteria at ecologically realistic concentrations. *Aquaculture* 274, 196-200.
- Dunstan, G. A., Baillie, H. J., Barrett, S. M. et Volkman, J. K., (1996). Effect of diet on the lipid composition of wild and cultured abalone. *Aquaculture* 140, 115-127.
- Dworjany, S., De Nys, R. et Steinberg, P., (2006). Chemically mediated antifouling in the red alga *Delisea pulchra*. *Marine Ecology Progress Series* 318, 153-163.
- Dworkin, M. et Falkow, S. (2006). The Prokaryotes: Vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass.

-E-

Eguía, E. et Trueba, A., (2007). Application of marine biotechnology in the production of natural biocides for testing on environmentally innocuous antifouling coatings. *Journal Coatings Technology and Research* 4, 191-202.

El Gamal, A. A., (2010). Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmacology Journal* 18, 1-25.

Elston, R., (1983). Histopathology of oxygen intoxication in the juvenile red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. *Journal of Fish Diseases* 6, 101-110.

Engel, S., Puglisi, M., Jensen, P. et Fenical, W., (2006). Antimicrobial activities of extracts from tropical Atlantic marine plants against marine pathogens and saprophytes. *Marine Biology* 149, 991-1002.

Esteban, R., Martínez, B., Fernández-Marín, B., Becerril, J. M. et García-Plazaola, I., (2009). Carotenoid composition in Rhodophyta: insights into xanthophyll regulation in *Corallina elongata*. *European Journal of Phycology* 44, 221-230.

Euzéby, J. P., (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 590-592.

Evans, B., Bartlett, J., Sweijd, N., Cook, P. et Elliott, N., (2004). Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery produced abalone in Australia (*Haliotis rubra*) and South Africa (*Haliotis midae*). *Aquaculture* 233, 109-127.

Evans, F. et Langdon, C. J., (2000). Co-culture of dulse *Palmaria mollis* and red abalone *Haliotis rufescens* under limited flow conditions. *Aquaculture* 185, 137-158.

-F-

FAO, (2007). Aquaculture Department. The State of World Fisheries and Aquaculture 2006. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FAO, (2011). Aquaculture Department. 2013. *Global Aquaculture Production Statistics for the year*

FAO, (2013). Statistiques des pêches et de l'aquaculture, modules de requêtes en ligne. *Statistiques des pêches et de l'aquaculture, modules de requêtes en ligne. FAO*

- FAO, (2014). Global aquaculture production 1950-2012. <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en>, accessed on 26 July 2014
- Farmer, J. et Hickman-Brenner, F., (2006). The genera *Vibrio* and photobacterium. *The Prokaryotes*. Springer 508-563.
- Febles, C., Arias, A., Gil-Rodriguez, M., Hardisson, A. et Sierra Lopez, A., (1995). In vitro study of antimicrobial activity in algae (*Chlorophyta*, *Phaeophyta* and *Rhodophyta*) collected from the coast of Tenerife. *Anuario del Instituto de Estudios Canarios* 34, 181-192.
- Fishtech, (2012). <http://www.fishtech.com/>.
- Fleming, A., (1995). Growth, intake, feed conversion efficiency and chemosensory preference of the Australian abalone, *Haliotis rubra*. *Aquaculture* 132, 297-311.
- Fleming, A. E. et Hone, P. W., (1996). Abalone aquaculture. *Aquaculture* 140, 1-4.
- Fleming, A. E., Van Barneveld, R. J. et Hone, P. W., (1996). The development of artificial diets for abalone: a review and future directions. *Aquaculture* 140, 5-53.
- Fleurence, J., (1999). Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science and Technology* 10, 25-28.
- Fleurence, J., (2004). "Seaweed proteins". Proteins in food processing. R. Y. Yada. Cambridge; New-York, Woodhead Publishing Limited; CRC Press LLC: 197-213.
- Fleurence, J., Gutbier, G., Mabeau, S. et Leray, C., (1994). Fatty acids from 11 marine macroalgae of the French Brittany coast. *Journal of Applied Phycology* 6, 527-532.
- Fleurence, J., Morançais, M., Dumay, J., Decottignies, P., Turpin, V., Munier, M., Garcia-Bueno, N. et Jaouen, P., (2012). What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture? *Trends in Food Science and Technology* 27, 57-61.
- Flye-Sainte-Marie, J., Pouvreau, S., Paillard, C. et Jean, F., (2007). Vue interne d'une palourde atteinte par la maladie de l'anneau brun. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 349, 378-389.
- Freile-Pelegri, Y. et Morales, J. L., (2004). Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan, Mexico. *Botanica Marina* 47, 140-146.

Freile-Pelegrín, Y. et Morales, J. L., (2004). Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan, Mexico. *Botanica Marina* 47, 140-146.

Friedman, C., Thomson, M., C, C., Haaker, P. et Hedrick, R., (1997). Withering syndrome of the black abalone, *Haliotis cracherodii* (Leach): Water temperature, food availability and parasites as possible causes. *Journal of Shellfish Research* 16, 403-441.

Friedman, C. S., Andree, K. B., Beauchamp, K., Moore, J. D., Robbins, T. T., Shields, J. D. et Hedrick, R. P., (2000). '*Candidatus Xenohaliotis californiensis*', a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 847-855.

Frydenborg, B. R., Krediet, C. J., Teplitski, M. et Ritchie, K. B., (2014). Temperature-dependent inhibition of opportunistic *Vibrio* pathogens by native coral commensal bacteria. *Microbial ecology* 67, 392-401.

Fu, Y.-W., Hou, W.-Y., Yeh, S.-T., Li, C.-H. et Chen, J.-C., (2007). The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology* 22, 673-685.

Fujino, T., (1951). Bacterial food poisoning. *Saishin Igaku* 6, 263-271.

Fujiwara-Arasaki, T., Mino, N. et Kuroda, M., (1984). The protein value in human nutrition of edible marine algae in Japan. *Eleventh International Seaweed Symposium* 513-516.

-G-

Galland-Irmouli, A.-V., Fleurence, J., Lamghari, R., Luçon, M., Rouxel, C., Barbaroux, O., Bronowicki, J.-P., Villaume, C. et Guéant, J.-L., (1999). Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (Dulse). *Journal of Nutritional Biochemistry* 10, 353-359.

Garnier, M., Labreuche, Y., Garcia, C., Robert, M. et Nicolas, J.-L., (2007). Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial Ecology* 53, 187-196.

Gauger, E. J. et Gomez-Chiarri, M., (2002). 16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio harveyi* and *V. carchariae*. *Diseases of Aquatic Organisms* 52, 39-46.

- Gavio, B. et Fredericq, S., (2002). *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta) is the correct name of the non-native species in the Atlantic known as *Grateloupia doryphora*. *European Journal of Phycology* 37, 349-359.
- Gay, M., Renault, T., Pons, A.-M. et Le Roux, F., (2004). Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Diseases of Aquatic Organisms* 62, 65-74.
- Geiger, D. L., (1999). A total evidence cladistic analysis of the *Haliotidae* (Gastropoda: Vetigastropoda). *University of Southern California*
- Genovese, G., Faggio, C., Gugliandolo, C., Torre, A., Spano, A., Morabito, M. et Maugeri, T. L., (2012). *In vitro* evaluation of antibacterial activity of *Asparagopsis taxiformis* from the Straits of Messina against pathogens relevant in aquaculture. *Marine Biology Research* 73, 1-6.
- Girard, S., Pérez Agúndez, J., Miossec, L. et Czerwinski, N., (2005). Recensement de la conchyliculture 2001. *Agreste Cahiers* 1,
- Giribet, G. et Wheeler, W., (2002). On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. *Invertebrate Biology* 121, 271-324.
- Gmelin, J., (1791). *Systema Naturae Linnaei*. *GE Beer, Germania* 3371,
- Goecke, F., Labes, A., Wiese, J. et Imhoff, J. F., (2010). Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria. *Marine Ecology Progress Series* 409, 267-300.
- Gomez-Gil, B., Soto-Rodriguez, S., García-Gasca, A., Roque, A., Vazquez-Juarez, R., Thompson, F. L. et Swings, J., (2004). Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology* 150, 1769-1777.
- Gómez-León, J., Villamil, L., Lemos, M., Novoa, B. et Figueras, A., (2005). Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 98-104.
- Gordon, H. R. et Cook, P. A., (2001). World abalone supply, markets and pricing: historical, current and future. *Journal of Shellfish Research* 20, 567-570.
- Gordon, H. R. et Cook, P. A., (2013). World Abalone Supply, Markets, and Pricing: 2011 Update. *Journal of Shellfish Research* 32, 5-7.

Guiry, M. et Guiry, G., (2014). AlgaeBase: Galway, National University of Ireland.

Gupta, S. et Abu-Ghannam, N., (2011). Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science and Technology* 22(6), 315-326.

-H-

Haaker, P., Parker, D., Togstad, H., Richards, D., Davis, G. et Friedman, C., (1992). Mass mortality and withering syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii*. California. In: Shepherd SA, Tegner MJ, Gusman del Proo SA (eds) *Abalone of the world: biology, fisheries and culture. Proceedings of the first international symposium on abalone*. University Press, Cambridge 214-224.

Hahn, K. O., (1989). Handbook of culture of abalone and other marine gastropods. *Handbook of culture of abalone and other marine gastropods*.

Hahn, K. O., (1994). Gametogenic cycle of the Japanese abalone (ezoawabi), *Haliotis discus hannai*, during conditioning with effective accumulative temperature. *Aquaculture* 122, 227-236.

Handler, J., Carson, J., Donachie, L., Gabor, L. et Taylor, D., (2005). Bacterial infection in Tasmanian farmed abalone: Causes, pathology, farm factors and control options. *Diseases in Asian Aquaculture V Proceedings of the 5th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture: 24-28 November 2002 Australia*, 289-300 289-300.

Hardy, F. G. et Guiry, M. D., (2003). A check-list and atlas of the seaweeds of Britain and Ireland. London: *British Phycological Society* 1-435.

Harlin, M. M. et Villalard-Bohnsack, M., (2001). Seasonal dynamics and recruitment strategies of the invasive seaweed *Grateloupia doryphora* (Halymeniaceae, Rhodophyta) in Narragansett Bay and Rhode Island Sound, Rhode Island, USA. *Phycologia* 40, 468-474.

Harris, L. et Owens, L., (1999). Production of exotoxins by two luminous *Vibrio harveyi* strains known to be primary pathogens of *Penaeus monodon* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 38, 11-22.

Hayashi, I., (1980). The Reproductive Biology of the Ormer, *Haliotis Tuberculata*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 60, 415-430.

- Heidelberg, J., Heidelberg, K. et Colwell, R., (2002). Bacteria of the γ -subclass Proteobacteria associated with zooplankton in Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5498-5507.
- Hellio, C., Bremer, G., Pons, A., Le Gal, Y. et Bourgougnon, N., (2000). Inhibition of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany, France. *Applied of Microbiology and Biotechnology* 54, 543-549.
- Hellio, C., De La Broise, D., Dufossé, L., Le Gal, Y. et Bourgougnon, N., (2001). Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. *Marine Environnement Research* 52, 231-247.
- Hellio, C., Simon-Colin, C., Clare, A. S. et Deslandes, E., (2004). Isethionic acid and floridoside isolated from the red alga, *Grateloupia turuturu*, inhibit settlement of *Balanus amphitrite* cyprid larvae. *Biofouling* 20, 139-145.
- Holdt, S. L. et Kraan, S., (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology* 23, 543-597.
- Holmström, K., Gräslund, S., Wahlström, A., Pongshompoo, S., Bengtsson, B. E. et Kautsky, N., (2003). Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *International Journal of Food Sciences and Technology*. 38, 255-266.
- Hooker, N. et Morse, D. E., (1985). Abalone: the emerging development of commercial cultivation in the United States. *Crustacean and Mollusc Aquaculture in the United States*. Westport, Connecticut: AVI Publishing Company 365-413.
- Hornsey, I. et Hide, D., (1974). The production of antimicrobial compounds by British marine algae I. Antibiotic-producing marine algae. *British Phycology Journal* 9, 353-361.
- Hornsey, I. et Hide, D., (1976). The production of antimicrobial compounds by British marine algae II. Seasonal variation in production of antibiotics. *British Phycology Journal* 11, 63-67.
- Hou, W.-Y. et Chen, J.-C., (2005). The immunostimulatory effect of hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology* 19, 127-138.
- Howard-Jones, N., (1984). Robert Koch and the cholera vibrio: a centenary. *British Medical Journal* 288, 379.

Huang, C., Liu, P. et Lee, K., (2001). Withering syndrome of the small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, is caused by *Vibrio parahaemolyticus* and associated with thermal induction. *Zeitschrift fur Naturforschung C* 56, 898-901.

Huang, Q., Zhang, L., Cheung, P. C. et Tan, X., (2006). Evaluation of sulfated α -glucans from *Poria cocos* mycelia as potential antitumor agent. *Carbohydrate Polymers* 64, 337-344.

Huchette, S. et Clavier, J., (2004). Status of the ormer (*Haliotis tuberculata* L.) industry in Europe. *Journal of Shellfish Research* 23, 951-956.

Huchette, S. H., Koh, C. S. et Day, R., (2003). The effects of density on the behaviour and growth of juvenile blacklip abalone (*Haliotis rubra*). *Aquaculture International* 11, 411-428.

Hudson, J. B., Kim, J. H., Lee, M. K., DeWreede, R. E. et Hong, Y. K., (1999). Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds : Evidence for multiple activities. *Journal of Applied Phycology* 10, 427-434.

Husa, V., Steen, H. et Sjøtun, K., (2014). Historical changes in macroalgal communities in Hardangerfjord (Norway). *Marine Biology Research* 10, 226-240.

Huynh, T.-G., Yeh, S.-T., Lin, Y.-C., Shyu, J.-F., Chen, L.-L. et Chen, J.-C., (2011). White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing *Sargassum hemiphyllum* var. *chinense* powder and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology* 31, 286-293.

-|-

Indergaard, M. et Minsaas, J., (1991). Animal and human nutrition. *Seaweed resources in Europe: uses and potential* 21-64.

Ishimaru, K., Akagawa-Matsushita, M. et Muroga, K., (1996). *Vibrio ichthyenteri* sp. nov., a pathogen of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 155-159.

Ito, K. et Hori, K., (1989). Seaweed: chemical composition and potential food uses. *Food Reviews International* 5, 101-144.

Iwamoto, Y., Suzuki, Y., Kurita, A., Watanabe, Y., Shimizu, T., Ohgami, H. et Yanagihara, Y., (1995). *Vibrio trachuri* sp. nov., a new species isolated from diseased Japanese horse mackerel. *Microbiology and immunology* 39, 831-837.

-J-

- Janiak, D. S. (2009). Ecological impacts of the non-native *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta) in Long Island sound, University of Connecticut.
- Janiak, D. S. et Whitlatch, R. B., (2012). Epifaunal and algal assemblages associated with the native *Chondrus crispus* (Stackhouse) and the non-native *Grateloupia turuturu* (Yamada) in eastern Long Island Sound. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 413, 38-44.
- Jensen, S., Samuelsen, O. B., Andersen, K., Torkildsen, L., Lambert, C., Choquet, G., Paillard, C. et Bergh, Ø., (2003). Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V. tapetis* isolated from corkwing wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis. *Diseases of Aquatic Organismes* 53, 25-31.
- Jiang, H.-F., Liu, X.-L., Chang, Y.-Q., Liu, M.-T. et Wang, G.-X., (2013). Effects of dietary supplementation of probiotic *Shewanella colwelliana* WA64, *Shewanella olleyana* WA65 on the innate immunity and disease resistance of abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Fish and Shellfish Immunology* 35, 86-91.
- Jiang, Q., Shi, L., Ke, C., You, W. et Zhao, J., (2013). Identification and characterization of *Vibrio harveyi* associated with diseased abalone *Haliotis diversicolor*. *Diseases of Aquatic Organisms* 103, 133-139.
- John, D. M., Prud'homme van Reine, W. F., Lawson, G. W., Kostermans, T. B. et Price, J. H., (2004). A taxonomic and geographical catalogue of the seaweeds of the western coast of Africa and adjacent islands. *Beihefte zur Nova Hedwigia* 127, 1-339.
- Johnson, F. H. et Shunk, I., (1936). An interesting new species of luminous bacteria. *Journal of Bacteriology* 31, 585.
- Johnston, D., Moltschaniwskyj, N. et Wells, J., (2005). Development of the radula and digestive system of juvenile blacklip abalone (*Haliotis rubra*): Potential factors responsible for variable weaning success on artificial diets. *Aquaculture* 250, 341-355.

-K-

- Kanjana, K., Radtanatip, T., Asuvapongpatana, S., Withyachumnarnkul, B. et Wongprasert, K., (2011). Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish and Shellfish Immunology* 30, 389-396.

Kawamura, T., Roberts, R. D. et Nicholson, C. M., (1998). Factors affecting the food value of diatom strains for post-larval abalone *Haliotis iris*. *Aquaculture* 160, 81-88.

Kawamura, T., Roberts, R. D. et Yamashita, Y., (2001). Radula development in abalone *Haliotis discus hannai* from larva to adult in relation to feeding transitions. *Fisheries Science* 67, 596-605.

Kaysner, C. et DePaola, A., (2001). Vibrio. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Downes, FP e Ito, K. Washington, DC. American Public Health Association 405-420.

Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J. et Gibson, L., (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 274, 1-14.

Kirkendale, L., Robertson-Andersson, D. V. et Winberg, P. C., (2010). Review on the use and production of algae and manufactured diets as feed for sea-based abalone aquaculture in Victoria. *Shoalhaven Marine and Freshwater Centre*

Koike, Y., (1978). Biological and ecological studies on the propagation of the ormer, *Haliotis tuberculata* Linnaeus. I. Larval development and growth of juveniles. *La mer (Bulletin de la Société franco-japonaise d'océanographie)* 16, 124.

Kraan, S. et Guiry, M. D., (2006). A genetic investigation of two morphotypes of *Palmaria palmata* (Palmariales, Rhodophyta) using Rubisco spacer and ITS 1 and ITS 2 sequences. *Cryptogamie Algologie* 27, 17-30.

Kumari, P., Kumar, M., Gupta, V., Reddy, C. et Jha, B., (2010). Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. *Food Chemistry* 120, 749-757.

Kylin, H., (1944). Die Rhodophyceen der schwedischen westküste. *Gleerup* 37,

-L-

Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gelebart, F., Cordevant, C., Lange, M. et Poulet, S., (2001). A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Diseases of Aquatic Organisms* 46, 139-145.

Lafontaine, N., Mussio, I. et Rusig, A.-M., (2011). Production and regeneration of protoplasts from *Grateloupia turuturu* Yamada (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 23, 17-24.

- Lamarck (1822). Histoire naturelle des animaux sans vertebres, Paris: 7 volumes. Vol. 1 [Introduction]: Verdière, i-xvi, 1-462 [March 1815]; Vol. 2 [les Polypes, les Radiaires]: Verdière, 1-568 [March 1816]; Vol. 3 [suite des Radiaires; les Tuniciers; les Vers]: Verdière, 1-586 [August, 1816]; Vol. 4: Deterville/Verdière, 1-603 [April 1817]; Vol. 5 [les Arachnides; les Crustacés; les Annélides; les Cirripèdes; les Conchifères]: Paris, Deterville/Verdière, 1-612 [25 July 1818]; Vol. 6(1) [suite des Conchifères; Les Mollusques]: published by the Author, i-vi, 1-343 [June 1819]; Vol. 6(2) (suite): published by the Author, 1-232 [April 1822]; Vol. 7 (suite): published by the Author, 1-711. [August 1822].
- Lavilla-Pitogo, C. R., Baticados, M. C. L., Cruz-Lacierda, E. R. et de la Pena, L. D., (1990). Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture* 91, 1-13.
- Le Gall, L., Deniaud, E. et Rusig, A.-M., (2004). Etude de la phenologie de la reproduction de la Rhodophyceae *Palmaria palmata* le long des cotes francaises de la Manche. *Cahiers de Biologie Marine* 45, 269-275.
- Lee, K., Liu, P. et Chuang, W., (2002). Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. *Marine Biotechnology* 4, 267-277.
- Lee, R. K. S., (1980). A catalogue of the marine algae of the Canadian Arctic. *National Museum of Canada Publications in Botany* 9, 1-82.
- Lee, Y.-H., Ota, T. et Vacquier, V. D., (1995). Positive selection is a general phenomenon in the evolution of abalone sperm lysin. *Molecular Biology and Evolution* 12, 231-238.
- Lee, Y. et Kang, S., (2001). A catalogue of the seaweeds in Korea. *Cheju National University Press* 1-662.
- Lewis, C., Eickhoff, R., Stringham, C., Mihoan, K. et Tubbs, K., (1992). Abalone egg vitelline layers and hybrid gamete interactions. *Abalone of the World: biology fisheries and culture*. Oxford: Blackwell Scientific
- Li, K., Li, X. et Wang, B., (2008). Chemical constituents of the red alga *Grateloupia turuturu*. *Journal of Biotechnology* 136, S598-S599.
- Li, T., Ding, M., Zhang, J., Xiang, J. et Liu, R., (1998). Studies on the pustule disease of abalone(*Haliotis discus hannai* Ino) on the Dalian coast. *Journal of Shellfish Research* 17, 707-711.
- Li, Y., Qin, J. G., Abbott, C. A., Li, X. et Benkendorff, K., (2007). Synergistic impacts of heat shock and spawning on the physiology and immune health of *Crassostrea gigas*: an explanation for

summer mortality in Pacific oysters. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 293, R2353-R2362.

Linnaeus, C., (1758). *Systema Naturae per Regna Tria Naturae* [editio decima, reformata 1 (Regnum animale)]. *Salvii, Stockholm* 824,

Linnaeus, C. v., (1753). *Species Plantarum*, I. Ed. L. *Salvii, Stockholm*

Lipton, A. et Pramitha, V., (2009). Marine secondary metabolites (MSM) from macroalgae enhance bacterial clearance in hemolymph of *Penaeus monodon*. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh* 61, 42-47.

Littler, M. M., Littler, D. S., Blair, S. M. et Norris, J. N., (1985). Deepest known plant life discovered on an uncharted seamount. *Science* 227, 57-59.

Liu, F. et Pang, S., (2010). Nonculturability of the pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in live culture of *Grateloupia turuturu* is associated with bacterial attachment to the algal thalli. *Acta Oceanologica Sinica* 29, 92-103.

Liu, P.-C., Chen, Y.-C., Huang, C.-Y. et Lee, K.-K., (2000). Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cultured small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*, with withering syndrome. *Letters in Applied Microbiology* 31, 433-437.

Liu, P.-C., Chuang, W.-H. et Lee, K.-K., (2003). Infectious gastroenteritis caused by *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) in cultured red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Journal of Applied Ichthyology* 19, 59-61.

Liu, P.-C., Lin, J.-Y., Chuang, W.-H. et Lee, K.-K., (2004). Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) from the farmed marine cobia fish *Rachycentron canadum* L. with gastroenteritis syndrome. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20, 495-499.

Liu, P., Chen, Y. et Lee, K., (2000). Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Microbios* 104, 71-77.

Liu, X., Wu, F., Zhao, H., Zhang, G. et Guo, X., (2009). A novel shell color variant of the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* Ino subject to genetic control and dietary influence. *Journal of Shellfish Research* 28, 419-424.

Lüning, K. (1990). *Seaweeds*.

Leonart, M., Handlinger, J. et Powell, M., (2003). Spionid mudworm infestation of farmed abalone (*Haliotis spp.*). *Aquaculture* 221, 85-96.

-M-

Mabeau, S. et Fleurence, J., (1993). Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends in Food Science and Technology* 4, 103-107.

Magne, F., (1987). La tétrasporogénèse et le cycle de développement des Palmariales (Rhodophyta) : une nouvelle interprétation. *Cryptogamie Algologie* 8, 273-280.

Mai, K., Mercer, J. P. et Donlon, J., (1995a). Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. III. response of abalone to various levels of dietary lipid. *Aquaculture* 134, 65-80.

Mai, K., Mercer, J. P. et Donlon, J., (1995b). Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. IV. Optimum dietary protein level for growth. *Aquaculture* 136, 165-180.

Mai, K., Mercer, J. P. et Donlon, J., (1996). Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. V. The role of polyunsaturated fatty acids of macroalgae in abalone nutrition. *Aquaculture* 139, 77-89.

Manganaro, M., Laurà, R., Guerrera, M. C., Lanteri, G., Zaccone, D. et Marino, F., (2012). The morphology of gills of *Haliotis tuberculata* (Linnaeus, 1758). *Acta Zoologica* 93, 436-443.

Maréchal, J.-P., Culioli, G., Hellio, C., Thomas-Guyon, H., Callow, M. E., Clare, A. S. et Ortao-Magné, A., (2004). Seasonal variation in antifouling activity of crude extracts of the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae) against cyprids of *Balanus amphitrite* and the marine bacteria *Cobetia marina* and *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 313, 47-62.

Marston, M. et Villalard-Bohnsack, M., (2002). Genetic variability and potential sources of *Grateloupia doryphora* (Halymeniaceae, Rhodophyta), an invasive species in Rhode Island waters (USA). *Journal of Phycology* 38, 649-658.

Martí, R., Uriz, M. J., Ballesteros, E. et Turon, X., (2004). Benthic assemblages in two Mediterranean caves: species diversity and coverage as a function of abiotic parameters and geographic distance. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 84, 557-572.

- Mata, L., Wright, E., Owens, L., Paul, N. et De Nys, R., (2013). Water-soluble natural products from seaweed have limited potential in controlling bacterial pathogens in fish aquaculture *Journal of Applied Phycology* 25, 1963-1973.
- Mathieson, A., Dawes, C., Pederson, J., Gladych, R. et Carlton, J., (2008). The Asian red seaweed *Grateloupia turuturu* (Rhodophyta) invades the Gulf of Maine. *Biological Invasions* 10, 985-988.
- Matsuhira, B., Conte, A. F., Damonte, E. B., Kolender, A. A., Matulewicz, M. C., Mejías, E. G., Pujol, C. A. et Zúñiga, E. A., (2005). Structural analysis and antiviral activity of a sulfated galactan from the red seaweed *Schizymenia binderi* (Gigartinales, Rhodophyta). *Carbohydrate Research* 340, 2392-2402.
- Meistertzheim, A.-L., Calvès, I., Roussel, V., Van Wormhoudt, A., Laroche, J., Huchette, S. et Paillard, C., (2014). New genetic markers to identify European resistant abalone to vibriosis revealed by high-resolution melting analysis, a sensitive and fast approach. *Marine Biology* 161, 1883-1893.
- Melo, F. R., Pereira, M. S., Foguel, D. et Mourão, P. A., (2004). Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides different mechanisms for heparin and sulfated galactans. *Journal of Biological Chemistry* 279, 20824-20835.
- Mercer, J. P., Mai, K. S. et Donlon, J., (1993). Comparative-studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* Linnaeus and *Haliotis discus hannai* Ino .I. Effects of algal diets on growth and biochemical composition. *International Journal Invertebrate Reproduction Development* 23, 75-88.
- Mgaya, Y., Gosling, E., Mercer, J. et Donlon, J., (1995). Genetic variation at three polymorphic loci in wild and hatchery stocks of the abalone, *Haliotis tuberculata* Linnaeus. *Aquaculture* 136, 71-80.
- Mgaya, Y. D., (1995). Synopsis of biological data on the European abalone (ormer), *Haliotis tuberculata* Linnaeus, 1758 (Gastropoda: Haliotidae). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
- Mgaya, Y. D. et Mercer, J. P., (1995). The effects of size grading and stocking density on growth performance of juvenile abalone, *Haliotis tuberculata* Linnaeus. *Aquaculture* 136, 297-312.
- Miller, G. L. et Miller, E. E., (1948). Determination of nitrogen in biological materials. *Analytical Chemistry* 20, 481-488.
- Miyazawa, K. et Ito, K., (1974). Isolation of a new peptide, L-citrullinyl-L-arginine, from a red alga *Grateloupia turuturu*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 40, 815-818.

Miyazawa, K. et Ito, K., (1974). Isolation of L-methionine-*l*-sulfoxide and N-methylmethionine sulfoxide from a red alga *Grateloupia turuturu*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 40, 655-660.

Moore, J. D., Juhasz, C. I., Robbins, T. T. et Grosholz, E. D., (2007). The introduced sabellid polychaete *Terebrasabella heterouncinata* in California: transmission, methods of control and survey for presence in native gastropod populations. *Journal of Shellfish Research* 26, 869-876.

Moore, J. D., Robbins, T. T. et Friedman, C. S., (2000). Withering syndrome in farmed red abalone *Haliotis rufescens*: Thermal induction and association with a gastrointestinal Rickettsiales-like prokaryote. *Journal of Aquatic Animal Health* 12, 26-34.

Morgan, K. et Simpson, F., (1981). Cultivation of *Palmaria palmata* (Rhodymenia) : Effect of high concentrations of nitrate and ammonium on growth and nitrogen uptake. *Aquatic Botany* 11, 167-171.

Morgan, K., Wright, L. et Simpson, F., (1980). Review of chemical constituents of the red alga *Palmaria palmata* (dulse). *Economic Botany* 34, 27-50.

Mottet, M. G., (1978). A review of the fishery biology of abalones. *Department of Fisheries, State of Washington*

Mulvaney, W. J., Winberg, P. C. et Adams, L., (2013). Comparison of macroalgal (*Ulva* and *Grateloupia* spp.) and formulated terrestrial feed on the growth and condition of juvenile abalone. *Journal of Applied Phycology* 25, 815-824.

Munier, M., Dumay, J., Morançais, M., Jaouen, P. et Fleurence, J., (2013). Variation in the biochemical composition of the edible seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada harvested from two sampling sites on the Brittany Coast (France): The influence of storage method on the extraction of the seaweed pigment R-Phycoerythrin. *Journal of Chemistry* 2013, 8.

Murray, A. G. et Peeler, E. J., (2005). A framework for understanding the potential for emerging diseases in aquaculture. *Preventive Veterinary Medicine* 67, 223-235.

-N-

Nakatsugawa, T., Nagai, T., Hiya, K., Nishizawa, T. et Muroga, K., (1999). A virus isolated from juvenile Japanese black abalone *Nordotis discus discus* affected with amyotrophia. *Diseases of Aquatic Organisms* 36, 159-161.

Naviner, M., Bergé, J.-P., Durand, P. et Le Bris, H., (1999). Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. *Aquaculture* 174, 15-24.

Naylor, J. R. et McShane, P. E., (2001). Mortality of post-settlement abalone *Haliotis iris* caused by conspecific adults and wave exposure. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 35, 363-369.

Neori, A., Msuya, F. E., Shauli, L., Schuenhoff, A., Kopel, F. et Shpigel, M., (2003). A novel three-stage seaweed (*Ulva lactuca*) biofilter design for integrated mariculture. *Journal of Applied Phycology* 15, 543-553.

Neto, A. I., (1994). Checklist of the benthic marine macroalgae of the Azores Arquipélago. *Ciências Biológicas e Marinhas* 12, 15-34.

Nicolas, J.-L., Basuyaux, O., Mazurie, J. et Thebault, A., (2002). *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Diseases of Aquatic Organisms* 50, 35-43.

Nishimori, E., Hasegawa, O., Numata, T. et Wakabayashi, H., (1998). *Vibrio carchariae* causes mass mortalities in Japanese abalone, *Sulculus diversicolor supratexta*. *Fish Pathology*

Nylund, G., Gribben, P., de Nys, R., Steinberg, P. et Pavia, H., (2007). Surface chemistry versus whole-cell extracts: antifouling tests with seaweed metabolites. *Marine Ecology Progress Series* 329, 73-84.

-O-

Onitsuka, T., Kawamura, T., Ohashi, S., Iwanaga, S., Horii, T. et Watanabe, Y., (2008). Effects of sediments on larval settlement of abalone *Haliotis diversicolor*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 365, 53-58.

Ortiz, J., Uquiche, E., Robert, P., Romero, N., Quitral, V. et Llantén, C., (2009). Functional and nutritional value of the Chilean seaweeds *Codium fragile*, *Gracilaria chilensis* and *Macrocystis pyrifera*. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111, 320-327.

-P-

Pacini, F., (1854). Osservazioni microscopiche e deduzioni patologiche sul cholera asiatico. *Biblioteca comunale dell'Archiginnasio*.

- Page, M. J., Northcote, P. T., Webb, V. L., Mackey, S. et Handley, S. J., (2005). Aquaculture trials for the production of biologically active metabolites in the New Zealand sponge *Mycale hentscheli* (Demospongiae: Poecilosclerida). *Aquaculture* 250, 256-269.
- Paillard, C., (2004a). A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Living Resources* 17, 467-475.
- Paillard, C., Korsnes, K., Le Chevalier, P., Le Boulay, C., Harkestad, L. S., Eriksen, A. G., Willassen, E., Bergh, Ø., Bovo, C. et Skår, C. K., (2008). *Vibrio tapetis*-like strain isolated from introduced Manila clams *Ruditapes philippinarum* showing symptoms of brown ring disease in Norway. *Diseases of Aquatic Organisms* 81, 153–161.
- Paillard, C., Le Roux, F. et Borrego, J. J., (2004b). Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquatic Living Resources* 17, 477-498.
- Pang, S. J., Xiao, T., Shan, T. F., Wang, Z. F. et Gao, S. Q., (2006). Evidences of the intertidal red alga *Grateloupia turuturu* in turning *Vibrio parahaemolyticus* into non-culturable state in the presence of light. *Aquaculture* 260, 369-374.
- Parker, D., Haaker, P. et Togstad, H., (1992). Case histories for three species of California abalone, *Haliotis corrugata*, *H. fulgens*, and *H. cracherodii*. *Abalone of the world: biology, fisheries and culture* 384-394.
- Pedersen, P. M., (2011). Grønlands havalger. *Copenhagen: Forlaget Epsilon.DK*. 1, 7-208.
- Peña, J. B., (1986). Preliminary study on the induction of artificial spawning in *Haliotis coccinea canariensis* Nordsieck (1975). *Aquaculture* 52, 35-41.
- Petton, B., Pernet, F., Robert, R. et Boudry, P., (2013). Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions* 3, 257-273.
- Plouguerné, E., (2006). Etude écologique et chimique de deux algues introduites sur les côtes bretonnes, *Grateloupia turuturu* Yamada et *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt: Nouvelles ressources biologiques de composés à activité antifouling. *Université de Bretagne Occidentale. Brest-France* Docteur en chimie marine, 248.
- Plouguerné, E., Hellio, C., Deslandes, E., Véron, B. et Stiger-Pouvreau, V., (2008). Anti-microfouling activities in extracts of two invasive algae: *Grateloupia turuturu* and *Sargassum muticum*. *Botanica Marina* 51, 202-208.

Plouguerné, E., Kikuchi, H., Oshima, Y., Deslandes, E. et Stiger-Pouvreau, V., (2006). Isolation of Cholest-5-en-3-ol formate from the red alga *Grateloupia turuturu* Yamada and its chemotaxonomic significance. *Biochemical systematics and ecology* 34, 714-717.

Prado, S., Romalde, J. L. et Barja, J. L., (2010). Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. *Veterinary Microbiology* 145, 187-197.

-Q-

Qi, Z., Liu, H., Li, B., Mao, Y., Jiang, Z., Zhang, J. et Fang, J., (2010). Suitability of two seaweeds, *Gracilaria lemaneiformis* and *Sargassum pallidum*, as feed for the abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *Aquaculture* 300, 189-193.

-R-

Raguénès, G., Peres, A., Ruimy, R. et Pignet, P., (1997). *Alteromonas infernus* sp. nov., a new polysaccharide-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Society for Applied Bacteriology* 422-430.

Rajapakse, N. et Kim, S.-K., (2011). Nutritional and digestive health benefits of seaweed. *Advances in food and nutrition research* 64, 17-28.

Rasmussen, J. et Harrison, A., (2011). The benefits of supplementary fat in feed rations for ruminants with particular focus on reducing levels of methane production. *Veterinary Science* 2011,

Reeve, L. A., (1846). Descriptions of forty new species of *Haliotis*. *Annals and Magazine of Natural History* 18, 197-202.

Reid, H. I., Duncan, H. L., Laidler, L. A., Hunter, D. et Birkbeck, T. H., (2003). Isolation of *Vibrio tapetis* from cultivated Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* 221, 65-74.

Robles-Centeno, P. O., Ballantine, D. L. et Gerwick, W. H., (1996). Dynamics of antibacterial activity in three species of Caribbean marine algae as a function of habitat and life history. *Hydrobiologia* 326, 457-462.

Rødde, R. S. H., Vårum, K. M., Larsen, B. A. et Myklestad, S. M., (2004). Seasonal and geographical variation in the chemical composition of the red alga *Palmaria palmata* (L.) Kuntze. *Botanica Marina* 47, 125-133.

Rosell, K.-G. et Srivastava, L. M., (1987). Fatty acids as antimicrobial substances in brown algae. *Twelfth International Seaweed Symposium* 471-475.

Rosen, G., Langdon, C. J. et Evans, F., (2000). The nutritional value of *Palmaria mollis* cultured under different light intensities and water exchange rates for juvenile red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture* 185, 121-136.

Rowe-Magnus, D. A., Zouine, M. et Mazel, D., (2006). The adaptive genetic arsenal of pathogenic *Vibrio* species: the role of integrons. *The biology of vibrios*. ASM Press 95-111.

Ruiz, D. et Ziemmeck, F., (2011). Checklist of Galapagos Heterokonts: Brown algae and related groups. <http://www.darwinfoundation.org/datazone/checklists/algae/ochrophyta/> Last updated 28 Jan 2014.

Rupérez, P., (2002). Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chemistry* 79, 23-26.

-S-

Sahoo, D., (2001). Seaweeds of Indian coast. *New Delhi: A.P.H. Publishing*. 283.

Sakata, K. et Ina, K., (1983). Digalactosyldiacylglycerols isolated from a brown alga as effective phagostimulants for a young abalone. *Agricultural and biological chemistry* 47, 2957-2960.

Samain, J. F. et McCombie, H., (2008). Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *The Morest Project*. Versailles: Quae Editions. 379 pp

Sastry, V. et Rao, G., (1994). Antibacterial substances from marine algae: successive extraction using benzene, chloroform and methanol. *Botanica Marina* 37, 357-360.

Saunders, G. W. et Hommersand, M. H., (2004). Assessing red algal supraordinal diversity and taxonomy in the context of contemporary systematic data. *American Journal of Botany* 91, 1494-1507.

Saunders, G. W. et Withall, R. D., (2006). Collections of the invasive species *Grateloupia turuturu* (Halymeniales, Rhodophyta) from Tasmania, Australia. *Phycologia* 45, 711-714.

- Saunders, T. M., Mayfield, S. et Hogg, A., (2008). A simple, cost-effective, morphometric marker for characterising abalone populations at multiple spatial scales. *Marine Freshwater Research* 59, 32-40.
- Sawabe, T., Inoue, S., Fukui, Y., Yoshie, K., Nishihara, Y. et Miura, H., (2007). Mass mortality of Japanese abalone *Haliotis discus hannai* caused by *Vibrio harveyi* infection. *Microbes and Environments* 22, 300-308.
- Sawabe, T., Kita-Tsukamoto, K. et Thompson, F. L., (2007). Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. *Journal of Bacteriology* 189, 7932-7936.
- Sawabe, T., Sugimura, I., Ohtsuka, M., Nakano, K., Tajima, K., Ezura, Y. et Christen, R., (1998). *Vibrio halioticoli* sp. nov., a non-motile alginolitic marine bacterium isolated from the gut of the abalone *Haliotis discus hannai*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 573-580.
- Schuenhoff, A., Shpigel, M., Lupatsch, I., Ashkenazi, A., Msuya, F. E. et Neori, A., (2003). A semi-recirculating, integrated system for the culture of fish and seaweed. *Aquaculture* 221, 167-181.
- Segarra, A., Pépin, J. F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N. et Renault, T., (2010). Detection and description of a particular *Ostreid herpesvirus 1* genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research* 153, 92-99.
- Segawa, S., (1981). Genshoku Nihon kaiso zukan. Colored illustrations of the seaweeds of Japan. Fourth printing. Osaka: Hoikusha Publishing Co. Ltd. 1-195.
- Sekar, S. et Chandramohan, M., (2008). Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology* 20, 113-136.
- Selvin, J., Manilal, A., Sujith, S., Kiran, G. S. et Lipton, A. P., (2011). Efficacy of marine green alga *Ulva fasciata* extract on the management of shrimp bacterial diseases. *Journal of Aquatic Research* 39, 197-204.
- Shanmugam, M. et Mody, K. H., (2000). Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Current Science* 79, 1672-1683.
- Shepherd, S., (1973). Studies on southern Australian abalone (genus *Haliotis*). I. Ecology of five sympatric species. *Marine and Freshwater Research* 24, 217-258.
- Shepherd, S. et Laws, H., (1974). Studies on southern Australian abalone (Genus *Haliotis*). II. Reproduction of five species. *Marine and Freshwater Research* 25, 49-62.

- Shepherd, S. et Turner, J., (1985). Studies on southern Australian abalone (genus *Haliotis*). VI. Habitat preference, abundance and predators of juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 93, 285-298.
- Shepherd, S. A. et Steinberg, P. D. (1992). Food preference of three Australian abalone species with the review of the algal food of abalone, In: S.A. Shepherd, M.J. Tegner and S.A. Guzman de1 Proo (Editors), *Abalone of the World. Biology, Fisheries and Culture*. Fishing News Books, Oxford, pp. 169-181.
- Shpigel, M., Marshall, A., Lupatsch, I., Mercer, J. P. et Neori, A., (1996). Acclimation and propagation of the abalone *Haliotis tuberculata* in a Land-Based Culture System in Israel. *Journal World Aquatic Society* 27, 435-442.
- Shpigel, M., Norman L Ragg, Ingrid Lupatsch et Neori, A., (1999). Protein content determines the nutritional value of the seaweed *Ulva lactuca* L for the abalone *Haliotis tuberculata* L. and *H. discus hannai* Ino. *Journal of Shellfish Research* 18, 227-234.
- Shruti, C., (2012). *Vibrio* related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. *Journal of Marine Science: Research and Development*
- Siirustananun N, Chen JC, Lin YC, Yeh ST, Kiuo CH, Chen LL, Sim SS et SL, C., (2011). Dietary administration of a *Gracilaria tenuistipitata* extract enhances the immune response and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology* 31, 848-855.
- Silva, P. C., Meñez, E. G. et Moe, R. L., (1987). Catalog of the benthic marine algae of the Philippines. *Smithsonian Contributions to Marine Sciences* 27, 1-179.
- Simon-Colin, C., Kervarec, N., Pichon, R., Bessières, M.-A. et Deslandes, E., (2002). Characterization of N-methyl-L-methionine sulfoxide and isethionic acid from the red alga *Grateloupia doryphora*. *Phycology Research* 50, 125-128.
- Simon, C., Gall, E. A. et Deslandes, E., (2001). Expansion of the red alga *Grateloupia doryphora* along the coasts of Brittany (France). *Hydrobiologia* 443, 23-29.
- Simon, C., Ludford, A. et Wynne, S., (2006). Spionid polychaetes infesting cultured abalone *Haliotis midae* in South Africa. *African Journal of Marine Science* 28, 167-171.
- Sobhon, P., Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Linthong, V., Thongkukiatkul, A., Jarayabhand, P., Kruatrachue, M., Upatham, E. et Poomthong, T., (1999). Classification of germ cells, reproductive cycle and maturation of gonads in *Haliotis asinina* Linnaeus. *Science Asia* 25, 3-21.

Soletchnik, P., Razet, D., Geairon, P., Faury, N. et Gouletquer, P., (1997). Ecophysiology of maturation and spawning in oyster *Crassostrea gigas*: metabolic (respiration) and feeding (clearance and absorption rates) responses at different maturation stages. *Aquatic Living Resources*

Soto-Rodriguez, S., Roque, A., Lizarraga-Partida, M., Guerra-Flores, A. et Gomez-Gil, B., (2003). Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii. *Diseases of Aquatic Organisms* 53, 231-240.

Stegenga, H., Karremans, M. et Simons, J., (2007). Zeewieren van de voormalige oesterputten bij Yerseke. *Gorteria* 32, 125.

Steinbeck, J., Groff, J., Friedman, C., McDowell, T. et Hedrick, R., (1992). Investigations into mortality among populations of the California black abalone, *Haliotis cracherodii*, on the central coast of California, USA. *Abalone of the world: biology, fisheries and culture. Fishing News Books, Blackwell Scientific, Cambridge, UK* 203-213.

Steneck, R. S. et Watling, L., (1982). Feeding capabilities and limitation of herbivorous molluscs: A functional group approach. *Marine Biology* 68, 299-319.

Stephenson, T., (1924). Notes on *Haliotis tuberculata*. I. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom (New Series)* 13, 480-495.

-T-

Takami, H. et Kawamura, T., (2003). Dietary changes in the abalone, *Haliotis discus hannai*, and relationship with the development of the digestive organ. *Japan Agricultural Research Quarterly* 37, 89-98.

Taylor, M. H. et Tsvetnenko, E., (2004). A growth assessment of juvenile abalone *Haliotis laevigata* fed enriched macroalgae *Ulva rigida*. *Aquaculture International* 12, 467-480.

Taylor, W. R., (1930). A synopsis of the marine algae of Brazil. *Revue Algologique* 5, 1-35.

Thompson, F. L., Iida, T. et Swings, J., (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and molecular biology reviews* 68, 403-431.

- Thompson, J. R. et Polz, M. F., (2006). Dynamics of *Vibrio* populations and their role in environmental nutrient cycling. *The biology of vibrios*. ASM Press 190-203.
- Thongrod, S., Tamtin, M., Chairat, C. et Boonyaratpalin, M., (2003). Lipid to carbohydrate ratio in donkey's ear abalone (*Haliotis asinina*, Linne) diets. *Aquaculture* 225, 165-174.
- Titlyanov, E. A. et Titlyanov, T. V., (2012). Marine plants of the Asian Pacific Region countries, their use and cultivation. *Vladivostok: Dalnauka and A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology Far East Branch of the Russian Academy of Sciences*. 1-376.
- Travers, M.-A., (2008). Interaction de la bactérie *Vibrio harveyi* avec son hôte, l'horreau *Haliotis tuberculata*: approches physiologiques, cellulaires et moléculaires. *Université de Bretagne Occidentale, Brest- France*
- Travers, M.-A., Barbou, A., Le Goïc, N., Huchette, S., Paillard, C. et Koken, M., (2008a). Construction of a stable GFP-tagged *Vibrio harveyi* strain for bacterial dynamics analysis of abalone infection. *FEMS Microbiology Letters* 289, 34-40.
- Travers, M.-A., Basuyaux, O., Le Goïc, N., Huchette, S., Nicolas, J.-L., Koken, M. et Paillard, C., (2009). Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Global Change Biology* 15, 1365-1376.
- Travers, M.-A., Le Goïc, N., Huchette, S., Koken, M. et Paillard, C., (2008b). Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. *Fish and Shellfish Immunology* 25, 800-808.
- Troell, M., Halling, C., Neori, A., Chopin, T., Buschmann, A., Kautsky, N. et Yarish, C., (2003). Integrated mariculture: asking the right questions. *Aquaculture* 226, 69-90.
- Troell, M., Robertson-Andersson, D., Anderson, R. J., Bolton, J. J., Maneveldt, G., Halling, C. et Probyn, T., (2006). Abalone farming in South Africa: An overview with perspectives on kelp resources, abalone feed, potential for on-farm seaweed production and socio-economic importance. *Aquaculture* 257, 266-281.

-U-

- Uki, N. et Kikuchi, S., (1984). Regulation of maturation and spawning of an abalone, *Haliotis* (Gastropoda) by external environmental factors. *Aquaculture* 39, 247-261.

- Vadas, R., Beal, B., Dowling, T. et Fegley, J., (2000). Experimental field tests of natural algal diets on gonad index and quality in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis* : a case for rapid summer production in post-spawned animals. *Aquaculture* 182, 115-135.
- Val, A., Platas, G., Basilio, A., Cabello, A., Gorrochategui, J., Suay, I., Vicente, F., Portillo, E., Río, M. et Reina, G., (2001). Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *International Microbiology* 4, 35-40.
- Valenzuela Miranda, S., (2005). Catálogo de las algas recogidas por Faustino Miranda en las costas atlánticas de Francia. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)* 14, 5-12.
- Van Alstyne, K. L., Ehlig, J. M. et Whitman, S. L., (1999). Feeding preferences for juvenile and adult algae depend on algal stage and herbivore species. *Marine Ecology Progress Series* 180, 179-185.
- van derMeer, J. P. et Todd, E. R., (1980). The life history of *Palmaria palmata* in culture. A new type for the Rhodophyta. *Canadian Journal of Botany* 58, 1250-1256.
- Van Gelder, N., (1981). The role of taurine and glutamic acid in the epileptic process: a genetic predisposition. *Reviews in Pure and Applied Pharmacological Sciences* 2, 293.
- Van Wormhoudt, A., Gaume, B., Le Bras, Y., Roussel, V. et Huchette, S., (2011). Two different and functional nuclear rDNA genes in the abalone *Haliotis tuberculata*: tissue differential expression. *Genetica* 139, 1217-1227.
- Van Wormhoudt, A., Le Bras, Y. et Huchette, S., (2009). *Haliotis marmorata* from Senegal; a sister species of *Haliotis tuberculata*: Morphological and molecular evidence. *Biochemical systematics and ecology* 37, 747-755.
- Vandenbergh, J., Thompson, F. L., Gomez-Gil, B. et Swings, J., (2003). Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture* 219, 9-20.
- Vargas, L., Quijón, P. et Bertrán, C., (2005). Polychaete infestation in cultured abalone (*Haliotis rufescens* Swainson) in Southern Chile. *Aquaculture Research* 36, 721-724.
- Verlaque, M., Brannock, P. M., Komatsu, T., Villalard-Bohnsack, M. et Marston, M., (2005). The genus *Grateloupia* C. Agardh (Halymeniaceae, Rhodophyta) in the Thau Lagoon (France, Mediterranean): a case study of marine plurispecific introductions. *Phycologia* 44, 477-496.

Vezzulli, L., Colwell, R. R. et Pruzzo, C., (2013). Ocean warming and spread of pathogenic vibrios in the aquatic environment. *Microbial ecology* 65, 817-825.

Vidyavathi, N. et Sridhar, K. R., (1991). Seasonal and geographical variations in the antimicrobial activity of seaweeds from the Mangalore Coast of India. *Botanica Marina* 34, 279.

Viera, M., Gómez Pinchetti, J., Courtois de Vicose, G., Bilbao, A., Suárez, S., Haroun, R. et Izquierdo, M., (2005). Suitability of three red macroalgae as a feed for the abalone *Haliotis tuberculata coccinea* Reeve. *Aquaculture* 248, 75-82.

Villalard-Bohnsack, M. et Harlin, M. M., (1992). Seasonal distribution and reproductive status of macroalgae in Narragansett Bay and associated waters, Rhode Island, USA *Botanica Marina* 35, 205-214.

Villalard-Bohnsack, M. et Harlin, M. M., (1997). The appearance of *Grateloupia doryphora* (Halymeniaceae, Rhodophyta) on the northeast coast of North America. *Phycologia* 36, 324-328.

Villalard-Bohnsack, M. et Harlin, M. M., (2001). *Grateloupia doryphora* (Halymeniaceae, Rhodophyta) in Rhode Island waters (USA): Geographical expansion, morphological variations and associated algae. *Phycologia* 40, 372-380

Vlachos, V., Critchley, A. et Von Holy, A., (1997). Antimicrobial activity of extracts from selected southern African marine macroalgae. *South African Journal Sciences* 93, 328-332.

-W-

Wang, S. C., Bligh, S. W. A., Shi, S. S., Wang, Z. T., Hu, Z. B., Crowder, J., Branford-White, C. et Vella, C., (2007). Structural features and anti-HIV-1 activity of novel polysaccharides from red algae *Grateloupia longifolia* and *Grateloupia filicina*. *International Journal of Biology and Macromolecules* 41, 369-375.

Wang, T., (2012). Macroalgae of Dongtou, Zhejiang. *Ocean Press, China* 1-4.

Wang, T., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H. G., Hreggvidsson, G. O., Jónsson, J. Ó., Thorkeisson, G. et Ólafsdóttir, G., (2010). Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmaria palmata*. *Food Sciences and Technology* 43, 1387-1393.

- Wang, Y.-B., Li, J.-R. et Lin, J., (2008). Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. *Aquaculture* 281, 1-4.
- Wendling, C. et Wegner, M., (2011). Predicting the pathogenicity of opportunistic *Vibrio* sp. isolated from the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *Evolution at the Sea, Puan Klent, Sylt, 7 November 2011 - 7 November 2011* .
- White, C., Kennedy, J. et Chaplin, M., (1986). Carbohydrate analysis: a practical approach, second ed. *The Practical Approach Series*
- Wilkes, R. J., Morabito, M. et Gargiulo, G. M., (2006). Taxonomic considerations of a foliose *Grateloupia* species from the Straits of Messina. *Journal of Applied Phycology* 18, 663-669.
- Winter, F. C. et Estes, J. A., (1992). Experimental evidence for the effects of polyphenolic compounds from *Dictyoneurum californicum* Ruprecht (*Phaeophyta*: Laminariales) on feeding rate and growth in the red abalone *Haliotis rufescens* Swainson. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 155, 263-277.
- Woelkerling, W. J., Lawson, G. W., Price, J. H., John, D. M. et Prud'homme van reine, W. F., (1998). Seaweeds of the western coast of tropical Africa and adjacent islands: a critical assessment. IV. Rhodophyta (Florideae) *Bulletin of the British Museum (Natural History) Botany* 28, 115-150.
- Woodring, W. P., (1931). A miocene *Haliotis* from southern California. *Journal of Paleontology* 34-39.
- Worden, A. Z., Seidel, M., Smriga, S., Wick, A., Malfatti, F., Bartlett, D. et Azam, F., (2006). Trophic regulation of *Vibrio cholerae* in coastal marine waters. *Environmental Microbiology* 8, 21-29.
- Wu, C.-J., Wang, H., Chan, Y.-L. et Li, T.-L., (2011). Passive immune-protection of small abalone against *Vibrio alginolyticus* infection by anti-*Vibrio* IgY-encapsulated feed. *Fish and Shellfish Immunology* 30, 1042-1048.

-Y-

- Yamada, T., Ogamo, A., Saito, T., Uchiyama, H. et Nakagawa, Y., (2000). Preparation of O-acylated low-molecular-weight carrageenans with potent anti-HIV activity and low anticoagulant effect. *Carbohydrate Polymers* 41, 115-120.
- Yates, J. et Peckol, P., (1993). Effects of nutrient availability and herbivory on polyphenolics in the seaweed *Fucus vesiculosus*. *Ecology* 1757-1766.

Yoon, H. S., Müller, K. M., Sheath, R. G., Ott, F. D. et Bhattacharya, D., (2006). Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta) *Journal of Phycology* 42, 482-492.

Yuan, Y. V., Bone, D. E. et Carrington, M. F., (2005). Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated in vitro. *Food Chemistry* 91, 485-494.

-Z-

Zhang, X. H. et Austin, B., (2000). Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *Journal of Fish Diseases* 23, 93-102.

Zhang, Z., (2008). A simulation study of abalone fertilization. *Journal of Shellfish Research* 27, 857-864.

Sites Webs

GIPBE-OBPNB 2011 : <http://www.observatoire-biodiversite-bretagne.fr/especes-invasives>

World Ocean Network, 2014 : <http://www.worldoceannetwork.org>

Annexes

Annexe 1

What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture?

Trends in Food Science & Technology

Référence :

Fleurence J., Morançais M., Dumay J., Decottignies P., Turpin V., Munier M., Garcia-Bueno N. et Jaouen P. (2012). "What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture?" Trends in Food Science & Technology **27** Parlement Européen et Conseil du 16 Décembre 2008 : 57-61.

What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture?

Joël Fleurence*,
Michèle Morançais,
Justine Dumay,
Priscilla Decottignies,
Vincent Turpin,
Mathilde Munier,
Nuria Garcia-Bueno and
Pascal Jaouen

Mer Molécule Santé, EA 2160, Université de Nantes,
Pôle Mer et Littoral, 2 rue de la Housinière, BP 92208,
44322 Nantes Cedex 3, France (Tel.: +33 2 51 12 56
50; fax: +33 2 51 12 56 68; e-mail: joel.fleurence@
univ-nantes.fr)

Seaweeds are traditionally used as sea vegetables in Asian countries but their consumption by western consumers is minimal. The nutritional value of algae and their potential use as functional ingredients in foods is discussed. The addition of seaweeds to the diet of marine animals produced by aquaculture is suggested. This would be a new opportunity to

* Corresponding author.

introduce seaweeds indirectly into the human food chain in western countries, especially in Europe. The treatment of wastewater produced by aquaculture facilities with macroalgae is an additional argument for the use of this marine resource in food production and the development of a new method for marine aquaculture.

Introduction

At least 145 species of macroalgae are used worldwide as food (Zemke-White & Ohno, 1999). Seaweeds are traditionally consumed in Asian countries as sea vegetables (Table 1). The famous hoshi-nori, prepared from red seaweeds belonging to the species *Porphyra tenera* or *Porphyra yezoensis*, is characterized by its richness in proteins (up to 47% of dry weight) and its specific taste is much appreciated by Japanese consumers (Nisizawa, Noda, Kikuchi, & Watanabe, 1987). The brown seaweeds *Undaria pinnatifida* and *Laminaria japonica*, known under the names of Wakame and Kombu, respectively, are also used as everyday foods by Japanese people. These two species are mainly produced by aquaculture in China, Korea and Japan (Table 1) and are used for food applications (sea vegetables or phycocolloid production).

In contrast, compared to Japan, macroalgae are rarely consumed in Europe. The edible seaweed consumption in Europe is close to 70 tonnes (dry products) versus 97,000 tonnes in Japan (Darcy-Vrillon, 1993). In France, the only European country which has established a specific regulation for the use of seaweeds as vegetables (Table 2) or ingredients (Mabeau & Fleurence, 1993), the consumption is estimated at 27 tonnes of dry products per year. In this particular context, what are the advantages and the prospects for using seaweeds as food in human or marine animal nutrition?

Nutritional value of seaweeds

The nutritional value of seaweeds differs according to the species and the family considered. For example, the red seaweeds contain a high level of proteins (Fleurence, 1999; Fujiwara-Arasaki, Mino, & Kuroda, 1984) (47% of dry weight for *P. yezoensis* and 35% for *Palmaria palmata*) (Table 3) while the green seaweeds, such as *Ulva lactuca* (sea lettuce), show a lower protein level (10–25% of dry weight) and brown algae, such as *L. japonica*, have the lowest protein content (5–12% of dry weight). According to

Table 1. Worldwide production of seaweed by aquaculture (Zemke-White & Ohno, 1999).

Seaweed genus	Aquaculture production (tonnes in dry weight)	Sea vegetable products
<i>Laminaria</i> sp ^a	682,581	Kombu
<i>Porphyra</i> sp	130,614	Nori
<i>Undaria</i> sp	101,708	Wakame
<i>Gracilaria</i> sp ^a	50,165	Ogo-nori

^a Production including phycocolloids and sea vegetables.

these data, the red seaweeds seem to be the most suitable source of proteins for human nutrition. These species, especially *P. palmata* (dulse) are described as containing a high concentration of methionine, up to 4.5 g amino acid/100 g of protein. However, other species belonging to the brown seaweeds (e.g. *Laminaria digitata*, *U. pinnatifida*) show a lower concentration in this amino acid, with 1.6 g amino acid/100 g of protein (Fleurence, 2004).

Unfortunately, seaweeds also contain polysaccharides (e.g. xylans, agar, carrageenan or alginates) which are a type of anti-nutritional factor limiting the digestibility of protein fractions (Horie, Sugase, & Horie, 1995).

However, an initial treatment of algae by enzymatic digestion with appropriate polysaccharidases or micro-organisms can significantly improve the *in vitro* digestibility of proteins from red seaweed such as *P. palmata* (Fleurence, 2004; Marion, Schwertz, Fleurence, Guéant, & Villaume, 2003). In addition, the red seaweeds are known to possess a red protein pigment called R-phycoerythrin (RPE) which is sometimes present at a high level (12% of dry weight). The RPE content follows the change in protein content, which is subject to marked seasonal variations (11.9–26% of dry weight) (Denis *et al.*, 2010; Galland-Imouli *et al.*, 1999). This pigment is already used in Asia as a food colourant (data unpublished).

As well as proteins, seaweeds are well known to contain a high proportion of polysaccharides (30–71% of dry weight) (Darcy-Vrillon, 1993; Jensen, 1993) which are considered food fibres for human consumption. The levels of

dietary fibre are up to 49.8% of dry weight for a red seaweed such as *Porphyra* sp (Nori) and up to 62% of dry weight for the brown seaweed *Hizikia fusiforme* (Hiziki) (Dawczynski, Schubert, & Jahreis, 2007). In contrast, the edible seaweeds are characterized by low levels of lipids, generally between 1.5 and 3.3% of dry weight (Fleurence, Gutbier, Mabeau, & Leray, 1994). For the red alga *Grateloupia turuturu*, consumed in Japan as a sea vegetable, the lipid content shows little variation (2.31–2.86% of dry weight) according to the season. This species is also characterized by a high level of eicosa-pentaenoic acid (up to 24% of the total fatty acid fraction) (Denis *et al.*, 2010).

Some macroalgae also possess high levels of mineral elements which have nutritional value such as calcium and magnesium. This is true for green algae (*Ulva* sp) which have been found to contain up to 3.25 g of calcium per kg of dry weight (MacArtain, Gill, Brooks, Campbell, & Rowland, 2007). The brown seaweeds, especially the species *Laminaria digitata*, is rich in iodine (up to 10 g per kg of dry weight) (data unpublished, CEVA). However, this high iodine concentration led to a prohibition in France in 1990 against the human consumption of this species. Although it is now permitted, the final concentration in the *Laminaria* product must be below 500 mg per kg of dry weight.

Given this information, it is difficult to understand the lack of development in the use of seaweeds as food products in western countries.

One explanation of this situation could be the absence of a cooking tradition for the use of algae as sea vegetables in USA, Canada and Europe.

So what are the prospects for using seaweed in human and animal nutrition in these countries?

As well as their nutritional value (rich in fibres and proteins, mineral content), algae are rarely implicated in allergy risks compared to other marine food products (e.g. fish). Only one example of anaphylactic shock has been described after the consumption of ogo-nori (Noguchi *et al.*, 1994). In this context, seaweeds could thus be used to substitute some products for allergenic subjects. Another way to optimize the use of seaweeds in the human diet could be the introduction of this resource as functional components in food processing. For example, extracts enriched in R-phycoerythrin (RPE), a red pigment obtained from red algae, could be processed as a food colourant. A process using a membrane ultrafiltration methodology has been piloted. The aim of the project was to determine whether a concentrated RPE from the species *G. turuturu* could be obtained in economically satisfactory conditions (1 euro/L) (Denis, Masse, Fleurence, & Jaouen, 2010).

In conclusion, algae possess a nutritional value as a source of proteins (e.g. red seaweeds), fibres or minerals. The presence of original pigments such as phycoerythrin also enables the development of functional ingredients (e.g. natural colourants) for the food industry.

Table 2. Species used as sea vegetables in France (MacArtain *et al.*, 2007).

Species	Common name	Authorized
<i>Laminaria digitata</i>	Kombu	Restricted use ^a
<i>Laminaria saccharina</i>	Kombu	Restricted use ^a
<i>Undaria pinnatifida</i>	Wakame	+
<i>Himanthalia elongata</i>	Sea Spaghetti	+
<i>Ulva</i> sp	Sea Lettuce	+
<i>Enteromorpha</i> sp	Ao-nori	+
<i>Gracilaria verrucosa</i>	Ogo-nori	+
<i>Palmaria palmata</i>	Dulse	+
<i>Chondrus crispus</i>	Pioca, lichen	+
<i>Spirulina</i> sp ^b	Spiruline	+

^a Iodine concentration ≤ 500 mg·kg⁻¹ of dry weight.

^b Cyanobacteria, Data taken from Ref. Mabeau & Fleurence, 1993

Table 3. Protein contents of some edible seaweeds (Darcy-Vrillon, 1993; Denis et al., 2010; Fleurence, 2004).

Seaweed species	<i>Laminaria digitata</i>	<i>Ascophyllum nodosum</i>	<i>Undaria pinnatifida</i>	<i>Ulva lactuca</i>	<i>Palmaria palmata</i>	<i>Porphyra tenera</i>	<i>Gracilaria verrucosa</i>	<i>Grateloupia turuturu</i>
Protein content	8.0–15.0	3.0–15.0	11.0–24.0	8.7–32.7	8.0–35.0	33.0–47.0	7.0–23.0	14.0–27.5
% of dry weight.								

Application of seaweeds in aquaculture

An indirect route for the human consumption of seaweeds is perhaps by the use of algae in the nutrition of animals usually consumed by people. The use of seaweeds in the diet of terrestrial farm animals has already been described (Hansen, Hector, & Feldman, 2003) and is well known. Conversely, the same application is much less developed in the case of marine animal production by aquaculture.

However, some marine animals produced by aquaculture could be fed by the addition of seaweeds to their diet. This suggestion concerns especially fish and molluscs (e.g. abalone). The advantages of the consumption of seaweeds by marine animals, especially fish, have often been described. For example, numerous studies have reported the beneficial effects of the use of seaweed meal in the diet of fish (Mustafa & Nagakawa, 1995; Mustafa, Wakamatsu, Takeda, & Umino, 1995). The addition of 5% of algae meal increases the growth rate of fish and, in particular, improves protein assimilation, thus decreasing the nitrogen output into the environment. The fish species investigated in these studies are mainly rainbow trout, red sea bream or rockfish.

Another advantage of using algae in the fish diet is an improvement in the stress response and in disease resistance. The positive effect of *Ulva* meal or wet feed including alginate on the immune status of fish such as sea bream or Atlantic salmon has been well known for twenty years (Gabrielsen & Austreng, 1998; Satoh, Nakagawa, & Kasahara, 1987). This finding could be useful for the development of another production method for farmed fish.

As well as the addition of seaweeds to the diet of fish produced by aquaculture, algae could also be very useful in the treatment of waste generated by this activity. Interesting ecological engineering experiments have been described to remove excess nutrients or to treat the waste generated by intensive mariculture (Troell, Rönnbäck, Halling, Kautsky, & Buschmann, 1999). Other authors have also suggested the use of some economical species as a potential solution to nitrogen pollution of the marine

environment (Dongyan, Pickering, & Jun, 2004). Similar applications have been suggested for mollusc farming. Some experiments on the use of algae in the feeding of abalones were reported as being effective (Buchal, Levin, & Langdon, 1998; Mai, Mercer, & Donlon, 1994). In particular, a study showed that a diet composed of a mixture of *Gracilaria gracilis*, *U. lactuca* and kelp gave the best results for the growth of abalone juveniles (Naidoo, Maneveldt, Ruck, & Bolton, 2006).

The feasibility of an integrated system for the culture of seaweed, fish and abalone was tested in Israel (Neori, Shpigel, & Ben-Ezra, 2000). The main goal of this experiment was to optimize nutrient recycling and reduce water consumption by using seaweeds to treat the waste. In this system, the effluents produced by abalone in the culture tanks were drained into the culture tanks of a pellet-fed fish (*Sparus aurata*). The effluents of the fish culture were also drained into the seaweed culture (*U. lactuca* or *Gracilaria conferta*). Finally, the algal production was fed back to the abalone. Similar experiments were carried out in the aquaculture of seabass (*Dicentrarchus labrax*) showing that the use of a high rate algal pond treatment of water led to a significant reduction in the dissolved inorganic nitrogen and phosphorus in the water. This approach also reduced the metal accumulation in fish muscle, which is very interesting in terms of obtaining an improved quality of flesh from cultivated fish (Metaxa et al., 2006).

The use of seaweeds in the diet of marine animals produced by aquaculture appears to be an interesting prospect especially to increase the natural defences of fish and to improve the treatment of wastewater generated by this activity. However, the economic feasibility of this approach needs to be determined first.

What is the future for the use of seaweed proteins in human nutrition?

The best question is probably “what are the prospects for the use of algal proteins in feeding animals consumed by humans?” Nowadays, the main plant proteins used for

Table 4. Comparison of the methionine content of several food sources (Fleurence, 2004).

Food sources	<i>Palmaria palmata</i>	<i>Porphyra tenera</i>	<i>Grateloupia turuturu</i>	<i>Ulva pertusa</i>	<i>Undaria pinnatifida</i>	<i>Laminaria japonica</i>	Soybean
Maximal methionine content	4.5	1.1	2.0	1.6	2.0	1.4	1.2
g of amino acid/100 g of proteins.							

animal nutrition appear to be those from soybean. However, their use poses some problems.

Firstly, the soybean proteins are imbalanced with regard to some amino acids (e.g. methionine) (Table 4) and their digestibility differs according to the organism. For example, it is not certain that a fish or an abalone possesses an adapted enzymatic system for the degradation of soybean proteins. In this case, the product proposed is necessarily a formulated food and will therefore be more expensive than raw or semi-raw products obtained from seaweeds.

Secondly, the cultivation of soybean requires a large quantity of fresh water. This is not the case for algal resources which do not need fresh water for growth.

Thirdly, the use of soybean proteins for animal feed is an approach which is not always compatible with the ethical food value chain, especially if the proteins have been obtained from genetically modified soybean. This aspect is especially important with regard to consumer opinion about food traceability. However, the world production of soybean was close to $216 \cdot 10^6$ tonnes compared to $2 \cdot 10^6$ tonnes for seaweeds and this terrestrial resource still remains the most economical sustainable source of vegetal proteins for animal nutrition.

Conclusion

The development of the use of seaweeds in human nutrition is not easy in western countries because the algal products are still not well known. The input of algae into human nutrition can be envisaged by an indirect way. This approach appears to be rational especially in the case of the development of an alternative marine aquaculture. The seaweeds which are used as biological filters and food material for farmed animals could easily be included in the human food value chain by this route.

References

- Buchal, M., Levin, J. E., & Langdon, C. (1998). Dulse *Palmaria mollis* as a settlement substrate and food for the red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture*, 165, 243–260.
- Darcy-Vrillon, B. (1993). Nutritional aspects of the developing use of marine macroalgae for the human food industry. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 44, 23–35.
- Dawczynski, C., Schubert, R., & Jahreis, G. (2007). Amino acids, fatty acids and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry*, 103, 891–899.
- Denis, C., Massé, A., Florence, J., & Jaouen, P. (2010). Concentration and pre purification with ultrafiltration of a R-phycoerythrin solution extracted from macro-algae *Grateloupia turuturu*: process definition and up-scaling. *Separation and Purification Technology*, 69, 37–42.
- Denis, C., Moranças, M., Min, L., Deniaud, E., Gaudin, P., Wielgosz-Collin, G., et al. (2010). Study of the chemical composition of edible red macroalgae *Grateloupia turuturu* from Brittany (France). *Food Chemistry*, 119, 913–917.
- Dongyan, L., Pickering, A., & Jun, S. (2004). Preliminary study on the responses of three marine algae, *Ulva pertusa* (Chlorophyta), *Gelidium amansii* (Rhodophyta) and *Sargassum enerve* (Phaeophyta), to nitrogen sources and its availability. *Journal of Ocean University of China*, 3, 75–79.
- Florence, J. (1999). Seaweed proteins: biochemical nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Sciences & Technology*, 10, 25–28.
- Florence, J. (2004). Seaweed proteins. In R. Y. Yada (Ed.), *Proteins in food processing* (pp. 197–213). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Florence, J., Gutbier, C., Mabeau, S., & Leray, C. (1994). Fatty acids from 11 marine macroalgae of the French Brittany coast. *Journal of Applied Phycology*, 6, 527–532.
- Fujiwara-Arasaki, T., Mino, N., & Kuroda, M. (1984). The protein value in human nutrition of edible marine algae in Japan. *Hydrobiologia*, 116/117, 513–519.
- Gabrielsen, B. O., & Austreng, E. (1998). Growth, product quality and immune status of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed wet feed with alginate. *Aquaculture Research*, 29, 397–401.
- Galland-Imouli, A. V., Florence, J., Lamghari, R., Luçon, M., Rouxel, C., Barbaroux, O., et al. (1999). Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (Dulse). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 10, 353–359.
- Hansen, H. R., Hector, B. L., & Feldman, J. (2003). A qualitative and quantitative evaluation of the seaweed diet of North Ronaldsay sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 105, 21–28.
- Horie, Y., Sugase, K., & Horie, K. (1995). Physiological difference of soluble and insoluble dietary fibre fractions of brown algae and mushrooms in pepsin activity in vitro and protein digestibility. *Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 4, 251–255.
- Jensen, A. (1993). Present and future needs for algae and algal products. *Hydrobiologia*, 260/261, 15–23.
- Mabeau, S., & Florence, J. (1993). Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends in Food Sciences & Technology*, 4, 103–107.
- MacArtain, P., Gill, C. I. R., Brooks, M., Campbell, R., & Rowland, I. R. (2007). Nutritional value of edible seaweeds. *Nutrition Reviews*, 65, 535–543.
- Mai, K., Mercer, J. P., & Donlon, J. (1994). Comparative studies of the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino II. Amino acid composition of abalone and six species of macroalgae with an assessment of their nutritional value. *Aquaculture*, 128, 115–130.
- Marion, O., Schwertz, A., Florence, J., Guéant, J. L., & Villaume, C. (2003). Improvement of the digestibility of the proteins of the red alga *Palmaria palmata* by physical processes and fermentation. *Nahrung/Food*, 47, 339–344.
- Metaxa, E., Deviller, G., Pagand, P., Alliaume, C., Casellas, C., & Blancheton, J. P. (2006). High rate algal pond treatment for water reuse in a marine fish recirculation system: water purification and fish health. *Aquaculture*, 252, 92–101.
- Mustafa, M. G., & Nakagawa, H. (1995). A review: dietary benefits of algae as an additive in fish feed. *The Israeli Journal of Aquaculture*, 47, 155–162.
- Mustafa, M. G., Wakamatsu, S., Takeda, T., & Umino, T. (1995). Effect of algae meal as feed additive on growth, feed efficiency, and body composition in red sea bream. *Fisheries Science*, 61, 25–28.
- Naidoo, K., Maneveldt, G., Ruck, K., & Bolton, J. J. (2006). A comparison of various seaweed-based diets and formulated feed on growth rate of abalone in land-based aquaculture system. *Journal of Applied Phycology*, 18, 437–443.
- Neori, A., Shpigiel, M., & Ben-Ezra, D. (2000). A sustainable integrated system of culture of fish seaweed and abalone. *Aquaculture*, 186, 279–291.
- Nisizawa, K., Noda, H., Kikuchi, R., & Watanabe, T. (1987). The main seaweed foods in Japan. *Hydrobiologia*, 151/152, 5–29.
- Noguchi, T., Matsui, T., Miyazawa, K., Asakawa, M., Iijima, N., Shida, Y., et al. (1994). Poisoning by the red alga "Ogonori" (*Gracilaria verrucosa*) on the Nojima coast Yokohama, Kanagawa Prefecture, Japan. *Toxicol*, 32, 1533–1538.

Satoh, K., Nakagawa, H., & Kasahara, S. (1987). Effect of *Ulva* meal supplementation on disease resistance of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 1115–1120.

Troell, M., Rönnbäck, P., Halling, C., Kautsky, N., & Buschmann, A. (1999). Ecological engineering in aquaculture: use of seaweeds for

removing nutrients from intensive mariculture. *Journal of Applied Phycology*, 11, 89–97.

Zemke-White, W. L., & Ohno, M. (1999). World seaweed utilisation: an end-of-century summary. *Journal of Applied Phycology*, 11, 369–376.



Experience ScienceDirect your way through SciVerse Applications

Now **SciVerse Hub**, **ScienceDirect** and **Scopus** content can be explored the way you want to slice, dice, mold and model it. Master the discovery process with **SciVerse Applications** – an expanding gallery of tools that helps you:

- Collaborate with peers
- Manage workflows
- Customize searches
- Analyze data

Explore the possibilities at www.applications.sciverse.com/action/gallery

Open to accelerate science



Annexe 2

“INHIBITION OF *Haliotis tuberculata* PATHOGEN, *Vibrio harveyi*, FROM EXTRACTS OF
RED MACROALGAE *Grateloupia turuturu*”.

AQUA 2014, 14-17 Octobre 2014 à Donostia-San Sébastian, Espagne.

Référence :

Nuria García-Bueno*, Priscilla Decottignies, Vincent Turpin, Justine Dumay, Christine Paillard, Arnaldo Aitor Marín-Atucha, Joël Fleurence.

Proceedings : <https://www.was.org/easOnline/AbstractDetail.aspx?i=3298>

INHIBITION OF *HALIOTIS TUBERCULATA* PATHOGEN, *VIBRIO HARVEYI*, FROM EXTRACTS OF RED MACROALGAE *GRATELOUPIA TURUTURU*

N. García-Bueno^{a,b}, P. Decottignies^a, V. Turpin^a, J. Dumay^a, C. Paillard^c, A. Marín-Atucha^b and J. Fleurence^a

^a Université de Nantes, Institut Universitaire Mer et Littoral, EA 2160 Mer Molécules Santé, 2 rue de la Houssinière BP 92208, 44322 Nantes cedex 3 (France)

^b Departamento de Ecología e Hidrología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Spain

^c LEMAR-IUEM-UBO, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, (France)

E-mail: nuria.garcia-bueno@univ-nantes.fr

Introduction

World aquaculture production of molluscs, with an average in 2011 of 14.4 million tonnes, is the second fastest growing aquaculture sector in the world (FAO). But diseases in this sector are now a primary constraint, impeding the aquaculture development in many countries (Subasinghe et al. 2009). An important example is the bacteria *Vibrio harveyi*, the main pathogen of the European abalone *Haliotis tuberculata*. Several mortalities have been recorded in the last years in the culture of this gastropod in the north of France. The aim of this work was to evaluate *in vitro* activity of extracts from a red marine macroalgae *Grateloupia turuturu* against the abalone pathogen.

Materials and methods

Grateloupia turuturu was harvested monthly, between May 2011 and April 2012, in the intertidal zone at Batz-sur-mer (Atlantic Coast, France). Water-soluble, polar and apolar compounds were extracted according to different protocol (Plouguerné 2006; Munier et al. 2013). The virulent *Vibrio harveyi* strain, isolated from diseased European abalone *Haliotis tuberculata* in Normandy (France) in 1999 and called ORM4, was used for the experiment. Extracts were incubated for 24h with the bacteria in 96-well plates (VWR) at 20°C. The percentage of inhibition was calculated for each type of extracts (Bazes et al. 2006).

Results

Extracts from monthly-collected *G. turuturu* presented a variable effect on *V. harveyi* growth (**Fig.1**).

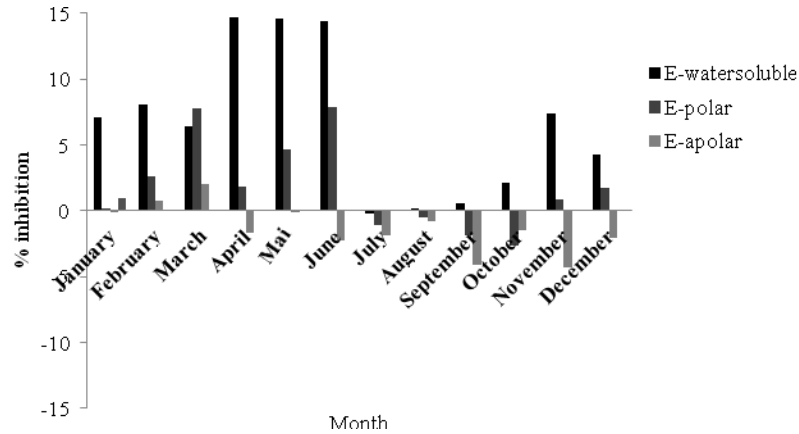


Fig.1 Growth inhibition of *Grateloupia turuturu* extracts against strain ORM4

Notably, results showed best inhibition of the bacterial growth with spring water-soluble and polar extracts. The strongest antibacterial activity were obtained with water-soluble spring extracts of *G.turuturu* (April, May and June) with a percentage of inhibition around 15%, whereas winter extracts showed a weaker antibacterial activity around 5-7%. Almost nonexistent effect was recorded in July, August and September water-soluble extracts. Conversely, most of apolar *G.turuturu* extracts didn't have any effect on the growth of the tested *Vibrio harveyi* strain. Among the seasonal extracts tested, autumn extracts promoted growth development of the tested bacterial species, around 5%.

Discussion

Inhibitory action of *G.turuturu* was very variable according to the season. Maximal antibacterial activity, around 15%, against *Vibrio harveyi* in the present work was exhibited from April to June by water-soluble extracts of *Grateloupia turuturu*. Season activity conforms to the study carried out by Hornsey and Hide using atlantics macroalgae samples (Hornsey and Hide 1976). The bioactivity peak of *G.turuturu*, approximately 16%, occurred at the maximal abundance period of these seaweeds (spring-summer). Polar extracts showed lower inhibitory activity of ORM4 in spring season than water-soluble extracts. However, the screening assays results confirmed that apolar extracts not exhibited antimicrobial activity against *Vibrio harveyi*. The weaker level for the antibacterial activity appears in summer, these results can be explained by the seawater temperature increasing that modifying the secondary metabolites productions (Bourgaud et al. 2001). Research carried out in various parts of the world with similar algal species and using different extraction protocols gave high activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria (Vlachos et al. 1999; Val et al. 2001). Thus, an advantage of using algae in the aquaculture is an improvement in the stress response and in disease resistance (Fleurence et al. 2012). This study confirmed the capacity of *G.turuturu* to respond as antibacterial agent against *Vibrio harveyi*.

Annexe 3

“SUITABILITY OF TWO RED MACROALGAE *Grateloupia turuturu* AND *Palmaria palmata*
FOR THE CULTURE OF THE EUROPEAN ABALONE *Haliotis tuberculata*”.

AQUA 2012, 1-5 Septembre 2012 à Prague, République Tchèque.

Référence :

Nuria García-Bueno*, Priscilla Decottignies, Vincent Turpin, Justine Dumay, Marion Cardinaud, Christine Paillard, Valérie Stiger-Pouvreau, Arnaldo Aitor Marín-Atucha, Joël Fleurence.

Proceedings : <https://www.was.org/meetingabstracts/ShowAbstract.aspx?Id=26528>

SUITABILITY OF TWO RED MACROALGAE *Grateloupia turuturu* AND *Palmaria palmata* FOR THE CULTURE OF THE EUROPEAN ABALONE *Haliotis tuberculata*

N. García-Bueno^{a,b}, P. Decottignies^a, V. Turpin^a, J. Dumay^a, M. Cardinaud^c, C. Paillard^c, V. Stiger-Pouvreau^c, A. Marin-Atucha^b and J. Fleurence^a

^a Université de Nantes, Institut Universitaire Mer et Littoral, EA 2160 Mer Molécules Santé, 2 rue de la Houssinière BP 92208, 44322 Nantes cedex 3 (France)

^b Departamento de Ecología e Hidrología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Spain

^c LEMAR-IUEM-UBO, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, (France)

E-mail: nuria.garcia-bueno@univ-nantes.fr

In recent years, there has been a rapid expansion in the French Atlantic coast of proliferative species belonging to the family of red algae such as, *Grateloupia turuturu*, native to Japan. This macroalgae has a more stable seasonally biochemical composition than *Palmaria palmata*, known to be a good resource feed for the abalone *Haliotis tuberculata*. Nowadays it is an important resource of the French west coast, but has not yet been significantly exploited. This seaweed has also an antibacterial activity (Pang *et al.*, 2006) which could be interesting for the regulation of possible infections by *Vibrio harveyi*, a specific pathogen of *Haliotis* species. This study proposes to evaluate the impact of the two algae, *Palmaria palmata* and *Grateloupia turuturu* present on the Brittany coast, on development of the pathogenic *Vibrio harveyi* (strain ORM4).

Crude extracts (CE) containing water soluble compounds have been obtained monthly for both species. Antibacterial activity was tested using Bioscreen technology at 16, 20 and 28C for 24h. Experiments, using the strain of *Vibrio harveyi* ORM4 and the two algae species, showed that bacteria density detected on the Bioscreen plate were constantly for *Palmaria palmata* compared with the control. However, the bacteria density were significantly lower in several plate in which *Grateloupia turuturu* was integrated, indicating that bacterial growth in this plate were significantly inhibited (one-way ANOVA tests - $P < 0.05$) in comparison with *Palmaria palmata* plate.

RÉSUMÉ

L'ormeau *Haliotis tuberculata*, dont l'aquaculture est peu développée en Europe, apparaît comme un candidat potentiel pour la diversification des activités conchylicoles. Cependant, sa production rencontre deux principales limites. Tout d'abord, l'approvisionnement des élevages en nourriture de qualité constituent une dépense majeure des entreprises. De plus, ces dernières années, les populations naturelles tout comme les élevages ont subi de fortes mortalités liées à la bactérie pathogène *Vibrio harveyi*. Par son caractère prolifératif, l'algue rouge *Grateloupia turuturu*, présente sur la côte atlantique, constitue une biomasse disponible qui pourrait être valorisée pour l'aquaculture de l'ormeau. En effet, *Grateloupia turuturu* dispose d'une composition biochimique intéressante pour la croissance de l'ormeau qui montre une nette préférence pour les algues rouges. Des tests d'alimentation ont été réalisés en élevage. Il apparaît que cette algue n'est pas utilisable à l'état frais comme aliment principal mais pourrait constituer un complément alimentaire. De plus, il a été récemment mis en évidence que cette espèce présente une activité antibactérienne. Cette activité a été confirmée *in vivo* et *in vitro* sur la souche pathogène ORM4 de *Vibrio harveyi*.

Mots-clés : aquaculture, activité antibactérienne, alimentation, bactéries, *Grateloupia turuturu*, *Haliotis tuberculata*, macroalgues, ormeau, *Vibrio harveyi*, vibriose.

ABSTRACT

Abalone *Haliotis tuberculata*, which farm production is not well developed in Europe, seems a potential candidate for the diversification of shellfish aquaculture. However, its production faces two main limitations. First, the supply of livestock in quality food are a major expense for enterprises. Second, in recent years, natural populations as well as livestock have suffered high mortalities related to the pathogenic bacterium *Vibrio harveyi*. Because of its proliferative nature, red seaweed *Grateloupia turuturu*, present on the Atlantic coast, constitute represent an available biomass that could be valorized in abalone aquaculture. Indeed, *Grateloupia turuturu* presents a biochemical composition that could be of interest for abalone's growth. This species shows a clear preference for red seaweeds. Nutritional tests have been made on livestock. It appeared that seaweed cannot be used fresh as main feed but it could be a dietary supplement. In addition, it has recently been demonstrated that this species has an antibacterial activity. This activity was confirmed *in vivo* and *in vitro* using the pathogenic strain of *Vibrio haveyi* ORM4.

Keywords : abalone, aquaculture, antibacterial activity, bacteria, feeding, *Grateloupia turuturu*, *Haliotis tuberculata*, seaweeds, *Vibrio harveyi*, vibriosis.

