



Université du Québec
à Rimouski

**Effet protecteur d'un pigment (marennine) de diatomée bleue
contre la bactérie pathogène *Vibrio splendidus* chez les larves de
moule bleue *Mytilus edulis* : utilisation potentielle en écloséries
de bivalves**

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en océanographie

en vue de l'obtention du grade de maîtrise ès sciences

PAR

© François Turcotte

Octobre 2014

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

Composition du jury :

Céline Audet, présidente du jury, Université du Québec à Rimouski (Canada)

Réjean Tremblay, directeur de recherche, Université du Québec à Rimouski (Canada)

**Jean-Sébastien Deschênes, codirecteur de recherche, Université du Québec à
Rimouski (Canada)**

Jean-Luc Mouget, codirecteur de recherche, Université du Maine (France)

Isabelle Marcotte, examinatrice externe, Université du Québec à Montréal (Canada)

Dépôt initial le 23 Avril 2014

Dépôt final le 14 octobre 2014

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont rendu ce projet possible.

Je tiens tout d'abord à remercier Réjean Tremblay qui, en tant que directeur de recherche, m'a donné sa confiance pour la réalisation de ce projet et a toujours su me soutenir et m'éclairer afin de mener le travail à bien. Il a été pour moi une source d'inspiration, de motivation et une personne avec qui le travail est agréable et productif.

J'adresse également mes remerciements à mes codirecteurs Jean-Luc Mouget et Jean-Sébastien Deschênes. Je remercie M. Mouget d'une part, de m'avoir accueilli dans les laboratoires des Universités du Maine et de Nantes où j'ai réalisé un stage de deux semaines qui m'a été des plus utiles et, d'autre part, pour ses conseils et suggestions scientifiques essentiels à la réalisation de ce projet. Je remercie M. Deschênes pour son aide précieuse dans le travail de mise en place des systèmes de production des microalgues.

Je tiens à remercier Céline Audet (présidente du Jury) et Isabelle Marcotte (membre externe) pour leur évaluation de mon travail. Merci pour vos commentaires et suggestions. Ma reconnaissance va également à toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation des expériences. Un merci particulier à Nathalie Gauthier, Jean-Bruno Nadalini, Sahar Mejri, Bertrand Genard, Jean-Michel Bergeron Girard, Alexandre Boudreau, et tous les membres du laboratoire de l'ISMER, Nathalie Morin et Steeven Ouellet de l'UQAR, Romain Gastineau de l'Université du Maine, et Michèle Morançais de l'Université de Nantes.

Merci aux gens du réseau *Ressources Aquatiques Québec* qui a apporté un soutien très important à la réalisation de ma maîtrise, par les formations offertes, les colloques organisés et par le financement de ma bourse et de mes déplacements en stage et en colloques par l'entremise du Fonds de recherche du Québec Nature et Technologies et du Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada.

Enfin, j'adresse mes plus sincères salutations à mes parents, proches et amis, pour leurs encouragements, leur soutien et leur patience.

RESUME

Le but de cette recherche est d'explorer la possibilité d'utiliser un pigment naturel pour contrôler la prolifération de bactéries pathogènes en éclosion de bivalves. Le pigment, appelé "marennine", est produit en laboratoire par la microalgue marine *Haslea ostrearia*. Les modèles biologiques sont les larves de moule bleue *Mytilus edulis* et la bactérie pathogène *Vibrio splendidus*. L'hypothèse testée dans le cadre de ce travail est la suivante : la pathogénicité de *Vibrio splendidus* dans un élevage larvaire de *Mytilus edulis* peut être contrôlée par l'utilisation de la marennine. L'effet de différentes concentrations de marennine sur la croissance des algues fourrages utilisées pour l'alimentation des larves de moules a été premièrement testé sans démontrer d'influence négative. Ensuite, l'effet des mêmes concentrations de marennine sur la survie, la condition physiologique (analyses lipidiques) des larves et le développement bactérien dans les cultures larvaires a également été testé. Les résultats ont démontré qu'à faible dose, la marennine n'avait pas d'effet cytotoxique sur les larves et qu'elle améliorait leur survie. Finalement, la survie des larves et le développement bactérien dans les cultures ont été testés après 72 heures d'élevage en condition d'exposition à la bactérie pathogène. L'exposition à *Vibrio* a causé une mortalité significative par rapport au contrôle, mais la survie des larves exposées à la marennine et au *Vibrio* était égale au contrôle, indiquant que la marennine a complètement inhibé la pathogénicité de *V. splendidus*. Ces résultats confirment l'intérêt d'utiliser la marennine comme agent protecteur naturel en éclosion.

Mots clés : *Haslea ostrearia*, *Vibrio splendidus*, Éclosion, Bivalves, Antibiotique naturel

ABSTRACT

The possibility of using a natural microalgal pigment as an antibiotic in bivalve hatcheries was explored. The molecule (named *marennine*) was produced in the laboratory from *Haslea ostrearia* cultures. Blue mussel *Mytilus edulis* was used as a model animal and the pathogenic marine bacteria *Vibrio splendidus* was used to cause larval mortality. The hypothesis tested was: *V. splendidus*'s pathogenicity in a *M. edulis* larval rearing can be controlled using marennine. The effect of different marennine concentrations on growth of microalgae used as larval feed was tested to make sure that feed availability would be the same for all treatments in further experiments. No difference in growth was found. Then, the effect of the same marennine concentrations was tested on larval survival for 20 days. At a low dose (0.1 mg L^{-1}), survival was 30 % higher than in the control. A higher dose (1.0 mg L^{-1}) caused heavy larval mortality. In a third experiment, ten days old larvae were exposed to *V. splendidus* for 72 hours, with or without marennine. The bacteria caused significant mortality when compared to control, and the marennine treated larvae exposed to the pathogen had a significantly higher survival, similar to the one in control experiments. We concluded that marennine was an interesting molecule for pathogen control in hatcheries as it is active against bacteria at low concentrations and that is significantly enhanced larval survival.

Keywords: *Haslea ostrearia*, *Vibrio splendidus*, Hatchery, Bivalve, Natural Antibiotic

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	vii
RÉSUMÉ	ix
ABSTRACT	xi
TABLE DES MATIÈRES.....	xiii
LISTE DES TABLEAUX	xv
LISTE DES FIGURES	xvii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	xix
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
PROBLEMATIQUE.....	1
BIOLOGIE DES ESPECES DU MODELE	4
<i>MYTILUS EDULIS</i>	4
LES BACTERIES DU GENRE <i>VIBRIO</i>	6
<i>HASLEA OSTREARIA</i> & MARENNINE	8
OBJECTIFS & METHODE	10
CHAPITRE 1 Effet protecteur d'un pigment de diatomée bleue (marennine) contre le pathogène bactérien <i>Vibrio splendidus</i> pour les larves de moule bleue <i>Mytilus edulis</i> : utilisation potentielle en écloséries de bivalve	13
I.1 RESUME.....	13
I.2 PROTECTIVE EFFECT OF A BLUE DIATOM PIGMENT (MARENNINE) AGAINST THE PATHOGENIC BACTERIA <i>VIBRIO SPLENDIDUS</i> FOR THE BLUE MUSSEL <i>MYTILUS EDULIS</i> LARVAE : A POTENTIAL USE IN BIVALVE HATCHERIES	15
I.3 INTRODUCTION	17

1.4 MATERIAL & METHODS	19
1.5 RESULTS	23
1.6 DISCUSSION	27
1.7 CONCLUSIONS	31
CONCLUSION GÉNÉRALE	33
ANNEXE	37
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	43

LISTE DES TABLEAUX

Table 1 : Mean proportions of lipid classes and results of the T-tests examining the effect of the treatment in mussel larvae treated or not with marennine after 20 days of development.....	26
---	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Cycle de développement de la moule bleue <i>Mytilus edulis</i> ..	5
Figure 2: Photomicrographie d' <i>Haslea ostrearia</i>	9
Figure 3: Cell concentration per mL during 12 days batch culture of <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Pavlova lutherii</i> and <i>Chaetoceros gracilis</i> in presence of marennine.....	24
Figure 4: Larval survival (%), bacterial concentration (cells mL ⁻¹) and high nucleic acid bacteria proportion (%HNA) for the two marennine treatments (0.1 and 1.0 mg L ⁻¹) and the control without marennine..	25
Figure 5 : Larval survival (%), bacterial concentration (cells mL ⁻¹) and high nucleic acid bacteria proportion (%HNA) for the control without addition, marennine treatment (0.5 mg L ⁻¹), <i>Vibrio</i> treatment (10 ⁵ bacteria mL ⁻¹ of <i>V. splendidus</i>) and the <i>Vibrio</i> + marennine treatment (0.5 mg L ⁻¹ of marennine and 10 ⁵ bacteria mL ⁻¹ of <i>V. splendidus</i>) after 72 hours of exposure.....	26

LISTE DES ABREVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

AMP	Peptide antimicrobien (<i>antimicrobial peptide</i>)
AMPL	<i>Acetone mobile polar lipids</i>
BW	<i>Blue-Water</i>
HNA	<i>High nucleic acid</i>
LNA	<i>Low nucleic acid</i>
LPS	Lipopolysaccharide
OMP	<i>Outer membrane protein</i>
PBR	<i>Photobioreactor</i>
PL	<i>Phospholipid</i>
ST	<i>Sterol</i>
TAG	<i>Triacylglycerol</i>

INTRODUCTION GENERALE

PROBLEMATIQUE

L'aquaculture est un secteur de la production alimentaire dont la croissance a été très rapide au cours des 50 dernières années. La production annuelle a atteint 52.5 millions de tonnes en 2008, fournissant ainsi environ 50% de la quantité de poisson alimentaire consommé dans le monde (le terme « poisson » faisant référence à toute la production aquacole incluant les mollusques, crustacés et échinodermes) (Bostock et al., 2010). La production de mollusques joue un rôle important dans la production mondiale de poisson alimentaire, avec 23 % de la production totale en 2011 (FAO, 2013). Considérant la stagnation de la production globale de poisson issue de la pêche et une population humaine en perpétuelle croissance, l'aquaculture est perçue comme l'industrie ayant le plus grand potentiel pour combler une demande grandissante de nourriture, particulièrement avec une limitation de plus en plus importante de l'utilisation des terres pour l'agriculture (FAO, 2011).

Les maladies représentent une contrainte majeure à la production efficace pour certains systèmes de cultures. Des avancées importantes dans la compréhension de l'étiologie et de l'épidémiologie des maladies ont été faites dans les dernières années et certaines maladies infectieuses sont maintenant contrôlées. Toutefois, toutes les infections ne sont pas maîtrisées, de nouvelles maladies émergent et des maladies qui étaient autrefois considérées comme rares deviennent de plus en plus prévalentes. La vigilance à l'émergence de nouvelles maladies et le développement de nouvelles solutions sont donc nécessaires (Bostock et al., 2010).

Une des principales difficultés dans la production de bivalves en éclosion réside dans l'occurrence d'infections bactériennes causant des mortalités massives et des pertes importantes pour les producteurs. Ces mortalités sont généralement reliées aux bactéries de type *Vibrio*, *Pseudomonas* et *Aeromonas*, les espèces du genre *Vibrio* étant les plus fréquemment observés (voir Paillard, 2004 pour une synthèse (tableau1); Estes et al., 2004; Tubiash et al., 1965). Comme la production de juvéniles en éclosion devient la norme en aquaculture (FAO, 2011), ce problème d'évènements de mortalité doit être abordé.

Les agents chimiothérapeutiques, tels que les antibiotiques, sont traditionnellement utilisés en aquaculture et représentent un outil important pour la prévention d'éclosion de maladies infectieuses. La croissance récente de l'industrie aquacole mondiale a accrue la consommation de ces antibiotiques dans de nombreux pays (Diaz-Cruz et al., 2003). Chez certaines espèces de bivalves, l'utilisation d'antibiotiques dans les bassins d'élevage permet d'améliorer grandement la productivité en empêchant la prolifération des bactéries pathogènes (Andersen et al., 2011). Il est démontré dans la littérature que l'utilisation d'antibiotiques non sélectifs améliore le rendement en éclosion, surtout pour les stades prémétamorphiques (Sutton et Garrick, 1993; Nicolas et al., 1996; Sugumar et al., 1998; Pernet et al., 2006).

Comme conséquence de cette utilisation soutenue, on retrouve l'émergence du phénomène de résistance bactérienne aux antibiotiques, phénomène qui est devenu le problème émergent le plus sérieux en aquaculture (Sørum, 1999; 2006; Smith, 2008). Les producteurs doivent maintenant faire face aux risques associés à la persistance de résidus d'antibiotiques toxique pour les consommateurs dans les produits aquacoles et à la transmission de la résistance aux antibiotiques dans les populations bactériennes animales et environnementales. Ces bactéries résistantes aux antibiotiques peuvent représenter une

menace considérable pour la santé publique, surtout que certaines molécules utilisées en aquaculture sont de classe et de structure similaires ou, dans certains cas, identiques à celles utilisées en médecine. Cette résistance peut donc être transmise aux bactéries affectant l'humain, créant ainsi des maladies ne répondant pas aux traitements (Cabello, 2006). L'utilisation d'antibiotiques peut aussi induire une résistance chez des bactéries non pathogènes, desquelles les gènes de résistance peuvent être transmis à des bactéries causant des maladies diverses. À titre d'exemple, des plasmides bactériens contenant des gènes de résistance ont été transférés avec succès *in vitro* d'un pathogène du poisson vers certains pathogènes affectant l'humain, incluant *Vibrio cholerae* et *Vibrio parahaemolyticus* (Angulo 1999). Dans certains cas, des bactéries résistantes peuvent également être directement transférées aux humains en contact avec les installations aquacoles (Weber et al., 1994), avec les poissons eux-mêmes (Weinstein et al., 1997), ou lors de la consommation de certains produits de l'aquaculture (Coellette, 2006). Les traitements efficaces contre les maladies infectieuses les plus communes deviennent donc de plus en plus limités, dispendieux, et, dans certains cas, inutiles, menaçant ainsi d'éliminer le progrès médical effectué dans ce domaine au cours des 50 dernières années (HHS, 1999). L'emploi d'antibiotiques commerciaux en écloserie est donc souvent évité, en plus d'être interdit par la loi dans plusieurs pays. À titre d'exemple, le chloramphenicol est interdit d'utilisation au Canada, aux États-Unis et dans l'Union européenne (UE) mais est toujours utilisé dans certains pays en développement (Collette, 2006). Les nitrofuranes, fluoroquinolones et quinolones, ainsi que les drogues non-antibiotiques comme le vert de malachite sont également interdits en aquaculture (Collette, 2006).

Il existe donc un réel besoin pour de nouvelles molécules qui possèdent des activités antibactériennes et qui seraient potentiellement dédiées uniquement à l'aquaculture. Ces molécules seront assurément trouvées au sein des biomasses naturelles, puisque les produits antibiotiques naturels sont la meilleure source de nouveauté, et leur complexité moléculaire rend leur synthèse artificielle difficile (Spížek et al., 2010). Des études récentes ont montré

que le monde marin pourrait jouer un rôle important afin de combler ce besoin, alors que des molécules antibiotiques potentielles ont été identifiées chez des bactéries marines, tuniciers, mycètes, algues et éponges (Mayer and Hamann, 2005). Une microalgue marine, *Haslea ostrearia*, produit une telle molécule et c'est son utilisation pour répondre à la problématique qui sera discutée dans ce travail.

BIOLOGIE DES ESPECES DU MODELE

MYTILUS EDULIS

La moule bleue (*Mytilus edulis*) est un mollusque bivalve épibenthique appartenant à la famille des Mytilidés. Il s'agit d'une espèce ovipare dioïque à fécondation externe. En milieu naturel, l'émission des gamètes dans la colonne d'eau est synchrone entre les mâles et les femelles afin d'en favoriser la rencontre. Le cycle de développement larvaire (Figure 1) dure trois à quatre semaines. Ce cycle débute par une phase larvaire planctonique lécithotrophe, à laquelle se succèdent une phase de croissance, puis une phase de fixation. Au cours de la première phase, un embryon cilié se différencie, 24 à 48 heures après la fécondation, en larve trocophore. Cette larve est dotée d'un cil apical et d'un vélum qui lui permettent de nager. Par la suite la larve entre dans la phase de croissance sous la forme de larve véligère (larve « D-véligère », du à sa forme) qui se déplace et s'alimente dans la colonne d'eau. En vieillissant, la coquille se bombe vers l'extérieur au niveau de la charnière pour former l'umbo. La larve est alors dite « umbo-véligère ». Parallèlement au développement du pied qui permettra à la larve de ramper sur le substrat et de synthétiser les filaments de byssus essentiels à la fixation, la coquille continue de se déformer jusqu'à obtenir une forme arrondie. Quelques jours avant l'acquisition de la compétence pour la fixation, un œil photosensible se développe sous la coquille. Lorsque la compétence est acquise, la larve nommée pédivéligère a atteint une taille allant de 260 µm à 300 µm selon les auteurs (Toupoint, 2012). Lorsque les conditions sont favorables, les

larves se fixent au substrat à l'aide d'un filament de byssus et amorcent leur métamorphose en post-larves. Le succès de fixation-métamorphose des larves jeunes moules dépend de plusieurs facteurs physiques et biologiques et est donc très variable. Cette étape est une phase critique pour le développement puisqu'elle requiert une grande quantité de réserves énergétiques. En effet, une fois la métamorphose initiée, le vélum est totalement phagocyté et les besoins métaboliques seraient assurés par les nutriments stockés dans les réserves énergétiques (Bayne 1976).

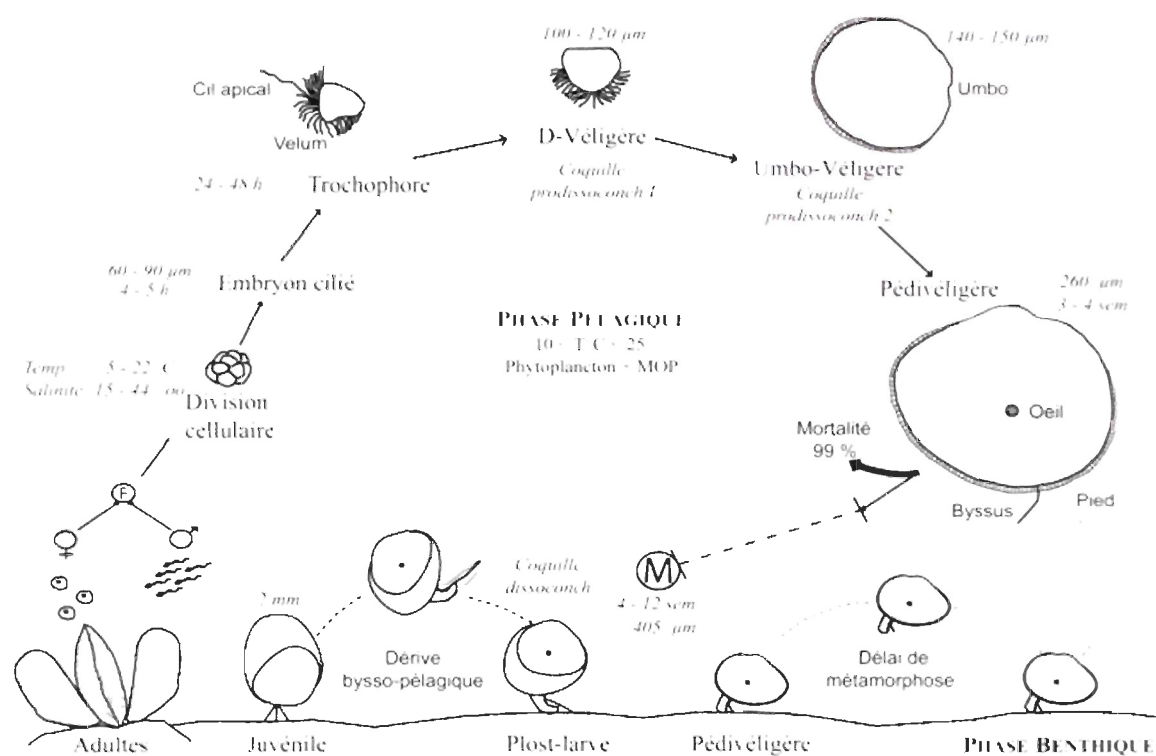


Figure 1: Cycle de développement de la moule bleue *Mytilus edulis*. F : fécondation ; M : métamorphose. Figure tirée de Toupoint, 2012.

La production aquacole de *M. edulis* est essentiellement basée sur le captage de naissain en milieu naturel, mais les fortes variations annuelles de l'approvisionnement rendent la gestion de ces élevages difficile (Toupoint et al. 2012). Le manque en juvéniles

est la contrainte majeure à la production de cette espèce et ce manque a affecté l'industrie dans plusieurs pays européens au cours des dix dernières années.

M. edulis est produite au Canada, aux États-Unis d'Amérique ainsi que dans de nombreux pays européens. Sa production représente une industrie importante avec une production globale atteignant 200 000 tonnes en 2010 (FAO, 2004-2014). Au Canada, la culture de moules est la deuxième production la plus importante après le saumon avec 15,8% de la production aquacole totale. Dans le Canada atlantique, les larves sont issues de captage en milieu naturel, alors qu'en Colombie-Britannique, toutes les larves proviennent d'écloseries (Alliance de l'industrie Canadienne de l'aquaculture). Le développement des techniques d'écloserie par l'utilisation de moules polyploïdes est la tendance la plus récente pour cette culture et des écloseries commerciales de moule ont vu le jour sur la côte ouest américaine et la Nouvelle-Zélande.

LES BACTERIES DU GENRE *VIBRIO*

Les bactéries du genre *Vibrio* sont des pathogènes de nombreuses espèces de bivalves. *Vibrio splendidus* a été associée aux événements de mortalité de masse dans la production de *C. gigas* en France (Sugumar et al., 1998; Gay et al., 2004). *V. splendidus* a également été isolé de cultures larvaires de Palourde commune (*Ruditapes decussatus*) (Gómez-León & Villamil, 2005) et de coquilles Saint-Jacques (*Pecten maximus*) sujettes à des mortalités massives en Norvège (Torkildsen et al., 2005). Les agents de la virulence des bactéries du genre *Vibrio* ont été décrits et des exotoxines (hémolysines, protéases, toxines ciliostatiques) ont été identifiées chez les *Vibrios* pathogènes des bivalves (Paillard et al., 2004). Les effets de *V. splendidus* sur la moule commune sont bien connus. Brièvement, la fonctionnalité hémocytaire serait affectée par une réduction de leur capacité d'adhésion au pathogène, affectant ainsi la phagocytose (Labreuche et al., 2006; Tanguy et al., 2013).

La défense immunitaire des bivalves contre les pathogènes réside uniquement en un système inné. Ce système, par le biais des hémocytes, est capable de reconnaître des molécules uniques présentes à la surface des micro-organismes comme les lipopolysaccharides (LPS), pour les bactéries GRAM(-), et les peptidoglycanes pour les bactéries GRAM(+) (Costa et al., 2009). Suite à une infection bactérienne, les hémocytes sont responsables de différentes réactions de défenses cellulaires telles que la phagocytose et l'activation d'une variété de réactions cytotoxiques comme la production d'enzymes lysosomales et de peptides antimicrobiens (AMPs) (Mitta et al., 1999; Li et al., 2008).

Chez les larves de bivalve, les symptômes de la maladie induite par les bactéries du genre *Vibrio*, appelée nécrose bacillaire ou « Vibriose », ont d'abord été décrits chez *Crassostrea gigas* et *Mercenaria mercenaria* par Tubiash et al., 1965 et Elston et Leibovitz., 1980. La nécrose est alors caractérisée par une déciliation et une perte des cellules épithéliales du vélum, une croissance bactérienne à l'intérieur de la coquille et au niveau du manteau ainsi qu'un comportement de nage anormal. Il est maintenant connu que les impacts d'une infection sur la physiologie larvaire sont multiples. Entre autres, l'activité d'alimentation est réduite, ce qui modifie la gestion énergétique de la larve par une réduction du taux métabolique, l'utilisation des réserves énergétiques, l'activation de la β -oxydation et la diminution du stockage des lipides (Genard et al., 2013).

Cette capacité de stockage des lipides se révèle d'une grande importance pour la condition physiologique des larves de bivalves. En effet, celles-ci stockent généralement de grandes quantités de triacylglycerol (TAG) en tant que première réserve d'énergie endogène pour soutenir le métabolisme de base et la croissance (Holland 1978; Gallager et al., 1986). Comme la croissance et le développement dépendent grandement de la présence suffisante de réserves énergétiques pour répondre aux besoins de l'embryogenèse et de la

métamorphose, la quantité de TAG peut aussi être utilisée comme un indicateur de la survie des larves (Pernet et al., 2004). La combinaison de la réponse rapide a des changements environnementaux (ou dans le milieu de culture) et de la nature intégrative des réserves énergétiques sous forme de lipides suggère que leur analyse constitue un bon indicateur de la condition physiologique des larves.

HASLEA OSTREARIA & MARENNINE

Haslea ostrearia est une diatomée pennée faisant partie de la classe des *Bacillariophyceae*. Il s'agit d'une espèce marine tychopélagique (Robert, 1983), qui est donc benthique, planctonique et occasionnellement épiphyte, vivant en eau tempérée ou tropicale (Round et al., 1990). Elle est euryhaline et se développe sous une luminosité compatible avec de faibles hauteurs d'eau (Neuville & Daste, 1978). L'une de ses particularités est de produire un pigment bleu vert connu sous le nom de marennine (Lankester, 1886). La voie de synthèse de la molécule est toujours inconnue, mais on sait qu'elle est localisée au niveau de complexes vésiculaires cytoplasmiques aux apex de la cellule, avant d'être relarguée dans le milieu (Nassiri et al., 1998). Le pigment soluble s'accumule ainsi dans le milieu et, par médiation chimique, inhiberait la croissance des autres espèces microalgales présentes. Cet effet allélopathique de la marennine offrirait donc un avantage en termes de compétition interspécifique et contribuerait à prolonger le « bloom » d'*H. ostrearia* (Pouvreau et al., 2007).

Ce phénomène est connu depuis longtemps et les ostréiculteurs français l'utilisent traditionnellement pour le verdissement des huîtres. Afin de réaliser cet affinage, les bivalves sont placés dans des bassins peu profonds (appelés claires) dans lesquels l'eau de mer est renouvelée régulièrement et où *H. ostrearia* se développe de manière sporadique. Les branchies et palpes labiaux des huîtres se colorent en vert suite au contact de l'eau

chargée de marennine (Neuville & Daste, 1978), ce qui permet de les commercialiser en tant que « fines de claires vertes ».

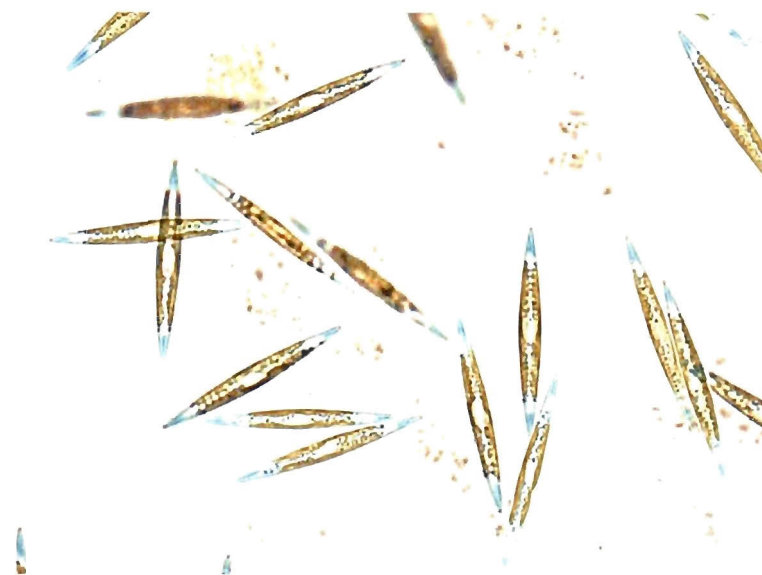


Figure 2: Photomicrographie d'*Haslea ostrearia*

Il a été démontré que la marennine purifiée issue de cultures d'*H. ostrearia* en laboratoire possède des effets antioxydant (Pouvreau et al., 2008), antiprolifératif (Carbonnelle et al., 1999; Gastineau et al., 2012), antitumoral (Carbonnelle et al., 1999), anticoagulant (Bergé et al., 1999), antiviral (Bergé et al., 1999; Gastineau et al., 2012) et antibactérien (Gastineau et al., 2012). *In vitro*, la marennine a inhibé le développement des bactéries marines pathogènes *Polaribacter irgensii*, *Pseudoalteromonas elyakowii* et *Vibrio aesturianus* à des concentrations aussi faibles que $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Gastineau et al., 2012). Malgré le fait que la nature même de la molécule ne soit toujours pas déterminée (la dernière hypothèse proposant un composé polyphénolique (Pouvreau et al., 2006), la nature de l'interaction de la marennine avec les bactéries a été analysée. Selon les travaux de Tardy-Laporte et al. (2012), l'activité antibactérienne de la molécule proviendrait de son

interaction avec les lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries GRAM(-). Dans les dernières années, les molécules perturbant les membranes biologiques des bactéries, comme les AMPs, ont attiré l'attention car elles pourraient constituer une base solide pour le développement de nouveaux antibiotiques efficaces contre les bactéries résistantes (Arouri et al., 2009).

La première partie du travail effectué dans le cadre de cette maîtrise a été d'assurer la production d'*H. ostrearia* et de marennine à l'UQAR. Des photobioréacteurs ont été conçus à cette fin et ont permis une production efficace de marennine. La description de ce système et les résultats de production ont été publiés au sein d'un article de *review* sur les diatomées bleues et la marennine (Gastineau et al., 2014). La page titre et les pages de l'article qui concernent la production de marennine à l'UQAR ont été placées en annexe et leur contenu ne sera pas abordé dans ce manuscrit.

OBJECTIFS & METHODE

L'hypothèse testée dans le cadre de ce travail est la suivante : la pathogénicité de *Vibrio splendidus* dans un élevage larvaire de *Mytilus edulis* peut être contrôlée par l'utilisation de la marennine. Plus spécifiquement, les objectifs principaux sont (1) d'améliorer la survie et la condition physiologique larvaire (2) de réduire la charge bactérienne totale et (3) d'inhiber la pathogénicité de *V. splendidus* en condition de test de provocation de mortalité en utilisant la marennine dans un élevage larvaire de *M. edulis*.

Afin de répondre à ces objectifs, trois expériences ont été menées. La première consistait à exposer un des larves à différentes concentrations de marennine afin de déceler un effet cytotoxique de la molécule sur celles-ci. Deuxièmement, les microalgues utilisées

pour l'alimentation des larves ont été cultivées avec les mêmes concentrations de marennine utilisées dans la première expérience. Ceci a permis de déterminer si la présence de marennine dans la culture avait un effet sur la disponibilité de la nourriture pour les larves. Finalement, une expérience d'exposition des larves de 10 jours au pathogène bactérien *Vibrio splendidus* a été réalisée en présence ou absence de marennine pour en déterminer l'effet protecteur. Lors de ces expériences, la survie larvaire, leur condition physiologique ainsi que le développement bactérien ont été suivis et analysés.

CHAPITRE 1
EFFET PROTECTEUR D'UN PIGMENT DE DIATOMÉE BLEUE
(MARENINE) CONTRE LE PATHOGENE BACTERIEN *VIBRIO*
***SPLENDIDUS* POUR LES LARVES DE MOULE BLEUE *MYTILUS EDULIS* :**
UTILISATION POTENTIELLE EN ECLOSERIES DE BIVALVE

1.1 RESUME

Ce premier article, intitulé « Protective effect of a blue diatom pigment (marenine) against the pathogenic bacteria *Vibrio splendidus* for the Blue Mussel *Mytilus edulis* larvae: potential use in bivalve hatcheries », fut corédigé par moi-même ainsi que par les professeurs Réjean Tremblay, Jean-Sébastien Deschênes, Jean-Luc Mouget, Karine Lemarchand, ainsi que Bertrand Genard. Une demande de brevet est déposée pour évaluation au bureau de liaison de l'UQAR. L'article sera par la suite soumis à la revue *Aquaculture*. En tant que premier auteur, ma contribution a été de réaliser l'essentiel de la revue de littérature, la réalisation des expériences, de l'analyse des résultats et des statistiques ainsi que d'interpréter les résultats et rédiger le manuscrit. Réjean Tremblay a contribué à l'ensemble des points précédents. Réjean Tremblay, Jean-Luc Mouget et Jean-Sébastien Deschênes ont fourni l'idée originale, conçu le plan d'étude, en plus de réviser l'article. Bertrand Genard et Karine Lemarchand ont participé au développement de la méthode pour les tests de provocation de mortalité avec le pathogène bactérien, en plus de réviser l'article. Tous les auteurs ont lu et approuvé le manuscrit final. Des versions abrégées de cet article ont été présentées au Colloque étudiant du Consortium de Recherche et Innovations en Bioprocédés Industriels au Québec (CRIBIQ) le 24 septembre 2013 à Trois-Rivières (Canada) et au Elsevier Aquaculture: To the next 40 years of sustainable global aquaculture le 7 Novembre 2013 à Las Palmas de Gran Canaria (Espagne).

Le but de la recherche est d'explorer la possibilité d'utiliser un pigment comme antibiotique naturel en éclosion de bivalve. Le pigment, appelé "marennine" est produit en laboratoire par la diatomée marine *Haslea ostrearia*. Les modèles biologiques sont : les larves de moule bleue *Mytilus edulis* et la bactérie pathogène *Vibrio splendidus*. L'hypothèse testée dans le cadre de ce travail est la suivante : la pathogénicité de *Vibrio splendidus* dans un élevage larvaire de *Mytilus edulis* peut être contrôlée par l'utilisation de la marennine. L'effet de différentes concentrations de marennine sur la croissance des algues fourrages utilisées pour l'alimentation des larves de moules a été premièrement testé sans démontrer d'influence négative. Ensuite, l'effet des mêmes concentrations de marennine sur la survie, la condition physiologique (analyses lipidiques) des larves et le développement bactérien dans les cultures larvaires a également été testé. Les résultats ont démontré qu'à faible dose, la marennine n'avait pas d'effet cytotoxique sur les larves et qu'elle améliorait leur survie. Finalement, la survie des larves et le développement bactérien dans les cultures ont été testés après 72 heures d'élevage en condition d'exposition à la bactérie pathogène. L'exposition au *Vibrio* a causé une mortalité significative par rapport au contrôle, mais la survie des larves exposées à la marennine et au *Vibrio* était similaire à celle observée chez les contrôles, indiquant que la marennine a complètement inhibé la pathogénicité de *V. splendidus*. Ces résultats confirment l'intérêt d'utiliser la marennine comme agent protecteur naturel en éclosion.

1.2 PROTECTIVE EFFECT OF A BLUE DIATOM PIGMENT (MARENNINE) AGAINST THE PATHOGENIC BACTERIA *VIBRIO SPLENDIDUS* FOR THE BLUE MUSSEL *MYTILUS EDULIS* LARVAE : A POTENTIAL USE IN BIVALVE HATCHERIES

François Turcotte¹, Réjean Tremblay¹, Jean-Sébastien Deschênes², Bertrand Genard¹, Karine Lemarchand¹, Jean-Luc Mouget³

¹ Institut des Sciences de la Mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, 310 des Ursulines, Rimouski, Québec, Canada, G5L 3A1; Email: Francois_Turcotte@uqar.ca, Rejean_Tremblay@uqar.ca, Bertrand_Genard@uqar.ca, Karine_Lemarchand@uqar.ca

² Université du Québec à Rimouski, 310 des Ursulines, Rimouski, Québec, Canada, G5L 3A1 Email: Jean-Sebastien_Deschenes@uqar.ca

³ FR CNRS 3473 IUML, Mer-Molécules-Santé [MMS], Université du Maine, Ave O. Messiaen, 72085 Le Mans cedex 9, France. Jean-Luc.Mouget@univ-lemans.fr

Corresponding author: Réjean tremblay

Abstract - In this paper, the possibility of using a natural microalgal pigment as an antibiotic in bivalve hatcheries was explored. The molecule (named *marennine*) was produced in the laboratory from *Haslea ostrearia* culture supernatants. The blue mussel *Mytilus edulis* was used as a model animal and the pathogenic marine bacteria *Vibrio splendidus* was used to cause larval mortality. The hypothesis tested was: *V. splendidus*'s pathogenicity in a *M. edulis* larval rearing can be controlled by using marennine-containing supernatant. The effect of different marennine concentrations was tested on the growth of microalgae used as feed for the larvae to make sure that feed availability was the same for all treatments in further experiments. No difference in growth was found. The effect of the same marennine concentrations was tested on a larval rearing for 20 days. At a low dose (0.1 mg L^{-1}), survival was 30 % higher than in the control. A higher dose (1.0 mg L^{-1}) caused heavy larval mortality. In a third experiment, ten days old larvae were exposed to *V. splendidus* for 72 hours, with or without marennine. The bacteria caused significant mortality when compared to control, and the marennine treated larvae exposed to the pathogen had a significantly higher survival, equal to the control. We concluded that marennine was an interesting molecule for pathogen control in hatcheries as it is active at low concentrations and significantly enhanced larval survival.

Keywords

Haslea ostrearia, *Vibrio splendidus*, Hatchery, Bivalve, Biological activities

Highlights

Marennine-containing supernatants, a natural microalgal pigment produced in high volumes in laboratory, inhibited *Vibrio splendidus*'s pathogenicity in a *Mytilus edulis* larval rearing.

A low dose of marennine improved *Mytilus edulis* larval survival by 75 % after 20 days of development.

The molecule could be used in bivalve or fish hatcheries to control the pathogenicity of harmful bacteria.

1.3 INTRODUCTION

A primary requisite in any shellfish culture or farming operation is an abundant, reliable and inexpensive supply of juveniles, commonly called seed (Helm et al., 2004). Hatchery-produced seed is increasingly becoming the standard raw material for aquaculture, a trend that is likely to broaden in the future (FAO, 2011). One of the major difficulties in the bivalve hatchery production is repeated bacterial infections resulting in heavy mortalities, causing major losses and great expenses for shellfish growers. These mortalities are generally related to bacteria from the genera *Vibrio*, *Pseudomonas* and *Aeromonas*, with members of the genus *Vibrio* being the most frequently observed (Estes et al., 2004; Paillard, 2004; Tubiash et al., 1965).

The use of known antibiotics to control diseases is generally avoided in hatcheries, as they are expensive, add cost to operations, and may cause the development of antibiotics resistant bacterial strains (Helm et al., 2004). Hence, there is a need to identify new natural molecules with antibiotic activities, since antibiotic products from nature are unsurpassed in their ability to provide novelty and complexity (Spížek et al., 2010). Marennine (Lankester, 1886) is a blue-green water-soluble pigment synthesized by the marine pennate diatom *Haslea ostrearia* Gaillon/Bory (Simonsen, 1974). This microalga is the only one within the *Bacillariophyceae* that has been found to produce such a pigment (Neuville & Daste, 1978). It accumulates in the apical regions of the cell before being released into the external medium (Nassiri et al., 1998), allowing the predominance of *H. ostrearia* by marennine's allelopathic activity (Pouvreau et al., 2007). Purified marennine have been shown to display antioxidant (Pouvreau et al., 2008), antiproliferative (Carbonnelle et al., 1999; Gastineau et al., 2012), antitumoral (Carbonnelle et al., 1999), anticoagulant (Bergé et al., 1999), antiviral (Bergé et al., 1999; Gastineau et al., 2012) and antibacterial (Gastineau et al., 2012) activities. *In vitro*, marennine inhibited the development of pathogenic marine bacteria *Polaribacter irgensii*, *Pseudoalteromonas elyakowii*, and *Vibrio*

aesturianus at concentrations as low as $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Gastineau et al., 2012). Even though marennine's molecular structure is still unknown (the last hypothesis proposed marennine as a polyphenolic compound [Pouvreau et al., 2006]), the molecule's interaction with bacteria has been investigated. As evidenced by Tardy-Laporte et al. (2012) in Gram(-) *Escherichia coli*, marennine would exert its antibiotic activity by interacting with lipopolysaccharides (LPS) in the outer membrane. In recent years, molecules with the ability to disturb biological membranes via non-specific interactions with the membrane lipid components have drawn attention as they may be the solution for the development of new efficient antibiotics against resistant bacteria (Arouri et al., 2009). With the development of high volume marennine production systems (Gastineau et al., 2014), marennine could be used as a natural antibiotic to control bacterial proliferation in larval cultures.

We tested the hypothesis that *Vibrio splendidus*'s pathogenicity in a *Mytilus edulis* larval rearing can be controlled using marennine. The pathogenic bacteria *V. splendidus* is considered as a widespread bivalve pathogen, and its pathogenicity has been thoroughly studied (Decker and Saulnier, 2011; Duperthuy et al., 2011; Tanguy et al., 2013). More specifically, the main objectives were to (1) improve larval survival and physiological condition, (2) reduce the total bacterial load and (3) inhibit the pathogenicity of *V. splendidus* in challenge conditions by using marennine in a *M. edulis* larval rearing. We also assessed the effect of marennine at concentrations used in the larval tests on the growth of microalgae species used as feed for the larvae.

To examine the physiological condition, we compared lipid class compositions between larvae under the different treatments. Bivalve larvae generally store large amounts of triacylglycerol (TAG) as the primary endogenous energy reserve to fuel basal metabolism and growth (Holland 1978; Gallager et al., 1986) The TAG level is also a predictor of

survival in bivalve larvae (Pernet et al., 2004), as successful growth and development depend on sufficient energy acquisition to sustain demands during embryogenesis and metamorphosis. Thus, the combination of rapid response to environmental change and the integrative nature of lipid energy reserves suggest that they are an ideal mechanism for evaluating physiological condition in larvae populations.

1.4 MATERIAL & METHODS

Haslea ostrearia & marennine production

All experiments were conducted at the *Station acquicole de Pointe-au-Père* (UQAR, 48° 31' N; 68° 28' W, Quebec, Canada). Algal production was carried out using an axenic strain of *Haslea ostrearia* (NCC-136) isolated from Bourgneuf Bay, France and provided by NCC (Nantes Culture Collection). Axenic cultures were grown in a semi-continuous mode in 50 kDa (Romicon, KOCH Membrane) ultrafiltered seawater enriched with F/2 medium (Guillard, 1975) and 30 mg L⁻¹ silicates. Cultures were produced in two 100 L flat bottom circular photobioreactors (PBRs) at light intensity of 180 µmol photons m⁻² s⁻¹, 14/10h light/dark cycle, temperature of 20°C and salinity of 28. Marennine concentration was determined on the cell-free culture water (syringe-filtered on 0.22 µm) using Beer-Lambert law. Optical density was measured at 677 nm in a 10 cm cell using a spectrophotometer (Cary 100 Bio UV-Visible, Agilent Technologies) and the specific extinction coefficient for extracellular marennine ($\epsilon_{677} = 12.13 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), as stated in Pouvreau *et al.* (2007). When maximal marennine concentration was reached (around 6.2 mg L⁻¹), the water containing the marennine (blue-water, BW) from each of the PBRs was filtered (1 µm) using a centrifugal pump and stored for less than one week in high-density polyethylene bottles at 16°C in the dark.

Rearing procedures

Spawning adults were obtained in June 2013 from the Havres-aux-Maisons lagoon (Iles-de-la-Madeleine, Canada, 47°25'N, 61°50'W), where *M. edulis* account for over 98% of the mussel population (Moreau et al. 2005). Generated gametes, derived from 60 different individual parents, were used in a pool-cross designed to produce one random larval family carried out at the *Station aquicole de Pointe-au-Père* from UQAR. Spawning was induced by thermal shock from 12 to 25°C, fertilized eggs were transferred in 180 L tanks at densities of 30×10^6 eggs tank⁻¹ and left undisturbed at 18°C for 48 h in filtered (1 µm) and UV treated seawater. D-larvae were collected by filtering the water on a 20 µm mesh screen and transferred at densities of ten larvae mL⁻¹ into specific rearing tanks, depending on the experiment. Water renewal and feeding occurred every 2-3 days with a mixture of *Pavlova lutherii*, *Isochrysis galbana*, and *Chaetoceros gracilis* at 30 cells µL⁻¹ of each component of the diet. Microalgal stocks were obtained from the Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP) Bigelow Laboratory for Ocean Sciences (West Boothbay Harbor, ME, USA) and were batch-cultured in f/2 medium and silicates (Guillard, 1975) in 6 L borosilicate Erlenmeyer flasks with 0.1 µm filtered and UV treated seawater at 20°C under continuous illumination. To feed the larvae, algae were harvested in late exponential growth phase, 6 to 10 days after flasks inoculation.

Marennine effect on microalgae used for larval food

The effect of marennine on the microalgal culture of *Pavlova lutheri*, *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros gracilis* had been assessed at concentration used for *in vivo* tests with the larvae (final marennine concentrations of 0.1 and 1.0 mg L⁻¹) and compared to control without marennine. Each strain was cultivated in triplicate for 12 days after inoculation in 1 L borosilicate Erlenmeyer flasks with treated seawater, illumination, and temperature as described earlier. Three treatments were applied to the cultures by adding BW to the seawater. Cell counts were made in triplicates generally each day (for 10 days

out of 12) with a Beckman Coulter-counter Z2 fitted with a 70 μm orifice tube (Beckman Coulter Canada, Mississauga, ON, Canada).

Marennine effect on mussel larvae

Marennine's effect has been tested on larval rearing with 10 larva mL^{-1} , using 2.8 L Nalgene erlenmeyers flaks at 20°C with gentle aeration. Filtered (1 μm) and UV treated seawater was used with addition of BW to obtain marennine concentrations of 0.1 and 1.0 mg L^{-1} . Control consisted of only seawater and each treatment had four replicates. After 20 days of development, three sub-samples by flasks were taken for survival estimation and bacterial analysis. The flasks content was then filtered on a 100 μm mesh to remove bacteria and microalgae. Remaining larvae were filtered onto pre-combusted (450°C) Whatman GF/F filters. Samples were stored in precleaned amber glass vials with Teflon-lined caps under nitrogen with 2 mL of 2:1 mixture of dichloromethane:methanol and stored at -80°C until lipid extraction.

*Marennine effect on mussel larvae exposed to *Vibrio splendidus**

For this experiment, 10 days old larvae reared in 60 L cylindrical tanks at 19°C with gentle aeration in filtered (1 μm) and UV treated seawater have been used and challenged with *Vibrio splendidus* 7SHRW (Mateo et al., 2009), a wild strain isolated from sediments from Hillsborough River, Prince Edward Island (Gulf of Saint Lawrence, Canada). Larvae were collected on a 53 μm square mesh filter, visually counted, pooled, and distributed equally into 1 L beakers (10 larvae mL^{-1}). Larvae were cultured at 20°C in duplicate with four treatments: *Control*, *Marennine*, *Vibrio*, and *Marennine + Vibrio*. We used a final concentration of 6.6×10^5 bacteria mL^{-1} for *V. splendidus* and 0.5 mg L^{-1} for marennine. Samples were collected for larvae survival assessments and bacterial analyses after 72h. Prior using *V. splendidus*, the strain kept at -80°C was streaked onto marine agar to ensure

purity and was further cultured in marine broth (Difco, Lawrence, KS, USA) and incubated at 25°C for 24 h prior to use. Bacterial culture was centrifuged (6000 g, 15 min), the supernatant discarded and the pellet resuspended in 10 mL of sterile seawater. Optical density of bacterial suspension was read at 600 nm in five replicates and compared to a standard of sterile seawater to determine the bacterial concentration. Correspondence between optical density and bacterial counts on marine agar was previously performed.

Bacterial analyses

Triplicate 4 mL aliquots of seawater samples for challenge test experiment were fixed in the dark for 15 minutes using 2% glutaraldehyde (final concentration; pH 7), and frozen at -80°C until analysis. The total free bacteria were enumerated using an EPICS ALTRA cell sorting flow cytometer (Beckman-Coulter Inc., Mississauga, Ontario, Canada) equipped with a 488 nm blue laser operating at 1 mW and running at a flow rate of 60 mL min⁻¹ as described in Seychelles et al. (2013). Heterotrophic bacteria were stained (SYBR1 Green I, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) and subpopulations with a low nucleic acid (LNA) or a high nucleic acid (HNA) content were quantified as described in Belzile et al. (2008). Data analysis was performed with the Expo321 software (Beckman Coulter Inc., Fullerton, BC, CA). For the purpose of this study, %HNA (the ratio of HNA cells to total bacteria count) was used to describe the physiological state of the bacterial community (Seychelles et al., 2013).

Lipid class analyses

Lipid extractions were carried out on ice according to the modified Folch method (Folch et al., 1957) as described by Parrish. (1987). Extracted lipids were spotted onto S-III Chromarods (Iatron Laboratories, Tokyo, Japan) for thin layer chromatography and lipid classes were separated using a four solvent system as described in Parrish. (1987). Chromarods were scanned by a flame ionization detection system (FID; Iatroscan Mark-VI,

Iatron Laboratories, Tokyo, Japan). An integration software (Peak Simple version 3.2, SRI) was used to analyse chromatograms of each lipid class as described by Parrish. (1999).

Data analysis

Univariate variables (microalgae cell concentration, larval survival, total bacterial concentration, %HNA) were compared using one-way ANOVA as a function of marennine concentration or *Vibrio* treatment for flasks experiments. T-test was used to test the effect of marennine (control and 0.1 mg L⁻¹) on dependent lipidic variables (total lipid concentration, lipid classes and TAG/Sterol ratio) in flask experiments. The assumption of homoscedasticity was verified visually by the spread of residuals, as suggested by Quinn and Keough (2002), normality was tested by a Shapiro-Wilk test and data were transformed (arcsine square-root for percentage and square-root for concentrations) when necessary. Post hoc Tukey's pairwise multiple comparison tests were used to determine which means were significantly different. All statistical analyses were carried out at a significance level at $\alpha = 0.05$ and performed using JMP 9.0.1 (SAS Institute) software.

1.5 RESULTS

Marennine effect on microalgae used for larval food

We observed that the presence of marennine below a concentration of 1.0 mg L⁻¹ had no effect on microalgae growth for each of the species under study (Figure 1). No significant differences were found among the three treatments (0, 0.1 and 1.0 mg L⁻¹ of marennine) in final cell concentration (day 12) for the culture of *I. galbana* ($F_{2, 8} = 0.8206$; $p = 0.4841$), *P. lutherii* ($F_{2, 8} = 0.4305$; $p = 0.6722$) and *C. gracilis* ($F_{2, 8} = 3.0020$; $p = 0.1249$).

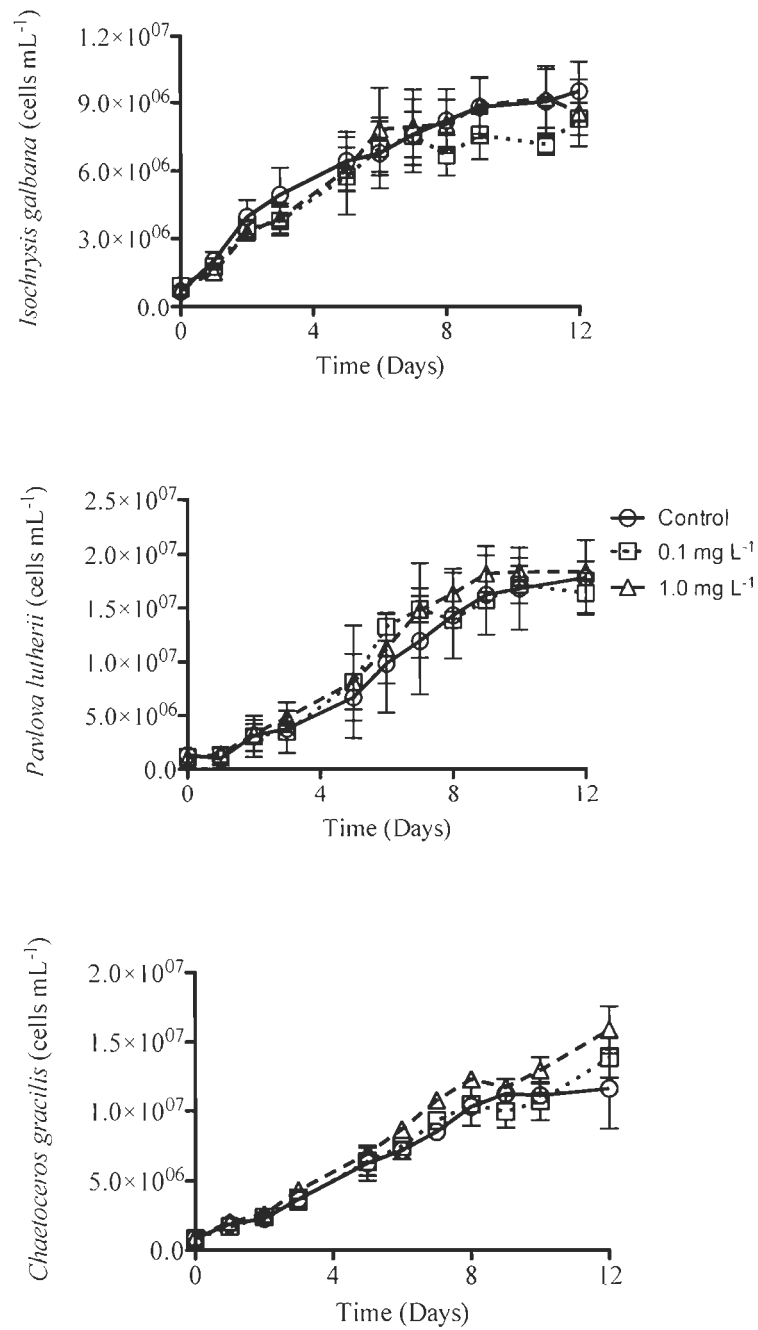


Figure 3: Cell concentration per mL during 12 days batch culture of *Isochrysis galbana* (up), *Pavlova lutherii* (center) and *Chaetoceros gracilis* (down) with presence of marennine at two different concentrations (0.1 and 1 mg L⁻¹) and without marennine (indicated by different symbols on the curves). Data are means \pm SD (n = 3).

Marennine effect on mussel larvae

In 2.8 L flask cultures, a significant effect of marennine concentration on larval survival ($F_{2,9} = 35.7372$; $p < 0.0001$) and bacterial load ($F_{2,9} = 20.8245$; $p = 0.0004$) was observed after 20 days of development. Larval survival was higher at 0.1 mg L^{-1} than in the control, while almost no larvae survived at 1.0 mg L^{-1} (Figure 2). The total bacterial load was lower in the 0.1 mg L^{-1} treatment and control than in the 1.0 mg L^{-1} treatment, while no significant differences were found between treatments in %HNA (Figure 2). Table 1 shows results from the lipid analyses. The 1.0 mg L^{-1} treatment was not included in the analysis due to the absence of sufficient larvae to perform the analyses, following the very high mortalities observed with this treatment. Thus, results are described only for the control and the 0.1 mg L^{-1} marennine treatment. No significant changes have been observed for each lipid component (Table 2). However, the marennine treated larvae at low concentration had 40% more TAG than the control, but with too high variability to be considered significant. Similar trends were observed for the TAG over sterol ratio.

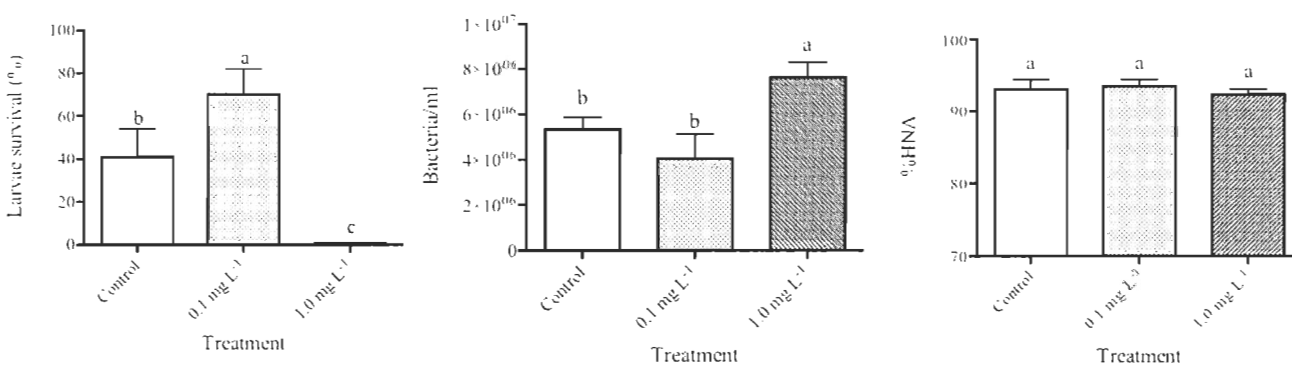


Figure 4: Larval survival (%), bacterial concentration (cells mL⁻¹) and high nucleic acid bacteria proportion (%HNA) for the two marennine treatments (0.1 and 1.0 mg L^{-1}) and the control without marennine. Data are means \pm SD ($n=4$) and different letters indicate significant differences at $p < 0.05$.

Table 1 : Mean proportions of lipid classes \pm SE (% mass of total lipids, n=4) and results of the T-tests examining the effect of the treatment in mussel larvae treated or not with marennine after 20 days of development. TAG, triacylglycerol proportion; ST, sterol; AMPL, acetone mobile polar lipids; PL, phospholipid; TAG/ST, triacylglycerol over sterol ratio.

Treatment	Lipid class					
	Total lipids (ng/larvae)	%TAG	%ST	%AMPL	%PL	TAG/ST
Control	38.4 \pm 12,3	20,5 \pm 5,6	2.4 \pm 0,8	1,2 \pm 1,2	76,0 \pm 6,1	12,3 \pm 6,4
Marennine 0,1 mg/L	32,6 \pm 4,3	34,0 \pm 9,4	1.6 \pm 0,3	1,7 \pm 0,7	62,7 \pm 9,2	28,5 \pm 11,9
df	1, 6	1, 6	1, 6	1, 6	1, 6	1, 6
F	0.1969	1.4817	0.7209	0.691	1.416	1.4406
p	0.6728	0.2692	0.4284	0.4377	0.279	0.2753

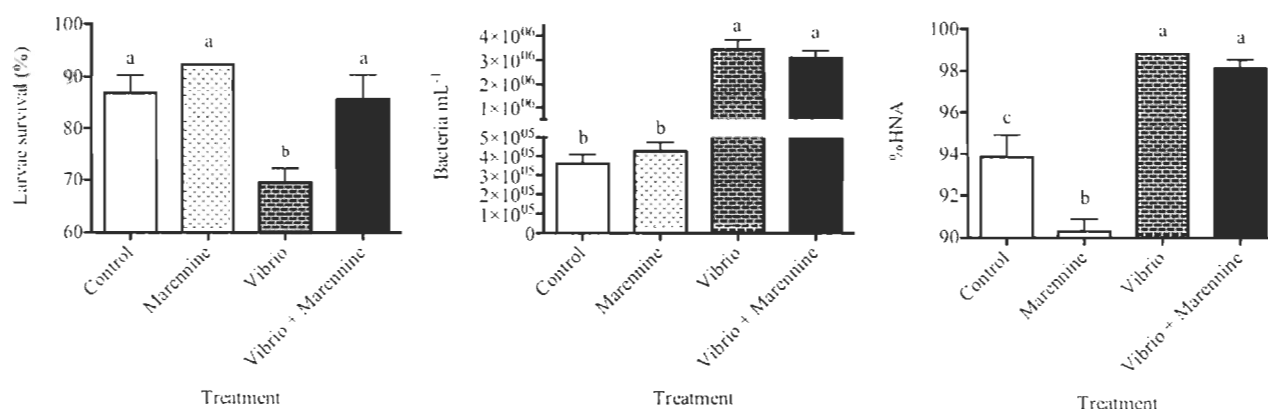


Figure 5 : Larval survival (%), bacterial concentration (cells mL⁻¹) and high nucleic acid bacteria proportion (%HNA) for the control without addition, marennine treatment (0.5 mg L⁻¹), *Vibrio* treatment (10⁵ bacteria mL⁻¹ of *V. splendidus*) and the *Vibrio* + marennine treatment (0.5 mg L⁻¹ of marennine and 10⁵ bacteria mL⁻¹ of *V. splendidus*) after 72 hours of exposure. Data are means \pm SD (n = 2) and different letters indicate significant differences.

Marennine effect on mussel larvae exposed to Vibrio splendidus

Results from the bacterial challenge show that treatment had a significant effect on survival ($F_{3, 7} = 15.4934$; $p = 0.115$), bacterial load ($F_{3, 7} = 168.8444$; $p = 0.0001$) and %HNA ($F_{3, 7} = 221.585$; $p = 0.0001$). After 72 hours, larval survival was 88% in the control and was similar to « marennine » and « *Vibrio* + marennine » treatments. Survival for larvae challenged with *V. splendidus* without marennine was significantly lower (Figure 3). Both treatments including *V. splendidus* had higher total bacterial counts and %HNA. Thus, the « *Vibrio* + Marennine » treatment did not show different bacterial counts or %HNA from the « *Vibrio* » treatment (Figure 3).

1.6 DISCUSSION

Marennine had a positive effect on larval survival in both experiments. Typical survival from D-larvae to pediveliger stage is variable upon cultured species, but it can be as elevated as 50 to 70 % for oysters and clams and as low as 15 to 30 % for some pectinids (Helm et al., 2004). The 70% survival rates for marennine treated *M. edulis* larvae, with 75% survival improvement comparatively to non-treated larvae (control), are thus on the upper end of the expected survival for bivalves. Furthermore, in conditions of 72h *Vibrio* exposition, survival rates for the challenged larvae treated with marennine were similar to the non-challenged larvae (control) with values near 90%, suggesting that marennine completely inhibited the negative effect of *V. splendidus*. Addition of 10^5 bacteria mL^{-1} induced a significant effect on *M. edulis* larvae after 72 h, but did not lead to a septicemia response or a massive mortality. This is in accordance with the results of Mateo et al. (2009), who found the strain 7SHRW to have only minor negative effects on soft-shell clam (*Mya arenaria*) hemocytes, and with the works of Gauthier-Clerc et al. (2013), founding a weak immune response in adult *M. edulis* exposed to 10^4 bacterial cells mL^{-1} .

Since minor effects were found in hemocytes and no effect were found at low concentrations on adults and the fact that we added 10^5 cells mL^{-1} , a small but significant pathogenic effect was expected on larvae. Pathogenic effects of the same bacteria may not be the same for different species of bivalve and high concentrations of *Vibrio* do not always lead to massive larval mortality (Anguiano-Beltrán et al., 2004). As an exemple, Sugumar et al. (1998), induced 100% mortality in 24 hours in *Crassostrea gigas* larval culture inoculated with 10^5 colony-forming units (CFU) mL^{-1} of *V. splendidus* isolated from infected larvae, while isolates from other sources demonstrated a lower degree of virulence. These authors suggested that strains from sources other than diseased larvae could be less virulent. In the present study, the elevated bacterial loads, the higher activity level (%HNA), the significantly higher larval mortality, and the observations of bacillary necrosis symptoms related to *Vibrio* infection (Tubiash et al., 1965) in the challenged larvae without marennine confirms the effectivity of the challenge.

Marennine showed a significant positive protection effect against *V. splendidus* at a concentration of 0.5 mg L^{-1} , but did not reduce the total bacterial loads. One explanation could be that marennine inhibited the growth of specific bacteria, like the harmful *Vibrio*, thus allowing other bacteria, which has no negative effect on the larvae, to grow instead. This can only be stated as an assumption, as we do not know the composition of the bacterial communities in the rearing flasks. It is likely that marennine has an antibiotic effect only on specific bacteria, as the molecule has demonstrated antibiotic activity against the marine GRAM(-) bacteria *Polaribacter irgensii*, *Pseudoalteromonas elyakowii*, and *Vibrio aestuarianus*, but had no effect on a range of GRAM(+) and GRAM(-) terrestrial bacteria (Gastineau et al., 2012). This could be a positive feature for the use of marennine to control only specific potential pathogenic bacteria, as other bacteria can constitute a significant part in the feeding of bivalves (Crosby et al., 1990; Douillet, 1993a,b). Many studies show that a mixed feeding (microalgae & bacteria) can increase larval growth and survival (Douillet & Langdon, 1994; Ruiz-Ponte et al., 1999).

In the first experiment (without *Vibrio* exposition), marennine treatments did not change the physiological status of the bacterial community in the larval rearing flask, as %HNA was similar to the control. In the second experiment, the 0.5 mg L⁻¹ marennine treated larvae without *Vibrio* inoculation had total bacterial load similar to the control but %HNA decreased significantly by approximately 3%. In contrast, the addition of *Vibrio* bacteria increased %HNA over 4% comparatively to the control, indicating a slight, but significant rise in bacterial community metabolism. The addition of marennine had no effect on that rise. These results suggest that most bacteria participated to bacterial growth as %HNA was over 90% for all treatments. Thus, the organic matter amount was sufficiently present for the bacterial growth, and marennine could not reduce this activity in the *Vibrio* treatments. However, marennine reduced larval mortality suggesting a significant effect on some specific bacteria.

The most plausible hypothesis is then that marennine did not reduce the number of potential harmful bacteria, nor modify their metabolism but only reduced their pathogenicity or virulence. Marennine have been found to interact with the LPS in bacterial membranes (Laporte et al., 2012), lipids related to Gram-negative bacteria toxicity (Beutler, 2004). Also, the outer membrane protein (OMP) OmpU was shown to be a major determinant of *V. splendidus* strain LGP32 virulence, contributing to the host's antimicrobial peptide/protein (AMPs) resistance, to the host cells adherence, and to the pathogen/symbiont recognition (Duperthuy et al., 2010). Once again, as marennine has been found to interact with the bacterial membrane, it could also interact with the OMP of *V. splendidus* responsible for its pathogenicity, thus reducing it.

We also demonstrated a strong cytotoxic potential of marennine at concentration of 1.0 mg L⁻¹ for *M. edulis* larvae, as all larvae were dead after 20 days of exposition at this specific concentration. This mortality was associated with a significant increase in bacterial load that was not reduced by the presence of marennine. This bacterial development could be related to the high organic matter availability in the rearing tanks associated to dead larvae stimulating the development of opportunistic bacteria (saprophytic), feeding on the

dying larvae (Helm et al., 2004). Since no estimations of marennine content in water ponds in the wild are published, it is impossible to tell if this cytotoxic effect is occurring in nature.

Our results showed that a marennine concentration of 0.1 mg L^{-1} had no significant negative effect on the larvae's capacity to accumulate lipids. Their total lipid content and lipid classes composition after 20 days of exposition to marennine were similar to the control. However, even though the differences were not significant, mussel larvae exposed to marennine accumulated 40% more TAG (energetic lipid reserve) than the control larvae. This trend was also reflected on TAG/ST ratio generally used in larvae as physiological indicator (Fraser et al. 1989, Pernet et al. 2004). Marennine treated larvae had a TAG/ST ratio more than two times higher indicating a better physiological state, but as the variability between rearing tanks was very important, this difference was not significant. This trend then needs to be validated, particularly in higher volume tanks where rearing conditions are more stable. A high culture volume stabilizes the environment by slowing down the variation in culture factors, and lowering the surface to volume ratio, explaining the better survival results generally obtained in larger rearing volumes (Gruffydd and Beaumont 1972, Harboe et al. 1994, Andersen et al. 2000). A higher TAG content associated with a higher survival in marennine treated larvae would be in accordance with the results of Pernet et al. (2004), who found a positive relationship between *M. edulis* larval survival and higher energy reserve content estimated by TAG level. Bacterial infections in *C. virginica* larvae have been demonstrated to be related to decreasing feeding activity and a TAG depletion (Genard et al., 2011). Pathogenic bacteria in the culture induced repeated circular motion and the retraction of the velum resulting in a decrease in feeding activity (Tubiash et al., 1965). In our experiment, marennine treatments did not affect food availability, as the growth of each microalgae used for larval feeding was similar with or without marennine until concentration of 1.0 mg L^{-1} . Furthermore, as larvae treated or not with marennine accumulated similar lipid content with same lipid class composition, marennine treatment does not seem to have affected microalgae quality, feeding behavior of the larvae and accumulation of lipidic reserves by the larvae.

1.7 CONCLUSIONS

This exploratory study regarding marennine's potential as an antibiotic for bivalve hatcheries showed promising results. It showed that marennine enhanced larval survival in challenged and normal culture conditions and, although not clearly demonstrated, marennine seems to have improved larvae's physiological condition. There is a real need for natural molecules that can enhance larval survival and quality in hatcheries and the conclusions of this experiment show that marennine could be a good candidate. Research still needs to be done to precisely determine the optimal marennine concentration for larval performance, to determine marennine's effect on a wider range of species relevant for aquaculture, and to estimate the efficiency of marennine against different pathogenic bacteria in condition of challenged larvae.

Acknowledgements. Thanks are adressed to Nathalie Gauthier, Jean-Bruno Nadalini, Claude Belzile and Kim Doiron for their technical help. This work was supported by the Discovery Grants to Tremblay from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the student grant to Turcotte by Ressources Aquatiques Québec (RAQ) and by the FP7 BIOVADIA obtained by Mouget from the European Union.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de cette étude était de démontrer l'intérêt d'utiliser la marennine comme antibiotique naturel en éclosion de bivalves. La littérature a fourni les prémices sur lesquelles ce projet a été fondé, soit une série de tests *in vitro* quant à l'activité antibactérienne de la marennine sur des bactéries marines (Gastineau et al., 2012). Il avait été démontré que la marennine purifiée avait réduit la croissance de cultures bactériennes en antibiogramme. Aucune information ne permettait de croire que la pathogénicité des micro-organismes avait été réduite. Aucun test *in vivo* n'avait été réalisé et les expériences présentées dans ce mémoire représentent donc les premiers tests effectués en ce sens. L'utilisation de cultures larvaires pour étudier l'activité de la marennine a permis de mesurer plusieurs paramètres primordiaux pour une production commerciale en éclosion, soit la survie des larves, leur condition physiologique et la dynamique bactérienne associée aux cultures.

En plus de déterminer une concentration de marennine non nocive pour les larves, une première expérience a permis de démontrer que la survie larvaire avait été améliorée en présence d'une dose relativement faible de marennine (0.1 mg/L) et que la condition physiologique des larves semblait avoir été améliorée. Dans une deuxième expérience d'exposition à un pathogène, la pathogénicité de *V. splendidus* sur les larves de moules a été inhibée par la marennine, ce qui représente le résultat le plus intéressant de l'étude. Nos résultats permettent donc de répondre positivement à l'hypothèse principale de ce travail. De manière générale, l'étude a permis de démontrer l'intérêt d'utiliser la marennine comme antibiotique naturel en éclosion de bivalves.

Certaines modifications à la méthode pourraient être apportées afin d'améliorer la précision des résultats et permettraient de tirer des conclusions plus tranchées. Afin de préciser l'effet de la marennine sur la condition physiologique des larves et pour pallier à la grande variabilité des résultats des analyses lipidiques au sein d'un même traitement, il serait nécessaire de travailler avec un nombre d'unités biologiques plus élevé. Il serait également intéressant de mesurer la variation de l'activité d'alimentation des larves par comptage des cellules de phytoplancton et de tenter d'établir une relation avec les réserves lipidiques.

L'effet de la marennine sur la communauté bactérienne n'a pas été démontré avec les analyses de cytométrie en flux, qui ne fournissent qu'une indication de la charge bactérienne totale dans l'échantillon et leur niveau d'activité. Un examen plus approfondi de la réaction relative des différents genres bactériens à la marennine par génotypage serait nécessaire. Il serait également intéressant de mesurer l'expression des facteurs de pathogénicité en fonction de la présence de marennine.

D'autres raffinements à la méthode pourront être apportés afin de répondre à des questions plus spécifiques. Des tests *in vivo* avec un élevage larvaire suivant le même protocole qu'utilisé dans cette étude pourront être effectués afin de préciser le dosage et la fréquence d'utilisation optimale de la marennine. Il serait pertinent de déterminer précisément la concentration cytotoxique pour les organismes que l'on veut protéger, ainsi que la concentration effective létale pour les micro-organismes que l'on veut contrôler.

Bien sûr, cette étude ne confirme l'efficacité de la molécule que pour une seule espèce de bivalves, et dans certaines conditions particulières. D'autres travaux devront donc être menés afin de tester l'effet de la marennine sur d'autres espèces élevées en

écloseries, que ce soit de bivalves ou de poissons. D'autres tests antibactériens pourront aussi être menés avec d'autres pathogènes, afin d'élargir le spectre des connaissances sur la protection potentielle offerte par la marennine. La molécule a également montré en condition *in vitro* une activité antivirale contre le virus *Herpes simplex* (Gastineau et al., 2012) qui cause d'importants dommages aux écloseries d'huitres du Pacifique (Renault et al., 1993). Pour l'instant, aucune solution n'est offerte aux éleveurs qui subissent des pertes financières importantes avec des mortalités de naissains très élevées depuis quelques années, par exemple avec les épisodes de mortalités massives chez *Crassostrea gigas* en France (Petton et al., 2013).

D'autres avenues de recherches sont possibles afin d'atteindre une éventuelle production commerciale de la marennine. Tout d'abord, il est impératif de déterminer la nature chimique de la molécule et d'en préciser la toxicité pour l'être humain. De plus, il serait nécessaire de développer un protocole de purification optimal pour les domaines où un grand degré de pureté est exigé (pharmaceutique, cosmétique, alimentation). En effet, la molécule pourrait être utilisée dans ces domaines étant donné ses propriétés antiproliférative, antioxydante ou comme colorant alimentaire bleu d'origine naturelle. Jusqu'à maintenant, la méthode de purification n'a pas permis d'obtenir un extrait suffisamment pur pour en faire la caractérisation. Des travaux sont présentement en cours afin d'améliorer ce protocole. De plus, la production d'*Haslea ostrearia* et de marennine devra être optimisée afin d'obtenir de plus grandes quantités de marennine en des temps plus courts (voir annexe). Pour l'instant, une évaluation des coûts de production et des avantages financier d'utiliser la marennine en écloserie ne peut être produite puisque les systèmes de productions ne sont pas optimisés. Par contre, la molécule présente un potentiel certain pour ce domaine industriel et la poursuite des recherches en ce sens est justifiée.

ANNEXE

Review

Marennine, Promising Blue Pigments from a Widespread Haslea Diatom Species Complex

Romain Gastineau ¹, François Turcotte ², Jean-Bernard Pouvreau ³, Michèle Morançais ⁴, Joël Florence ⁴, Eko Windarto ¹, Fiddy Semba Prasetya ¹, Sulastri Arsad ¹, Pascal Jaouen ⁵, Mathieu Babin ², Laurence Coiffard ⁴, Céline Couteau ⁴, Jean-François Bardeau ⁶, Boris Jacquette ¹, Vincent Leignel ¹, Yann Hardivillier ¹, Isabelle Marcotte ⁷, Nathalie Bourgougnon ⁸, Réjean Tremblay ², Jean-Sébastien Deschênes ², Hope Badawy ⁶, Pamela Pasetto ⁶, Nikolai Davidovich ⁹, Gert Hansen ¹⁰, Jens Dittmer ⁶ and Jean-Luc Mouget ^{1,*}

¹ FR CNRS 3473 IUML, Mer-Molécules-Santé (MMS), Université du Maine, Ave O. Messiaen, 72085 Le Mans cedex 9, France; E-Mails: gastineauromain@yahoo.fr (R.G.);

eko_windarto89@yahoo.co.id (E.W.); fsembapr@gmail.com (F.S.P.);

sulastriarsad@yahoo.co.id (S.A.); Boris.Jacquette@univ-lemans.fr (B.J.);

Vincent.Leignel@univ-lemans.fr (V.L.); Yann.Hardivillier@univ-lemans.fr (Y.H.)

² Institut des Sciences de la mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, 310 des Ursulines, Rimouski, QC G5L 3A1, Canada; E-Mails: francois.turcot@gmail.com (F.T.);

mathieu_babin@uqar.ca (M.B.); Rejean_Tremblay@uqar.ca (R.T.);

jean-sebastien_deschenes@uqar.ca (J.-S.D.)

³ EA 1157, Laboratoire de Biologie et Pathologie Végétales (LBPV), Université de Nantes, SFR 4207 QUASAV, 44322 Nantes, France; E-Mail: Jean-Bernard.Pouvreau@univ-nantes.fr

⁴ FR CNRS 3473 IUML, Mer-Molécules-Santé (MMS), Université de Nantes, 44322 Nantes, France; E-Mails: michele.morançais@univ-nantes.fr (M.M.); Joël.florence@univ-nantes.fr (J.F.);

laurence.coiffard@univ-nantes.fr (L.C.); celine.couteau@univ-nantes.fr (C.C.)

⁵ FR CNRS 3473 IUML, UMR-CNRS 6144 (GEPEA), Université de Nantes, CRTT 37 Bd de l'Université, F-44602 Saint-Nazaire, France; E-Mail: pascal.jaouen@univ-nantes.fr

⁶ UMR CNRS 6283, Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM),

Université du Maine, Ave O. Messiaen, 72085 Le Mans cedex 9, France;

E-Mails: Jean-Francois.Bardeau@univ-lemans.fr (J.-F.B.); hope.badawy@gmail.com (H.B.);

Pamela.Pasetto@univ-lemans.fr (P.P.); Jens.Dittmer@univ-lemans.fr (J.D.)

⁷ Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Downtown Station, Montréal, QC H3C 3P8, Canada; E-Mail: marcotte.isabelle@uqam.ca

⁸ Université de Bretagne-Sud, Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines,

Campus de Tohannic, F-56017 Vannes, France; E-Mail: nathalie.bourgougnon@univ-ubs.fr

⁹ Karadag Nature Reserve of the National Academy of Sciences, p/o Kurortnoe, Feodosiya 98188, Crimea; E-Mail: NickolaiD@yandex.ru

3.2. Recent Transfers to a Pre-Industrial Scale

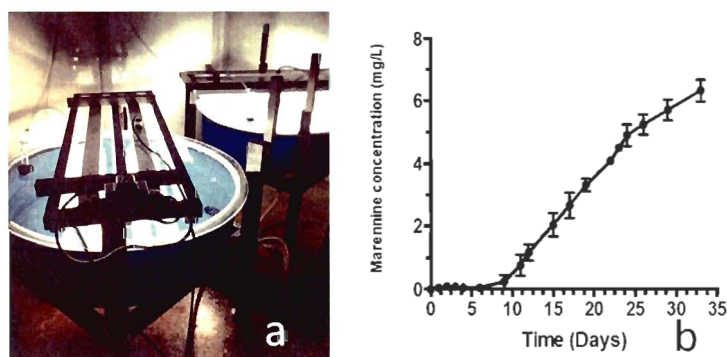
Fundamental research regarding the characterization of marennine-like pigments can be sustained by algal production at the laboratory scale, but mass production of *H. ostrearia* is a prerequisite before achieving any added value at the industrial scale. Therefore different attempts were made to grow this peculiar diatom. According to the literature, *H. ostrearia* has been cultivated mostly at the laboratory scale (<100 L), but also at a semi-pilot scale (up to 10 m³) [68], or using photobioreactors (<7 L) [65]. At a larger scale, *H. ostrearia* was grown industrially for several years under indoor controlled conditions to produce marennine, mainly for the intensive greening of oysters (knowledge transfer from U. de Nantes to SOPROMA, Bouin, France); however, this production unit ceased its activity about seven years ago due to lack of funding. In fact, the only structures for the mass production of *H. ostrearia* that have ever been fully operational are oyster ponds. Unfortunately, blooms of *H. ostrearia* in these ponds (and as a consequence the greening of oysters) remain erratic and non-controllable. Production units of *H. ostrearia* still need to be developed, taking into account the specificities of benthic microalgae, that use tank surface to grow and generally tend to form biofilm, which makes them difficult to grow in conventional culture systems designed for suspended microalgae. Since the technology to produce massive algal biofilms is not readily available, a simple photobioreactor could be designed in order to maximize *H. ostrearia* productivity and, mostly, excretion of marennine. Some relevant traits of *H. ostrearia* autecology must be considered to design the culture system: growth is characterized by a settlement on the marine sediment, where maximal biomass (as far as 350,000 cells L⁻¹) is obtained in conditions of shallow waters (as in the oyster ponds) and high light intensity [47]. Marennine is then released in the water, with concentration ranging between 2 and 5 mg L⁻¹ [68].

With this goal—but also these constraints in mind—a photobioreactor (PBR) dedicated to the production of *H. ostrearia* and marennine has been devised. This simple PBR was designed in order to obtain large quantities of marennine to further study its biological activities and chemical structure. Also, it was designed in a simple manner so that it could be easily setup by end-users, in laboratories as well as in hatcheries. Flat-bottom polyethylene circular tanks of 200 L were used (diameter: 122 cm), covered by acrylic glass with light supplied from above by T5-5000K high-output fluorescent tubes (General Electric, Mississauga, Canada) at about 25 cm from the cover. A drain was installed at the lowest point of the tank, allowing water sampling and harvesting. Pre-filtered air (0.22 µm) was supplied to the dead space inside the tank through the cover to keep a positive pressure inside the tank, preventing contamination from the outside and purging air heated by the proximity of the light source. The proximity of the air source relative to the water surface also generated a slight agitation at the surface, thus ensuring a slow but constant water movement in the tank and providing nutrient renewal to the cells.

The study was conducted at the Université du Québec à Rimouski (UQAR) Station Aquicole at Pointe-au-Père (Québec, Canada), with the use of two PBRs. Algal production was carried out using the NCC-136 strain of *H. ostrearia* isolated from Bourgneuf Bay (Bouin, France) and provided by the Nantes Culture Collection (NCC). Cells were grown in a semi-continuous mode in sterilized seawater enriched with F/2 [69] and 30 mg L⁻¹ silicates. Culture was initiated in 500 mL Erlenmeyer flasks filled with 200 mL seawater, and then transferred to 2.8 L Erlenmeyer flasks filled with 2 L seawater.

Growth irradiance was $125 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and room temperature was maintained at $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Two of these 2 L flasks were then used to inoculate one PBR with approximately $2000 \text{ cells mL}^{-1}$. To minimize light attenuation by the water column ($<10 \text{ cm}$), tanks were half filled with 100 L filtered ($1 \mu\text{m}$) natural seawater (salinity 28) supplemented with commercial nutrients (f/2 and silicate from Fritz) and ultrafiltered at 50 kDa (Romicon, KOCH Membrane, Wilmington, MA, USA). The irradiance level was $180 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR Radiometer, Q201, Macam photometrics LTD., Livingston, Scotland, UK), measured under the light source at the bottom of the empty tank. Light intensity decreased in a linear way to reach $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the border of the PBR (Figure 7a). Room temperature was kept at $16 \text{ }^\circ\text{C}$ by an air-conditioner, for a maximal water temperature of $19.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Both rooms were kept in a 14/10 h light/dark cycle. Two cultures were run in separate PBRs, under the same conditions. Marennine concentration was determined on the cell-free culture water (syringe-filtered on $0.22 \mu\text{m}$) by optical absorption according to the Beer-Lambert law. Optical density (OD) was measured at 677 nm in a 10 cm cell by means of a Cary 100 Bio UV-Visible spectrophotometer (Agilent Technologies, Mississauga, Ontario, Canada), using the specific extinction coefficient for EMn following Pouvreau *et al.* [70]. Optimal algal biomasses in the tanks, based on cells and biofilm appearance, were obtained after 12 days of culture growth, as with pre-culture realized in smaller volumes (confirmed with Nageotte counting chambers). Marennine release into the medium started after 10 days of growth (Figure 7b), which corresponds to the end of the exponential phase. Marennine production was relatively constant between day 10 and day 33, with a production rate of about $0.3 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$. Maximal extracellular concentration obtained was about 6.2 mg L^{-1} in both PBRs.

Figure 7. (a) Photography of the two PBRs used in this experiment; (b) Marennine concentration (mg L^{-1}) in the PBR, measured spectrophotometrically on the culture medium. Values are means of concentrations obtained in each PBR ($n = 2$).



Different culture methods were tried in the past by different authors, with estimated marennine productivities ranging from 3 to 100 mg L^{-1} [65,66,68,71–74], but these values were obtained using a cytophotometric method and a calibration curve established with unpurified marennine, and not referring to a published extinction coefficient [75], which is more an estimation of marennine production in a culture rather than a true quantification of the pigment [70]. In the literature, there is no quantification of marennine production in natural environments or in a culture that uses the molar

extinction coefficient determined on purified marennine by Pouvreau *et al.* [70]. Therefore, a direct comparison of our results with other results in the literature is difficult.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Andersen, S., Burnell, G., Bergh, Ø., 2000. Flow-through systems for culturing great scallop larvae. *Aquacult. Int.* 8, 249–257.
- Andersen, S., Christophersen, G., Magnesen T., 2011. Spat production of the great scallop (*Pecten maximus*): A roller coaster. *Can. J. Zool.* 89: 579-598.
- Anguiano-Beltrán, C., Lizárraga-Partida, M.L., Searcy-Bernal, R., 2004. Effect of *Vibrio alginolyticus* on larval survival of the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aquat. Organ.* 59, 119–23.
- Angulo, F. 1999. Use of antimicrobial agents in aquaculture: potential for public health impact. Public Health Service. Department of Health & Human Services, CDC. 18th October 1999.
- Alliance de l'industrie Canadienne de l'aquaculture, <http://www.aquaculture.ca/files/species-mussels.php>, page consultée le 21 septembre 2014
- Arouri, A., Dathe, M., Blume, A., 2009. Peptide induced demixing in PG/PE lipid mixtures: a mechanism for the specificity of antimicrobial peptides towards bacterial membranes *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 650–9.
- Bayne, BL., 1976. The biology of mussel larvae. In : *Marine mussels : their ecology and physiology*. BL Bayne ed. Cambridge : Cambridge University Press. P. 81-120.
- Belzile, C., Brugel, S., Nozais, C., Gratton, Y., Demers, S., 2008. Variations of the abundance and nucleic acid content of heterotrophic bacteria in Beaufort Shelf waters during winter and spring. *J. Mar. Syst.* 74, 946–956.
- Bergé, J.P., Bourgougnon, N., Alban, S., Pojer, F., Billaudel, S., Chermann, J.C., Robert, J.M., Franz, G., 1999. Antiviral and anticoagulant activities of a water-soluble fraction of the marine diatom *Haslea ostrearia*. *Planta Medica* 65, 604-609.
- Beutler, B., 2004. Innate immunity: an overview. *Mol. imm.* 40, 845–859.

- Bostock, J., McAndrew, B., Richards, R., Jauncey, K., Telfer, T., Lorenzen, K., Little, D., Ross, L., Handisyde, N., Gatward, I., Corner, R., 2010. Aquaculture: global status and trends. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365, 2897–912.
- Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.* 8, 1137-1144.
- Collette, B., 2006. USFDA, Industry Efforts Reduce Use of Unapproved Drugs. *Global Aquaculture Advocate*. Juillet-Août, 38-39.
- Carbonnelle, D., Pondaven, P., Morançais, M., Masse, G., Bosch, S., Jacquot, C., Briand, G., Robert, J.M., Roussakis, C., 1999. Antitumor and antiproliferative effects of an aqueous extract from the marine diatom *Haslea ostrearia* (Simonsen) against solid tumors : Lung carcinoma (NSCLC-N6), kidney carcinoma (E39) and melanoma (M96) cell lines. *Anticancer Res.* 19, 621-624.
- Costa, M.M., Prado-Alvarez, M., Gestal, C., Li, H., Roch, P., Novoa, B., Figueras, A., 2009. Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 515–523.
- Crosby, M.P., Newell, R.I.E., Langdon, J., 1990. Bacterial mediation in the utilization of carbon and nitrogen from detrital complexes by *Crassostrea virginica*. *Limnol. Oceanogr.* 35, 625-639.
- Decker, S. De, Saulnier, D., 2011. Vibriosis induced by experimental cohabitation in *Crassostrea gigas*: Evidence of early infection and down-expression of immune-related genes. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 691–699.
- Díaz-Cruz, M.S., López De Alda, M.J., Barceló D., 2003 Environmental behaviour and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends Anal. Chem.* 22, 340-351.
- Douillet P., 1993a. Bacterivory in Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 98, 123-134.
- Douillet P., 1993b. Carbon contribution through bacterivory in larvae of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 102, 303-314.

- Douillet P., Langdon C.J., 1994. Effects of marine-bacteria on the culture of axenic oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) Larvae. Biol. Bull. 184, 36-51.
- Duperthuy, M., Binesse, J., Le Roux, F., Romestand, B., Caro, A., Got, P., Givaudan, A., Mazel, D., Bachère, E., Destoumieux-Garzón, D., 2010. The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. Environ. Microbiol. 12, 951–963.
- Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzón, E., Caro, A., Rosa, R.D., Le Roux, F., Lautrédou-Audouy, N., Got, P., Romestand, B., de Lorgeril, J., Kieffer-Jaquinod, S., Bachère, E., Destoumieux-Garzón, D., 2011. Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 2993–8.
- Elston R., Leibovitz L., 1980. Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. Can.J. Fish Aquat. Sci. 37, 964-978.
- Estes, R.M., Friedman, C.S., Elston, R.A., Herwig, R.P., 2004. Pathogenicity testing of shellfish hatchery bacterial isolates on Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. Dis. Aquat. Org. 58, 223–230.
- FAO 2004-2014. Cultured Aquatic Species Information Programme *Mytilus edulis*. Cultured Aquatic Species Fact Sheets. Text by Gouletquer, P. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 1 January 2004. [Cited 23 March 2014]. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus_edulis_fr/en
- FAO Fisheries and Aquaculture Department., 2011. World aquaculture 2010. Technical Paper. No. 500/1. Rome, FAO. 105 pp.
- FAO Fisheries and Aquaculture Department., 2013. Global Production Statistics for the year 2011 [online] <ftp://ftp.fao.org/FI/news/GlobalAquacultureProductionStatistics2011.pdf>
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497–509.
- Fraser, A.J., 1989. Triacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve and crustacean larvae. Can. J. F. Aquat. Sci. 46, 1868-1873.

- Gallager, S., Mann, R., Sasaki, G., 1986. Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalve larvae. *Aquaculture* 56, 81–103.
- Gastineau, R., Pouvreau, J.-B., Hellio, C., Morançais, M., Fleurence, J., Gaudin, P., Bourgougnon, N., Mouget, J.-L., 2012. Biological activities of purified marennine, the blue pigment responsible for the greening of oysters. *J. Agric. Food Chem.* 60, 3599–605.
- Gastineau, R., Turcotte, F., Pouvreau, J.B., Morançais, M., Fleurence, J., Windarto, E., Prasetya, F.S., Arsad, S., Jaouen, P., Babin, M., Coiffard, L., Couteau, C., Bardeau, J.F., Leignel, V., Hardivillier, Y., Marcotte, I., Bourgougnon, N., Tremblay, R., Badawy, H., Pasetto, P., Davidovitch, N., Hansen, G., Dittmer, J., Mouget, J.L., 2014. Marennine-like pigments: once in a blue moon diatoms. *Mar. Drugs*. 12, 3161-3189.
- Gauthier-Clerc, S., Boily, I., Fournier, M., & Lemarchand, K., 2013. In vivo exposure of *Mytilus edulis* to living enteric bacteria : a threat for immune competency? *Environ Sci Pollut Res.* 20, 612–620.
- Gay, M., Renault, T., Pons, A.-M., Le Roux, F., 2004. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Dis. Aquat. Organ.* 62, 65–74.
- Genard, B., Pernet, F., Lemarchand, K., Boudry, P., Moraga, D., Tremblay, R., 2011. Physiological and biochemical changes associated with massive mortality events occurring in larvae of American oyster (*Crassostrea virginica*). *Aquat. Living Resour.* 24, 247–260.
- Gómez-León, J., Villamil, L., 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.
- Gruffydd, Ll.D., Beaumont, A.R., 1972. A method for rearing *Pecten maximus* larvae in the laboratory. *Mar. Biol.* 15(4), 350–355.
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith WL, Chanley MH (eds) *Culture of marine invertebrate animals*. Plenum Press, New York, pp. 29– 60.

- Harboe, T., Tuene, S., Mangor-Jensen, A., Rabben, H., Huse, I., 1994. Design and operation of an incubator for yolk-sac larvae of Atlantic halibut. *Prog. Fish-Cult.* 56 (3), 188–193.
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2004. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. FAO Fisheries Technical Paper. No. 471. Rome, FAO. 177p.
- HHS [U.S Department of Health and Human Services], 1999. Assistant Secretary for Legislation (ASL). Statement on Antimicrobial Resistance : Solutions to a Growing Public Health Threat. By David Satcher, 25 February 1999.
- Holland, D.L., 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. In: *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology*. Malins, D.C., Sargent, J.R. (ed.). London, Academic press: 85-123.
- Labreuche, Y., Lambert, C., Soudant, P., Buolo, V., Huvet, A., Nicolas, J.-L., 2006. Cellular and molecular hemocyte response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. *Microbes Infect.* 8, 2715–2724.
- Lankester, ER., 1886. On green oysters. *Quart. J. Microsc. Sci.* 26, 71-94.
- Li, H., Parisi, M.-G., Toubiana, M., Cammarata, M., Roch, P., 2008. Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses. *Fish Shellfish Immun.* 25, 143-152.
- Mateo, D. R., Siah, A., Araya, M. T., Berthe, F. C. J., Johnson, G. R., Greenwood, S. J., 2009. Differential in vivo response of soft-shell clam hemocytes against two strains of *Vibrio splendidus*: changes in cell structure, numbers and adherence. *Journal of Invertebrate Pathology.* 102, 50–6.
- Mayer, A.M.S., Hamann, M.T., 2005. Marine pharmacology in 2001 – 2002 : Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms. *Comp. Biochem. Physiol.* 140, 265–286.
- Moreau V, Tremblay R, Bourget E., 2005. Distribution of *Mytilus edulis* and *M. trossulus* on the Gaspé coast in relation to spatial scale. *J. Shellfish Res.* 24. 545–551.

- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Roch, P., 1999. Mussel defensins are synthesized and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *J. Cell Sci.* 112, 4233–4242.
- Nassiri, Y., Robert, J., Rince, Y., Ginsburger-Vogel, T., 1998. The cytoplasmic fine structure of the diatom *Haslea ostrearia* (Bacillariophyceae) in relation to marennine production. *Phycologia* 37, 84–91.
- Neuville, D., Daste, PH., 1978. Recherches sur le déterminisme de la production de marennine par la diatomée marine *Navicula ostrearia* (Gaillon) Bory en culture *in vitro*. *Rev. Gen. Bot.* 85, 255-303.
- Nicolas J.L., Corre S., Gauthier G., Robert R., Ansquer D., 1996. Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis. Aquat. Org.* 27, 67-76.
- Paillard, C., 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. *Aquat. Living Resour.* 498, 477–498.
- Parrish, C.C., 1987. Separation of aquatic lipid classes by chromarod thin-layer chromatography with measurement by iatroscan flame ionization detection. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44, 722–731.
- Parrish, C.C., 1999. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In : Arts MT, Winamac BC (eds) *Lipids in freshwater ecosystems*. Springer Verlag, New York, NY, p 4-20.
- Pernet, F., Bricelj, V.M., Cartier, S., 2006. Lipid class dynamics during larval ontogeny of sea scallops, *Placopecten magellanicus*, in relation to metamorphic success and response to antibiotics. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 329, 265–280.
- Pernet, F., Tremblay, R., Langdon, C., Bourget, E., 2004. Effect of additions of dietary triacylglycerol microspheres on growth, survival, and settlement of mussel (*Mytilus* sp.) larvae. *Mar. Biol.* 144, 693–703.
- Petton, B., Pernet, F., Robert, R., & Boudry, P., 2013. Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions.* 3, 257–273.

- Pouvreau, J., Housson, E., Tallec, L., Morançais, M., Rince, Y., Fleurence, J., Pondaven, P., 2007. Growth inhibition of several marine diatom species induced by the shading effect and allelopathic activity of marennine, a blue-green polyphenolic pigment of the diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 352, 212–225.
- Pouvreau, J.-B., Morançais, M., Fleurence, J., Pondaven, P., 2007. Method for the quantification of the blue-green pigment “marennine” synthesized by the marine diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen using HPLC gel-filtration and photodiode-array detection. *J. Appl. Phycol.* 19, 263–270.
- Pouvreau, J.-B., Morançais, M., Fleury, F., Rosa, P., Thion, L., Cahingt, B., Zal, F., Fleurence, J., Pondaven, P., 2006. Preliminary characterisation of the blue-green pigment “marennine” from the marine tythropelagic diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *J. Appl. Phycol.* 18, 757–767.
- Pouvreau, J.-B., Morançais, M., Taran, F., Rosa, P., Dufossé, L., Guérard, F., Pin, S., Fleurence, J., Pondaven, P., 2008. Antioxidant and free radical scavenging properties of marennine, a blue-green polyphenolic pigment from the diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen responsible for the natural greening of cultured oysters. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6278–86.
- Quinn, G.P., Keough, M.J., 2002. *Experimental design and data analysis for biologists*, Cambridge, Cambridge University Press. 553 p.
- Renault, T., Deuff, R.M.L.E., Cochennec, N., Maffart, P., 1993. Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France. *Comparative study. Rev. Med. Vet.* 145, 735-742.
- Robert, J.-M., 1983. Fertilité des eaux des claires ostréicoles et verdissement : utilisation de l’azote par les diatomées dominantes. Thèse de doctorat d’état, Sciences biologiques, Nantes : 281.
- Round, F.E., Crawford, R.M., Mann, D.G., 1990. *The diatoms. Biology and morphology of the genera*, Cambridge University Press : 747.
- Ruiz-Ponte C., Samain J.F., Sanchez J.L., Nicolas J.L., 1999. The benefit of a *Rosebacter* species on the survival of scallop larvae. *Mar. Biotechnol.* 1, 52-59.

- Seychelles, L.H., Doiron, K., Audet, C., Tremblay, R., Pernet, F., Lemarchand, K., 2013. Impact of arachidonic acid enrichment of live rotifer prey on bacterial communities in rotifer and larval fish cultures. *Can. J. Microbiol.* 59, 189–96.
- Simonsen, R., 1974. The diatom plankton of the Indian Ocean expedition of R/V *Meteor* 1964-1965. *Meteor Forschungsergebnisse*, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Reihe D Biologie, Gebrüder Bornträger, Berlin, Stuttgart, D19, 1-107.
- Sørum, H., 1999. Antibiotic resistance in Aquaculture. *Acta Vet. Scand. Suppl* 92, 29-36.
- Spížek, J., Novotná, J., Rezanka, T., Demain, A.L., 2010. Do we need new antibiotics? The search for new targets and new compounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37, 1241–8.
- Sugumar, G., Nakai, T., Hirata, Y., Matsubara, D., Muroga, K., 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis. Aquat. Organ.* 33, 111–8.
- Sutton D.C., Garrick R., 1993. Bacterial disease of cultured giant clam *Tridacna gigas* larvae. *Dis. Aquat. Org.* 16, 47-53.
- Tanguy, M., McKenna, P., Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Danger, J.-M., Siah, A., 2013. Functional and molecular responses in *Mytilus edulis* hemocytes exposed to bacteria, *Vibrio splendidus*. *Dev. Comp. Immunol.* 39, 419–29.
- Tardy-Laporte, C., Arnold, A.A., Genard, B., Gastineau, R., Morançais, M., Mouget, J.-L., Tremblay, R., Marcotte, I., 2012. A (2)H solid-state NMR study of the effect of antimicrobial agents on intact *Escherichia coli* without mutating. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 614–622.
- Torkildsen, L., Lambert, C., Nylund, A., 2005. Bacteria associated with early life stages of the great scallop, *Pecten maximus*: impact on larval survival. *Aquaculture International*. 13, 575–592.
- Toupoint, N. 2012. Le succès de recrutement de la moule bleue : influence de la qualité de la ressource trophique. Thèse de doctorat. Université du Québec à Rimouski, Rimouski. p.23

- Toupoint, N., Gilmore-Solomon, L., Bourque, F., 2012. Match/mismatch between the *Mytilus edulis* larval supply and seston quality: effect on recruitment. *Ecology*. 93, 1922–1934.
- Tubiash, H., Chanley, P. E., Leifson, E., 1965. Bacillary necrosis a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *J. Bacteriol.* 90, 1036–1044.
- Weber, J.T., Mintz, E.D., Cañizares, R., Semiglia, A., Gomez, I., Sempértegui, R., Dávila, A., Greene, K.D., Pühr, N.D., Cameron, D.N., 1994. Epidemic cholera in Ecuador: multidrug-resistance and transmission by water and seafood. *Epidemiol. Infect.* 112, 1–11.
- Weinstein, M., Litt, M., Kertesz, D., Wyper, P., Rose, D., Coulter, M., Low, D., 1997. Invasive infection due to a fish pathogen: *Streptococcus iniae*. *The New England Journal of Medicine*. 337, 589–594.

