

**Influence du procédé de culture et de purification sur la quantité
et la bioactivité de la marennine produite par *Haslea ostrearia***

Thèse présentée

dans le cadre du programme de doctorat en océanographie

et

dans le cadre de du doctorat en Sciences de l'Ingénierie et des Systèmes

Spécialité Génie des Procédés et des Bioprocédés

en vue de l'obtention du grade de *philosophiæ doctor* (Ph.D.)

PAR

© Elodie PEDRON

Juillet 2024

Composition du jury :

El Mahdi BENDIF, président du jury, UQAR-ISMER

Isabelle MARCOTTE, examinatrice externe, UQAM

Stéphanie BORNES, examinatrice externe, UCA

Jean-Sébastien DESCHÊNES, directeur de recherche, UQAR

Olivier GONÇALVES, directeur de recherche, Nantes Université

Réjean TREMBLAY, codirecteur de recherche, UQAR-ISMER

Anthony MASSÉ, codirecteur de recherche, Nantes Université

Dépôt initial le 10 avril 2024

Dépôt final le 22 juillet 2024

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion 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 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.

“The most damaging phrase in the language is: ‘It’s always been done that way.’” – Grace Hopper.

REMERCIEMENTS

Le doctorat est une drôle d'expérience. L'étudiant·e est seul·e à pouvoir mener son projet à terme, mais ce parcours ne peut se réaliser sans être bien entouré. Je vais donc prendre le temps, et autant de lignes que nécessaires, pour remercier celles et ceux qui m'ont accompagnée au cours de ces dernières années.

Tout d'abord, j'aimerais remercier les membres de mon jury : Isabelle Marcotte, Stéphanie Bornes, et El Medhi Bendif. Merci d'avoir accepté d'examiner mon travail et pour les discussions scientifiques que cela a engendrées. Évaluer un travail pluridisciplinaire n'est pas évident, donc merci pour le temps que vous y avez consacré.

Je souhaite également remercier mes quatre directeurs et co-directeurs de thèse : Olivier Gonçalves et Anthony Massé de Nantes Université, ainsi que Jean-Sébastien Deschênes et Réjean Tremblay de l'Université du Québec à Rimouski. La cotutelle intercontinentale était un défi que nous avons relevé ensemble malgré la distance et le décalage horaire. Dans les deux établissements, vous m'avez permis de me sentir à ma place. Vous avez su rester disponibles pour répondre à mes interrogations, m'avez donné confiance par vos encouragements, et la complémentarité de vos expertises a été un atout majeur pour mener à bien ce projet pluridisciplinaire. Merci pour cela.

Je suis reconnaissante envers le GEPEA et l'ISMER de m'avoir offert les ressources et l'environnement nécessaires à la réalisation de cette thèse. Merci au personnel administratif des deux instituts pour leur disponibilité et leur patience dans toutes les démarches complexes, qui souvent nous dépassent. Un merci tout particulier à Laurette du GEPEA pour ton énergie du matin au soir, et à Martine de l'ISMER pour ton écoute et ton soutien sans faille aux étudiant·e·s. Je remercie également le personnel technique pour leur disponibilité

et leur aide, notamment Raphaëlle, Hélène, Laurence et Delphine du GEPEA, ainsi que Nathalie et Mariame pour la production de *Haslea* et son eau bleue côté ISMER.

Un grand merci à l'IFQM, le RAQ, l'UQAR et le programme européen GHANA de m'avoir soutenue financièrement pour les différents projets, congrès et stages auxquels j'ai pu participer durant ces années de doctorat. Un merci particulier à Val Bleu, bédéiste québécoise, pour avoir illustré mon sujet et m'avoir permis d'utiliser son travail pour mes communications.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers les chercheur·euse·s qui se sont investi·e·s dans mon projet de recherche. Merci à Nesrine pour ton accompagnement au début de mon doctorat et pour être restée disponible par la suite. C'est grâce à nos échanges que j'ai pu avancer lorsque *Haslea* faisait des siennes. Merci à William pour ton aide précieuse dans la préparation et l'étude des échantillons de marennine. Ton expertise a été une base essentielle qui m'a permis d'aborder la suite de mes expérimentations avec confiance. Merci à Céline Laroche de t'être investie dans l'étude de la marennine ; tes analyses et nos échanges m'ont grandement aidée à mieux comprendre mes résultats. Merci à Marylise Duperthuy de m'avoir accueillie dans ton laboratoire à l'Université de Montréal pendant près de trois mois. Ce stage, essentiel à mes travaux de doctorat, a également été riche en rencontres. Je me suis rapidement sentie à ma place dans ce laboratoire et je remercie pour cela Annabelle, Julien et Feriel pour leur aide et leur amitié. Merci aux membres de mon comité de suivi, Souhir Marsit et Jérémy Pruvost, pour nos échanges à des moments clés du doctorat, qui ont parfois permis de débloquer des réflexions et d'autres fois de les approfondir. Merci à Jean-Luc Mouget de t'être autant investi dans mes travaux ; ton expertise sur *Haslea* a été un atout précieux pour ma réflexion, je t'en suis extrêmement reconnaissante.

Merci aux nombreux collègues étudiant·e·s aux côtés desquels j'ai eu la chance d'évoluer. Au GEPEA, je remercie la grande équipe de doctorants et postdocs : Khadija, Heng Sim, Nourhene, Jack, Fernando, Putty, Julien, Joris, Samir, Hugo, Romain, Meriem, Abdallah, Ilia, Vladimir, Sid, Christophe, Arthur, Anthony. Que ce soit au BK à bière, à la

pause-café ou le midi, mon année et demie en votre compagnie est remplie de bons souvenirs. Merci à Julie, Flora, Thomas, et Pierrick, toujours prêt·e·s à sortir les planches de surf ; votre amitié a rendu mon temps à Saint-Nazaire mémorable, et j'ai hâte de vous retrouver.

Merci aux (très) nombreux étudiant·e·s de l'ISMER et de l'UQAR, vous m'avez fait me sentir chez moi dès les premiers jours. Un merci particulier à Réjean et Nathalie pour créer une cohésion aussi forte au sein du lab' LEA, riche en expat'. Je remercie d'ailleurs particulièrement les doctorants et postdocs du lab' LEA, celles et ceux du O-262, passés et présents que j'ai pu croiser pendant 2 ans, et également les géologues cachés à l'étage du dessous. Qu'aurait été mon expérience à l'ISMER sans les baby-foots au Baro, les casse-têtes, les parties (observées) de tarot, les spikes et les débats enflammés sur les pains au chocolat. Vivre loin de ses proches n'est pas chose facile, et j'ai un très grand nombre de personnes à remercier pour avoir rendu mon temps au Québec si doux que je ne sais pas comment repartir. Merci Elisa et Alice, pour le trio infernal que nous formons. Merci à la gang de copains et copines : Schmutz, Delphine, Sarah, Candice, Nathan, Leila, Jeanne, Guillaume, Thomas, Juliette, Julie, Baptiste, Tessie, Quentin P., Quentin D., Camille G., Camille B., Alice, Valentin, Kelsey et Gwenn. Mon quotidien à vos côtés à des airs de colonie de vacances, et j'aime ça. Je remercie également la team de grimpeurs·euses pour celles et ceux que je n'ai pas encore pu citer : Mimo, Luca, Cath, Paul, Josianne, Laurent, Felix, Emma, April et j'en oublie. Grâce à vous, le Rikibloc a pu devenir le lieu où je pouvais me vider la tête et toujours repartir plus légère. Merci également à celles et ceux qui m'ont fait me sentir chez moi le temps d'un hiver à Montréal : Nao, Jérôme, des colocataires d'exception, Annabelle, Robin, et Théo.

Je souhaite également remercier les ami·e·s qui, malgré la distance, sont resté·e·s présent·e·s, et dont la rareté des moments de retrouvailles ne les rend que plus précieux. Je pense notamment à mes ami·e·s de toujours : Laurène, Eva, Audrenn, Julie, Louison, Guillaume P., Guillaume E., Morane, Pauline, Angèle, Edern, Morgane, Flora, Chloé. Depuis nos années lycées (voire bien avant pour certain·e·s) jusqu'à aujourd'hui, nous avons grandi ensemble ; votre amitié m'est précieuse et votre soutien et vos encouragements ces dernières

années ont été une source de motivation. Je souhaite également remercier les copains et copines de fac, qui malgré nos chemins différents, sont toujours là, je pense notamment à Lauriane, Jeanne, et Manon.

Enfin, je remercie chaleureusement ma famille pour leur amour et leur patience. Leur soutien inconditionnel m'a donné la force de mener à bien cette thèse. Merci d'avoir fait de votre mieux pour paraître intéressé·e·s lorsque je vous expliquais ce que je faisais, vous êtes très fort·e·s. Merci à mon parrain et ma marraine d'être resté·e·s de véritables soutiens au fil des années, et une pensée à mon filleul qui ne comprend pas encore où marraine s'en va chaque fois qu'elle disparaît pendant six mois. Merci à mes frères, Guillaume et Clément, de me supporter depuis toutes ces années ; je vous aime très fort. Pour terminer, je souhaite remercier mes parents. Sans votre soutien, votre amour, votre compréhension et vos encouragements, je n'aurais pas eu la force de me lancer dans ces études et encore moins de les terminer. Je vous aime, merci pour tout.

Je me sens tellement chanceuse d'avoir toutes ces personnes extraordinaires autour de moi ; vous êtes ma source d'inspiration pour la suite. Stay tuned, l'aventure ne fait que commencer.

AVANT-PROPOS

Ce projet, démarré en octobre 2020, a fait l'objet d'une cotutelle entre Nantes Université et l'Université du Québec à Rimouski, et a bénéficié du financement du projet européen GHaNA (The Genus Haslea, New marine resources for blue biotechnology and Aquaculture). Le financement a été partagé entre une demi-bourse ministérielle française, et un financement de l'Institut France-Québec pour la coopération scientifique en appui au secteur maritime (IFQM).

RÉSUMÉ

La marennine est un pigment bleu hydrosoluble synthétisé et externalisé par la diatomée benthique *Haslea ostrearia*. Dans un contexte de lutte pour la sécurité alimentaire, sa valorisation comme postbiotique dans les écloséries et pouponnières de bivalves apparaît comme pertinente. En effet, ce pigment de nature polysaccharidique vient se fixer sur la membrane externe des bactéries du genre *Vibrio* limitant leur pathogénicité en plus de s'accumuler au niveau des branchies des bivalves. Ces propriétés pourraient offrir un traitement actif localisé. Étant donné ses activités antibactériennes et antioxydantes, la marennine pourrait permettre de réduire localement la prolifération de souches bactériennes pathogènes chez les bivalves infectés. Pour promouvoir sa valorisation, un procédé de production fiable doit être mis en place, c'est-à-dire un procédé de culture donnant accès à des productivités stables et une approche de raffinage robuste permettant une fiabilité d'utilisation de l'extrait obtenu. Or, des incertitudes entourent encore la robustesse du procédé de culture de *Haslea* et sa capacité à fournir une production constante de marennine. De plus, de nombreuses inconnues persistent autour de l'impact du raffinage sur la qualité du pigment et ses conséquences sur ses bioactivités d'intérêt.

C'est pourquoi nous avons développé l'objectif d'étudier l'influence du procédé de production de *H. ostrearia* sur les productivités en marennine extracellulaire et ses bioactivités d'intérêt, particulièrement pour le marché de l'aquaculture. Pour ce faire, notre étude a cherché à vérifier trois hypothèses. Premièrement, l'utilisation d'un procédé de culture à membrane immergée pourrait permettre une production fiable et adaptable aux différentes souches de *Haslea*. Deuxièmement, la physiologie des diatomées, influencée par le procédé de culture, régirait finalement la variabilité de la quantité et de la qualité de la marennine produite. La troisième hypothèse supposait que des différences pouvaient être observées au niveau de bioactivités d'extraits de marennine obtenus par différentes voies de raffinage, principalement expliquées par la différence de composition de ces derniers. Pour vérifier ces hypothèses, différentes souches de *H. ostrearia* ont été cultivées à l'aide d'un procédé de culture à membrane immergée, permettant la culture en fed-batch de la biomasse microalgale tout en récoltant en semi-continu le surnageant contenant la marennine extracellulaire. Les variabilités des productivités et de la qualité des eaux bleues ont été comparées selon la souche utilisée, et en fonction de l'état de la biomasse en culture au moment de la récolte. Ensuite, l'évolution de la qualité chimique et des bioactivités de l'extrait de marennine a été suivie le long de différentes voies de raffinage.

Les résultats obtenus ont permis de définir les points clés du procédé de production engendrant une variabilité de celle-ci, et de discuter des solutions pour développer un système robuste. Par exemple, bien qu'un changement de souche de *H. ostrearia* semble induire une

fluctuation de la productivité en marennine du procédé de culture, nos résultats encouragent la poursuite des recherches sur l'optimisation des souches par des méthodes d'entraînement de celles-ci. De plus, nos résultats suggèrent de récolter l'eau bleue dès le début de la phase de croissance stationnaire de la biomasse, afin de limiter la dégradation de sa qualité pendant la culture. Enfin, une méthode de prépurification récemment développée, ajoutant en amont de la double ultrafiltration 30-3 kDa jusqu'alors utilisée, une extraction sur flocons de graphite et une gélation ionotropique, s'est avérée prometteuse, en augmentant l'efficacité antioxydante de l'extrait et en améliorant également la constance de la réponse d'inhibition bactérienne induite par la marennine.

Cette étude marque le début du développement d'un processus de production complet, prenant en considération les facteurs clés susceptibles d'influencer la production de marennine. Il est essentiel d'évaluer l'efficacité de l'extrait obtenu par la nouvelle voie de raffinage dans des environnements d'élevage tels que les écloséries et les nurseries de bivalves. Cette évaluation permettra de confirmer son efficacité et de déterminer les limites d'utilisation, contribuant ainsi à valider l'intérêt de valoriser cet extrait en aquaculture.

Mots clés : *Haslea ostrearia* ; pigment bleu naturel, marennine extracellulaire, EMn ; substances polymériques extracellulaires, EPS ; variabilité de la souche ; activité antioxydante ; activité antibactérienne ; procédé de raffinage ; membrane immergée ; procédé hybride

ABSTRACT

Marennine is a water-soluble blue pigment synthesized and externalized by the benthic diatom *Haslea ostrearia*. In the context of food safety, its use as a postbiotic in bivalve hatcheries and nurseries seems relevant. Indeed, this polysaccharide pigment reduces the pathogenicity of bacteria from the *Vibrio* genus through interaction with their external membrane. Moreover, as it accumulates in the gills of bivalves, marennine could provide a potential localized active treatment. Owing to its antibacterial and antioxidant activities, marennine can reduce the local proliferation of pathogenic bacterial strains in infected bivalves. To promote its use, a reliable production process must be put in place, *i.e.*, a cultivation process giving access to stable productivities and a robust refining approach enabling the reliable use of the obtained extract. However, uncertainties still surround the robustness of *Haslea* cultivation process and its ability to deliver consistent marennine production, just as many unknowns persist around the impact of refining on the pigment's quality and its consequences on its bioactivities of interest.

Therefore, this thesis aimed to study the influence of the production process on extracellular marennine productivity and bioactivity from the cultivation of *H. ostrearia* to the production of an extract suitable for use in aquaculture. To this end, our study sought to verify three hypotheses. First, the use of an immersed membrane culture process could enable reliable production that could be adapted to different *Haslea* strains. Second, diatom physiology, which is influenced by the culture process, ultimately governs variability in the quantity and quality of marennine produced. The last hypothesis assumed that differences could be observed in the bioactivities of marennine extracts obtained from different refining routes, mainly explained by differences in their composition. To test these hypotheses, different strains of *H. ostrearia* were cultivated using a submerged membrane culture process, enabling a fed-batch culture of the microalgal biomass while semi-continuously harvesting the supernatant containing extracellular marennine. The variability of blue water productivity and quality was compared according to the strain used and compared with the state of the biomass in culture at the time of harvesting. Next, the evolution of the chemical quality and bioactivity of the marennine extract was followed along different refining routes.

These analyses have enabled us to define the key points in the production process that lead to variability and to discuss solutions for developing a robust system. For example, although a change in *H. ostrearia* strain appears to induce a fluctuation in marennine productivity, our results encourage further research into strain optimization using strain training methods. In addition, our results encourage the harvesting of blue water early in the stationary growth phase of the biomass to limit the degradation of its quality during cultivation. Finally, a recently developed prepurification method, adding carbon flake

extraction and ionotropic gelation upstream of the hitherto used 30–3 kDa double ultrafiltration, has shown promise in increasing the antioxidant efficiency of the extract and improving the consistency of the marennine-induced bacterial inhibition response.

This study marks the start of the development of a complete production process, considering the key factors likely to influence marennine production. It is essential to evaluate the effectiveness of the extract obtained from the new refining route in rearing environments such as hatcheries and bivalve nurseries. This evaluation will confirm its efficacy and determine the limits of its use, thus helping to validate the value of using this extract in aquaculture.

Keywords: *Haslea ostrearia*; Natural blue pigment, Extracellular marennine; extracellular polymeric substances EPS ; Strain variability ; antibacterial activity; antioxidant activity; refining process; Submerged membrane; Hybrid process

LISTE DES COMMUNICATIONS

Publications internationales dans des revues à comité de lecture

Pedron, E., Gargouch, N., Mouget, J.-L., Tremblay, R., Deschênes, J.-S., Massé, A., Gonçalves, O., 2023. Hybrid photobioreactor operation for the intensified production of *Haslea ostrearia* and marennine in function of strain variability. *Algal Research* 75, 103285. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103285>

Pedron, E., Duperthuy, M., Mathieu-Denoncourt, A., Laroche, C., Gonçalves, O., Massé, A., Tremblay, R., Deschênes, J.-S. (en préparation pour soumission). Changes in blue pigment extract in a fed-batch culture of different *Haslea ostrearia* strains.

Pedron, E., Mouget, J.-L., Duperthuy M., Mathieu-Denoncourt, A., Laroche, C., Tremblay, R., Deschênes, J.-S., Gonçalves, O., Massé, A. (en préparation pour soumission). Temporal variation of blue pigment extract production and quality in a fed-batch culture of *Haslea ostrearia*.

Pedron, E., Duperthuy, M., Mathieu-Denoncourt, A., Laroche, C., Bélanger, W., Gonçalves, O., Massé, A., Deschênes, J.-S., Tremblay, R. (en préparation pour soumission). Comprehensive quality analyses of benthic diatom blue pigment extract as postbiotic in aquaculture.

Communications orales et posters

Pedron, E. Tremblay, R., Deschênes, J.S., Goncalves, O, Massé, A. 2021. Membrane-Photobioreactor for simultaneous and in-situ cultivation and extraction of respectively *Haslea ostrearia* and marennine. Young Algaeneers Symposium. En ligne, 10-11-12 mai, 2021. (Poster)

Pedron, E. Tremblay, R., Deschênes, J.S., Goncalves, O, Massé, A. 2022. Culture d'*Haslea ostrearia* et production de marennine en photobioréacteur à membrane immergée : robustesse du procédé de culture face à la variabilité biologique. 89e congrès de l'ACFAS (Association canadienne française pour l'avancement des sciences). Symposium : Pour un développement durable et inclusif des ressources aquatiques du Québec. Québec, Canada, 9-13 mai 2022. (Communication orale)

Pedron, E., Tremblay, R., Deschênes, J.S., Goncalves, O., Massé, A. 2022. Marennine production in submerged membrane photobioreactor: robustness of a hybrid culture process. GHANA project Final meeting. Szczecin, Pologne, 19-21 mai, 2022. (Communication orale)

Pedron, E., Goncalves, O., Massé, A., Deschênes, J.S., Tremblay, R. 2022. Culture d'*Haslea* et production de marennine en photobioréacteur à membrane immergée. Réunion annuelle du réseau Ressources Aquatiques Québec, Québec, 7-9 novembre 2022. (Communication orale)

Pedron, E., Gargouch, N., Deschênes, J.S., Tremblay, R., Mouget, J.L., Pruvost, J., Massé, A., Goncalves, O. 2023. Le bioraffinage de microalgues : exemple de la valorisation du milieu de culture. Colloque des journées scientifiques de Nantes université, Les Journées thématiques du Club Français des Membranes. Nantes, France, 5 juin 2023. (Communication orale)

Chehour, M., **Pedron, E.**, Genard, B., Deschênes, J.S., Tremblay, R. 2023. Biochemical composition of *Haslea ostrearia* during marennine externalization. International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts. Waikoloa Beach, Hawai'i, USA, 12-14 juin 2023. (Poster)

Pedron, E., Gargouch, N., Tremblay, R., Deschênes, J.S., Massé, A., Goncalves, O. 2023. *Haslea ostrearia* culture and marennine production: Immersed membrane photobioreactor robustness towards biological variability. International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts. Waikoloa Beach, Hawai'i, USA, 12-14 juin 2023. (Communication orale)

Pedron, E., Duperthuy, M., Mathieu-Denoncourt, A., Bélanger, W., Goncalves, O., Massé, A., Tremblay, R., Deschênes, J.S. 2023. Étude des activités antibactériennes de la Marennine, pigment bleu produit par *Haslea ostrearia*. Réunion annuelle du réseau Ressources Aquatiques Québec. Québec, Canada, 6-8 novembre 2023. (Communication orale)

Pedron, E., Duperthuy, M., Mathieu-Denoncourt, A., Bélanger, W., Laroche, C., Goncalves, O., Massé, A., Tremblay, R., Deschênes, J.S. 2024. Comprehensive quality analyses of benthic diatom blue pigment extract as postbiotic in aquaculture. Aquaculture Canada Conference and tradeshow. Charlottetown, Prince Edward Island, Canada, 16-19 juin 2024

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-------|
| REMERCIEMENTS..... | ix |
| AVANT-PROPOS..... | xiii |
| RÉSUMÉ..... | xv |
| ABSTRACT..... | xvii |
| LISTE DES COMMUNICATIONS..... | xix |
| TABLE DES MATIÈRES..... | xxi |
| LISTE DES TABLEAUX..... | xxv |
| LISTE DES FIGURES..... | xxxix |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES..... | xxxix |
| INTRODUCTION GÉNÉRALE..... | 1 |
| 1. MISE EN CONTEXTE..... | 1 |
| 2. <i>HASLEA OSTREARIA</i> – DIATOMÉE BLEUE..... | 3 |
| 2.1 Origine..... | 3 |
| 2.2 Répartition..... | 4 |
| 2.3 Cytologie..... | 7 |
| 2.4 Métabolisme optimisé pour la fixation du carbone inorganique..... | 9 |
| 2.5 Développement cyclique..... | 12 |
| 2.6 Valorisation de <i>Haslea ostrearia</i> | 18 |
| 3. LA MARENNINE..... | 21 |
| 3.1 Nature..... | 21 |
| 3.2 Biosynthèse et devenir de la marennine..... | 24 |
| 3.3 Activités biologiques de la marennine et rôles supposés pour <i>Haslea ostrearia</i> | 27 |
| 3.4 Valorisation de la marennine..... | 28 |
| 4. LE DÉFI DE LA PRODUCTION DE MARENNINE..... | 30 |
| 4.1 Culture de <i>Haslea</i> et production de marennine..... | 30 |
| 4.2 Impact du système de culture et du raffinage sur la qualité des composés..... | 38 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 5. | CONCLUSION ET OBJECTIFS DE LA RECHERCHE..... | 50 |
| | CHAPITRE 1 Matériel et méthodes..... | 55 |
| 1.1 | CULTURE DE <i>HASLEA OSTREARIA</i> ET PRODUCTION DE MARENNINE | 55 |
| | 1.1.1 Les souches de <i>Haslea ostrearia</i> | 55 |
| | 1.1.2 Les milieux de culture..... | 55 |
| | 1.1.3 Les systèmes de culture | 56 |
| 1.2 | OBTENTIONS DES EXTRAITS DE MARENNINE (EAU BLEUE)..... | 60 |
| | 1.2.1 Préparation des extraits de marennine produits en MPBR | 60 |
| | 1.2.2 Préparation des extraits de marennine produits en PBR..... | 61 |
| 1.3 | METHODES ANALYTIQUES | 64 |
| | 1.3.1 Suivi de culture | 64 |
| | 1.3.2 Mesure des bioactivités..... | 73 |
| | 1.3.3 Caractérisation chimique des extraits de marennine..... | 81 |
| 1.4 | ANALYSES STATISTIQUES | 83 |
| | CHAPITRE 2 Impact du changement de souche de <i>Haslea ostrearia</i> sur la production de marennine en photobioréacteur à membrane immergée..... | 87 |
| 2.1 | RESUME..... | 89 |
| 2.2 | HYBRID PHOTOBIOREACTOR OPERATION FOR THE INTENSIFIED PRODUCTION OF <i>HASLEA OSTREARIA</i> AND MARENNINE IN FUNCTION OF STRAIN VARIABILITY | 91 |
| | 2.2.1 Introduction..... | 92 |
| | 2.2.2 Material and methods..... | 95 |
| | 2.2.3 Results..... | 100 |
| | 2.2.4 Discussion | 106 |
| | 2.2.5 Conclusion and perspectives..... | 112 |
| 2.3 | CHANGES IN BLUE PIGMENT EXTRACT IN A FED-BATCH CULTURE OF DIFFERENT <i>HASLEA OSTREARIA</i> STRAINS. | 114 |
| | 2.3.1 Introduction..... | 115 |
| | 2.3.2 Materials and methods | 117 |
| | 2.3.3 Results..... | 122 |
| | 2.3.4 Discussion | 125 |
| 2.4 | SUPPLEMENTARY MATERIALS..... | 129 |

| | | |
|--|--|-----|
| 2.4.1 | Hybrid photobioreactor operation for the intensified production of <i>Haslea ostrearia</i> and marennine in function of strain variability | 129 |
| 2.4.2 | Changes in blue pigment extract quality in a fed-batch culture of different <i>Haslea ostrearia</i> strains..... | 136 |
| CHAPITRE 3 Évolution temporelle de la production et de la qualité d'extrait de pigment bleu d'une culture fed-batch de <i>Haslea ostrearia</i> | | |
| 3.1 | RESUME | 142 |
| 3.2 | TEMPORAL VARIATION OF BLUE PIGMENT EXTRACT PRODUCTION AND QUALITY IN A FED-BATCH CULTURE OF <i>HASLEA OSTREARIA</i> | 143 |
| 3.2.1 | Introduction | 146 |
| 3.2.2 | Materials and methods..... | 148 |
| 3.2.3 | Results | 158 |
| 3.2.4 | Discussion..... | 166 |
| 3.2.5 | Conclusion..... | 172 |
| 3.3 | SUPPLEMENTARY MATERIALS: TEMPORAL VARIATION OF BLUE PIGMENT EXTRACT PRODUCTION AND QUALITY IN A FED-BATCH CULTURE OF <i>HASLEA OSTREARIA</i> | 174 |
| CHAPITRE 4 Étude approfondie de la qualité de l'extrait de marennine comme postbiotique en aquaculture | | |
| 4.1 | RESUME | 182 |
| 4.2 | COMPREHENSIVE QUALITY ANALYSES OF BENTHIC DIATOM BLUE PIGMENT EXTRACT AS POSTBIOTIC IN AQUACULTURE. | 183 |
| 4.2.1 | Introduction | 185 |
| 4.2.2 | Materials and methods..... | 188 |
| 4.2.3 | Results | 196 |
| 4.2.4 | Discussion..... | 207 |
| 4.2.5 | Conclusion and perspectives | 214 |
| 4.3 | SUPPLEMENTARY MATERIALS: COMPREHENSIVE QUALITY ANALYSES OF BENTHIC DIATOM BLUE PIGMENT EXTRACT AS POSTBIOTIC IN AQUACULTURE..... | 216 |
| CONCLUSION GÉNÉRALE..... | | |
| 1. | RAPPEL DE LA PROBLEMATIQUE ET ORIGINALITE DE L'ETUDE..... | 227 |
| 2. | APPORT DE L'ETUDE | 228 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 2.1 | Variabilité biologique et conséquences sur les productivités en marennine par <i>Haslea ostrearia</i> | 228 |
| 2.2 | Importance du procédé de raffinage dans la production d'un extrait de marennine de qualité fiable | 231 |
| 3. | MISE EN PERSPECTIVE | 234 |
| 4. | CONCLUSIONS ET SUITES DE L'ETUDE..... | 237 |
| | RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 241 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| <p>Tableau 1 : Ratios d'absorbance des longueurs d'onde (nm) caractéristiques de la marennine. Comparaison des extraits de marennine obtenus par double ultrafiltration (UF30-3 kDa), précédé d'une extraction sur phase solide et d'une gélotion ionotropique comme proposé par Bélanger <i>et al.</i> (2020) (SPE-GCB-UF), ou suivi d'une purification par chromatographie anionique (UF-AE) comme proposé Pouvreau <i>et al.</i> (2006b). (adapté de Bélanger <i>et al.</i>, 2020)</p> | 36 |
| <p>Tableau 2 : Résumé des différentes études menées sur la bioactivité de la marennine extracellulaire. Sont précisés la souche de <i>Haslea spp.</i> utilisée, lorsque celle-ci est connue, le système de culture utilisé pour la production, la méthode de raffinage utilisée pour préparer l'extrait. Avec BW, le surnageant de culture filtré à 0,20 μm ; CS, le surnageant de culture BW concentré d'après la méthode de Falaise <i>et al.</i> (2020) ; UF30-3, le surnageant de culture BW concentré par ultrafiltration à 30 kDa et dialysé par diafiltration à 3 kDa ; AE, l'extrait de marennine extracellulaire purifié d'après le protocole de Pouvreau <i>et al.</i> (2006b).....</p> | 37 |
| <p>Tableau 3 : Résumé des méthodes de raffinage des polysaccharides naturels (adapté de Ren <i>et al.</i>, 2019)</p> | 46 |
| <p>Tableau 4 : Méthodes utilisées pour l'étude de la structure primaire des polysaccharides (adapté de Ren <i>et al.</i>, 2019).....</p> | 49 |
| <p>Tableau 5 : Ratios pigmentaires retrouvés chez trois souches de <i>H. ostrearia</i> cultivées dans le même environnement lumineux, au cours de la phase stationnaire d'une culture en MPBR. CarT correspond à la concentration en caroténoïdes totaux mesurée dans la biomasse, et Chl_{a+c} correspond à la mesure de la concentration en chlorophylle <i>a</i> et <i>c</i> de la biomasse.....</p> | 230 |
| <p>Table 2.1 : Biometric profiles of <i>H. ostrearia</i> strains cultivated in MPBR. Strains are defined by cell length (μm), cellular biovolume B_v (μm^3), total pigment specific content $P_{\text{spe initial}}^T$ ($\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$), when cultivated in MPBR ($D=0.1 \text{ d}^{-1}$, ES 1/3+Si). The results are expressed as the mean \pm standard deviation of $n \geq 3$ values measured at the beginning of the culture. Different letters indicate significant group difference (ANOVA, LSD ; $p < 0.05$, $R^2_{\text{cell length}} =$</p> | |

0.99, $R^2_{Bv}=0.92$, $R^2_{p^T}=0.91$, Annex 1, Table S 1). (*) marks the value for which only a prevision was available 102

Table 2.2: Calculated parameters of four cultures of *H. ostrearia* using three different strains (NCC553, NCC531, NCC529) in MPBR ($d=0.01\text{ d}^{-1}$, ES 1/3+Si). Maximal growth rate (μ_{max} , d^{-1}), and late exponential day (LED, d) retrieved from the Gompertz model, biovolume of cells reached during the stationary phase ($10^{12}\text{ }\mu\text{m}^3\text{ L}^{-1}$), total pigment specific content P^T_{spe} ($\mu\text{g } 10^6\text{ cell}^{-1}$), EMn volumetric productivity (P_v , $\text{mg}_{EMn}\text{ L}^{-1}\text{ d}^{-1}$), EMn specific productivity (P_s , $\text{mg}_{EMn}\text{ } 10^9\text{ cell}^{-1}\text{ d}^{-1}$) and EMn biovolumetric productivity P_b ($\text{fg}_{EMn}\text{ }\mu\text{m}^{-3}\text{ d}^{-1}$). The results are expressed as the mean \pm standard deviation of $n \geq 3$ values measured during the stationary phase of culture. Different letters indicate significant group difference (ANOVA, LSD; $p < 0.05$, $R^2_{[Bv]}= 0.99$, $R^2_{Pt}= 0.97$, $R^2_{Pv} = 0.97$, $R^2_{Ps} = 0.98$, $R^2_{Pb} = 0.99$, Annex 1, Table S 1)..... 105

Table 3.1 : Preconcentration ultrafiltration of the culture supernatant (Blue Water; BW), over a 3-kDa membrane, using an AMICON cell ($P = 1.5\text{bar}$, stirring = 250 rpm). VRF volumetric reduction factor during ultrafiltration of BW on a 3-kDa cutoff membrane, CF_{EMn} , concentration factor of EMn according to the maximum absorbance in the visible spectra of the solution. ... 163

Table 4.1: UV-Vis bands and absorbance ratios of the different blue water extracts . EMn corresponds to the purified extract of reference, as proposed by Pouvreau *et al.* (2006a)..... 201

Table 4.2: ATR-FTIR characteristic bands and assignments referring to the bands shown on Figure 4.5. 204

| | |
|--|-----|
| Table S 1: Results of the one-way analysis of variance (ANOVA) on the effect of “culture” on the initial biometric profiles of the inoculum, illustrated by the parameters: cell length (μm), biovolume of the cells (μm^3), total pigment specific content $P_{\text{spe}}^{\text{T initial}}$ ($\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$). Results of the ANOVA on the effect of “culture” on parameters obtained during stationary phase of cultures : cell density (N , 10^6 cell L^{-1}), EMn concentration (mg L^{-1}), maximal growth rate (μ_{max} , d^{-1}), late exponential day (LED, d), biovolume of cell ($10^{12} \mu\text{m}^3 \text{ L}^{-1}$), total pigment specific content $P_{\text{spe}}^{\text{T}}$ ($\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$), EMn volumetric productivities (P_v , $\text{mg}_{\text{EMn}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), EMn specific productivities (P_s , $\text{mg}_{\text{EMn}} 10^9 \text{ cell}^{-1} \text{ d}^{-1}$) and EMn biovolumetric productivities P_b ($\text{fg}_{\text{EMn}} \mu\text{m}^{-3} \text{ d}^{-1}$). Significant differences at $p < 0.05$ are in bold and indicated by *. DF = degrees of freedom, SS = Sum-of-squares, MS = Mean squares, F = Fratio, P = p-values. Model : $Y = \text{moyenne}(Y)$ | 129 |
| Table S 2: Results of the linear regression between pigment specific content of cells at the beginning of the culture ($P_{\text{spe}}^{\text{T initial}}$ ($\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$)) and cell length (μm). Significant differences at $p < 0.05$ are in bold and indicated by *. T = t-value, P = p-values..... | 131 |
| Table S 3: Results of the linear regression between pigment specific content of cells during the stationary phase of the culture ($P_{\text{spe}}^{\text{T}}$ ($\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$)) and cell length (μm). Significant differences at $p < 0.05$ are in bold and indicated by *. SE = standard error, T = t-value, P = p-value. | 131 |
| Table S 4: Results of the linear regression between cell biovolume (B_v (μm^3)) and specific EMn productivities (P_s ($\text{mg}_{\text{EMn}} 10^9 \text{ cell}^{-1} \text{ d}^{-1}$)) observed during stationary phase of the culture. Significant differences at $p < 0.05$ are in bold and indicated by *. SE = standard error, T = t-value, P = p-value..... | 132 |
| Table S 5: Specific pigment composition ($P_{\text{spe}}^{\text{T}}$, $\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}$) measured during the three cultures of <i>H. ostrearia</i> using two different strains (NCC553, NCC531) in MPBR ($d=0.01 \text{ d}^{-1}$, ES 1/3+Si). The results are expressed as the mean \pm standard deviation of $n \geq 3$ values measured during the stationary phase of culture..... | 135 |
| Table S 6 : Marennine extracts concentration inducing 20% (IC20) of <i>V. splendidus</i> 4D1-8 growth inhibition. IC20 are expressed in EMn concentration ($\text{mg}_{\text{EMn}} \text{ L}^{-1}$) according to the chromophore absorbance of each extract. Results are expressed as mean \pm sd ($n=3$). Different letters indicate significant group difference. ($\text{IC20}_{4\text{D1-8}}$ $\text{mg}_{\text{EMn}} \text{ L}^{-1}$, ANOVA, $p=0,783$; $\text{IC20}_{\text{DPPH}}$ $\text{mg}_{\text{EMn}} \text{ L}^{-1}$ ANCOVA , $P = 0,004$)..... | 136 |
| Table S 7 : Results of the one-way analysis of variance (ANOVA) on the effect of <i>H. ostrearia</i> strains on the EMn concentration enabling a 20% growth inhibition of <i>V. splendidus</i> 4D1-8 ($\text{IC20 } \text{mg}_{\text{EMn}} \text{ L}^{-1}$) | 136 |

| | |
|--|-----|
| Table S 8 : Results of the one-way analysis of co-variance (ANCOVA) on the effect of <i>H. ostrearia</i> strains on DPPH radical scavenging (I_{DPPH} , %) taking into account the effect of the concentration of EMn ($[\text{EMn}]$, $\text{mg}_{\text{EMn}} \text{L}^{-1}$) on the scavenging response. | 137 |
| Table S 9 : Results of the post-hoc analysis, comparing, with a confident interval of 95%, the slope of the different linear dose-response of the DPPH radical scavenging test..... | 137 |
| Table S 10 : UV-Visible bands and their absorbance as observed on Figure 2.5a | 137 |
| Table S 11 : ATR-FTIR characteristic bands and assignments describing spectra on Figure 2.5b. | 138 |
| Table S 12: Parameters of Gompertz modelling of <i>H. ostrearia</i> NCC 531 fitting the biomass proxy in function of time. Two biomass proxies were used: cell concentration (N , 10^6 cell L^{-1} , with initial $N = 100 \cdot 10^6 \text{ cell L}^{-1}$), estimated by cell count ($n=3$), and chlorophyll a concentration ($[\text{Chl}_a]$, ng L^{-1} , with initial $[\text{Chl}_a]= 244 \text{ ng L}^{-1}$) ($n=3$). K (d^{-1}), slope of the exponential growth phase, corresponds to the growth rate. X_c (d), corresponds to the mid-exponential phase. Data set used to model <i>H. ostrearia</i> growth resulted from daily measurements realised in triplicate ($n=3$) before and after culture homogenisation, to sample the pelagic phase (pelagic) and total biomass (total). $R^2_{N \text{ total}}=0.99$; $R^2_{N \text{ pelagic}}=0.98$; $R^2_{[\text{Chl}_a] \text{ total}}=0.99$; $R^2_{[\text{Chl}_a] \text{ pelagic}}=0.97$, all values are presented as estimate \pm standard error..... | 175 |
| Table S 13: Physiological parameters measured during <i>H. ostrearia</i> NCC 531 culture in MPBR ($d=0.1 \text{ d}^{-1}$), ANOVA results are displayed beneath the result table. When significant differences were observed Fisher's LSD was used as a post-hoc test, LSD values are added to the ANOVA table. | 176 |
| Table S 14 : Band assignments for the ATR-FTIR spectra of marennine extracts (Figure 3.4a) produced by <i>H. ostrearia</i> NCC531 MPBR culture. The extracts correspond to the blue water intermediate fraction obtained by double ultrafiltration and diafiltration at 30 and 3kDa cut off respectively, as proposed by Pouvreau <i>et al.</i> (2006b) | 176 |
| Table S 15 : Results of the one-way analysis of variance (ANOVA) on the effect of "BW lot" on EMn concentration enabling a 20% growth inhibition of <i>V. splendidus</i> 4D1-8 ($\text{IC}_{20} \text{ mg}_{\text{EMn}} \text{L}^{-1}$) and the post-hoc Fisher'SD test (LSD = 0.623). (Figure 3.5a) | 178 |
| Table S 16 : Summary of the ANCOVA realised on the linear curve response curve of DPPH (Figure 3.5b) and summary of the individual linear dose-response curve. Residual error: 2.541, $\text{DF} = 3$, $R^2=0.97$ | 178 |

| | |
|--|-----|
| Table S 17 : Nitrate and Phosphate dosage using ionic chromatography, and phosphore and silicium dosage using ICP-AES. Dosage was effectuated on culture medium permeate after biomass was removed by filtration (0.05µm cutoff) and EMn was removed by ultrafiltration (3 kDa cutoff)..... | 178 |
| Table S 18 : Marennine extracts concentration inducing 20 (IC20) or 50% (IC50) of DPPH scavenging. Both IC20 and IC50 are expressed in mass concentrations (mg L ⁻¹) and its equivalent absorbance (a.u.) according to the chromophore maximal absorbance of each extract. Results are expressed as mean ± sd (n=3). Different letters indicate significant group difference (ANOVA, LSD; p < 0.05, R ² _{Abs50} = 0.72, R ² _{IC50} =0.69, R ² _{Abs20} =0.95, R ² _{IC20} =0,98). ANOVA and Fisher LSD results are detailed beneath the results table..... | 217 |
| Table S 19 : Marennine extracts concentration inducing 20 (IC20) or 50% (IC50) of <i>V. splendidus</i> growth inhibition after 24h of exposition. Both IC20 and IC50 are expressed in mass concentrations (mg L ⁻¹) and in equivalent absorptivity (a.u.) according to the maximal absorbance of each extract. Results are expressed as median ± sd (conclusive n) (n=3)..... | 223 |
| Table S 20 : Median growth inhibition response of <i>V. splendidus</i> strains to exposition to marennine-containing extracts. | 224 |
| Table S 21: Results of one-way ANOVA et Fisher's LSD test on carbohydrate content (mg _{eq.Glucose} mg _{DW} ⁻¹) of the different marennine extracts. | 224 |
| Table S 22: One way ANOVA and Fisher's LSD test on composition ratio (mg _{EMn} mg _{eq.Glucose} ⁻¹) of the different marennine extracts. | 225 |

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Évolution de la production alimentaire provenant de la pêche et de l'aquaculture depuis 1950 (adaptée du rapport FAO, 2022).....1
- Figure 2 : *Haslea ostrearia* et le verdissement des huîtres dans les claires ostréicoles de Marennes-Oléron. (a) Photographie aérienne montrant les claires ostréicoles de Marennes Oléron (adaptée de Falaise, 2019); (b) représentation schématique en vue transversale d'une claire ostréicole (adaptée de Robert, 1973)5
- Figure 3 : Schéma montrant les différentes parties l'épithèque et de l'hypothèque formant le frustule des diatomées pennées. E : épivalve, EC : épicingulum, HC : hypocingulum, H : hypovalve, R : raphé, St : stries (extrait de Sabater, 2009 initialement adapté de Round *et al.*, 1990).....7
- Figure 4 : Observations au microscope électronique à balayage (MEB) du frustule de *H. ostrearia*. E, vue externe d'une valve nettoyée, montrant les stries parallèles longitudinales ; F, vue interne d'une valve nettoyée de la culture, montrant les stries transapicales croisées à angle droit par des stries longitudinales plus denses ; G, vue externe du centre de la valve montrant les stries longitudinales, les terminaisons du raphé étroitement espacées et l'absence de zones distinctes ; H, vue interne du centre de la valve, montrant le motif de stries croisées et la costa axiale surélevée bordant seulement un côté du raphé ; I, vue externe de l'apex de la valve montrant chaque strie périphérique fusionnant au-delà de la zone terminale à l'apex ; J, vue interne de l'apex de la valve montrant les deux motifs de stries, la costa axiale et l'helictoglossa. Barres d'échelle : E = 5 µm ; F = 10 µm ; G-J = 1 µm (extraites de Poulin et Méléder, 2019).8
- Figure 5 : Observation au microscope optique de *H. ostrearia*, montrant les principaux éléments de sa structure (extraite de Nghiem-Xuan, 2019).9
- Figure 6 : Adaptation des diatomées à leur environnement lumineux. (a) Spectre d'irradiance montrant les longueurs d'onde accessibles selon l'environnement terrestre ou aquatique (extrait de Ghobara *et al.*, 2019) mis en parallèle avec (b) le spectre d'absorbance des cellules de diatomées (extrait de Tanabe *et al.*, 2020). 11
- Figure 7 : Cycle de vie monogénétique diplophasique des diatomées pennées (adapté de Falaise, 2019) 13
- Figure 8 : Schéma résumant le cycle tychopélagique de *H. ostrearia* et l'évolution de l'état des cellules au cours de celui-ci. Les différents organismes présents

| | |
|--|----|
| sur le schéma ne sont pas à l'échelle (d'après Nassiri <i>et al.</i> , 1998 et Robert, 1973)..... | 15 |
| Figure 9 : Spectres d'absorbance de la marennine intracellulaire (IMn) et extracellulaire (EMn). (a) Spectres d'absorbance UV-Visible de la marennine intracellulaire et extracellulaire purifiée, montrant les différentes bandes caractéristiques de l'IMn et de l'EMn (extrait de Pouvreau, 2006) ; (b) spectres d'absorbance de l'EMn selon son stade d'oxydation. EMnox : stade oxydé, EMni : stade intermédiaire, EMnred : stade réduit de l'EMn, les flèches numérotées indiquent l'enchaînement des stades lors d'une réaction d'oxydoréduction (extrait de Francezon <i>et al.</i> , 2021)..... | 21 |
| Figure 10 : Profil de polydispersion de la marennine. Histogramme de répartition (%) du poids moléculaire de la marennine (extrait de Vandanjon <i>et al.</i> 1999)..... | 23 |
| Figure 11 : Observation au microscope optique d'une vésicule chargée en marennine (en bas à gauche) retrouvée dans le milieu de culture après son externalisation d'une cellule de <i>H. ostrearia</i> . Barre d'échelle = 15 μm | 24 |
| Figure 12 : Impact de l'intensité lumineuse sur l'assimilation du carbone inorganique par <i>H. ostrearia</i> , et lien avec sa production de marennine. Une faible intensité lumineuse (c.-à-d. 25 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$) n'entraîne pas de production de marennine, tandis qu'une forte intensité lumineuse (c.-à-d. 350 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$) entraîne un bleuissement des cellules, donc une production et une accumulation de marennine intracellulaire (extrait de Rech, 2004)..... | 25 |
| Figure 13 : Evolution des procédés de culture mis en place pour optimiser la culture de <i>H. ostrearia</i> . Les différents procédés, bassin, photobioréacteur (PBR) ou photobioréacteur à membrane immergée (MPBR), et leurs modes de fonctionnement sont associés à leurs productivités volumétriques maximales en marennine extracellulaire (P_{vMAX}) (adaptée de Nghiem Xuan, 2019)..... | 31 |
| Figure 14 : Niveau de pureté de l'extrait de marennine au cours de son raffinage selon le protocole de Pouvreau, <i>et al.</i> 2006. Chromatogrammes de suivi par spectrophotométrie de l'élution sur gel HPLC de la marennine à plusieurs étapes de son raffinage. Le suivi est effectué à 280 nm (ligne) et à 674 nm (pointillé) sur l'eau bleue (BW), avant et après une ultrafiltration au seuil de coupure de 30 kDa (BW UF< 30 kDa), une diafiltration sur une membrane de seuil de coupure de 3 kDa (BW UF-30-3), puis une purification par chromatographie à échange d'anions (EMn) (adapté de Pouvreau <i>et al.</i> 2006)..... | 34 |

| | |
|---|----|
| Figure 15 : Niveau de pureté de l'extrait de marennine avant et après raffinage selon le procédé d'obtention d'une solution aqueuse enrichie en pigment bleu (FR3089231A1). Chromatogramme d'élution d'une chromatographie d'exclusion de taille (SEC-HPLC) d'une solution aqueuse enrichie en pigment bleu de type marennine (MCPN) obtenue selon le procédé d'invention de Falaise <i>et al.</i> (2020) et d'une eau bleue (BW) (adapté de Falaise <i>et al.</i> (2020))..... | 35 |
| Figure 16 : Forces intra et intermoléculaires retrouvées dans les mélanges de polysaccharides. (a) Liaisons covalentes, (b) réticulations ou liaisons ioniques, (c) interactions électrostatiques, (d) interactions hydrophobes (adaptée de Miao <i>et al.</i> , 2018)..... | 44 |
| Figure 17 : Analyse de la structure primaire des polysaccharides (adaptée de Ren <i>et al.</i> 2019). Les différentes approches utilisées pour élucider la structure primaire des polysaccharides sont illustrées ci-dessus et détaillées dans le Tableau 4..... | 48 |
| Figure 1.1 : Culture de <i>H. ostrearia</i> en photobioréacteur à membrane immergée (MPBR). La culture de <i>H. ostrearia</i> est menée en mode fed-batch à volume constant et la récolte du surnageant de culture (eau bleue) est réalisée en semi-continu. Le schéma résume le montage du MPBR, et une frise temporelle résume la chronologie d'une journée type de culture (adaptée de Gargouch <i>et al.</i> , 2022) créé avec BioRender.com..... | 57 |
| Figure 1.2 : Photobioréacteur (30 L) utilisé pour la culture de <i>H. ostrearia</i> en mode semi-continu (d'après Prasetya <i>et al.</i> , 2022) | 60 |
| Figure 1.3 : Protocole d'ultrafiltration suivi pour les eaux bleues produit en MPBR. Protocole de raffinage utilisant une cellule AMICON ® de 400 mL, et diafiltration réalisée à l'eau nanopure (basé sur le protocole de Pouvreau <i>et al.</i> 2006) créé avec BioRender.com. | 60 |
| Figure 1.4 : Raffinage de l'eau bleue par extraction sur phase solide (SPE), combinée à une gélation ionotropique suivi d'une double ultrafiltration (d'après le protocole de Bélanger <i>et al. soumis</i>) créé avec BioRender.com..... | 62 |
| Figure 1.5 : Chambre de comptage d'une cellule de Nageotte. La chambre de comptage est séparée par des gravures en 40 bandes correspondant chacune à un volume de 1,25 µL..... | 65 |
| Figure 1.6 : Tracé théorique de la fluorescence émise par le photosystème II face au protocole d'irradiance du fluorimètre PAM (adapté de Consalvey <i>et al.</i> , 2005)..... | 68 |

| | |
|---|-----|
| Figure 1.7 : Simplification de la structure des diatomées pennées permettant le calcul du biovolume des cellules (adaptée de Hillebrand <i>et al.</i> , 1999). a correspond à la longueur, b la largeur, c la hauteur des cellules..... | 71 |
| Figure 1.8 : Réaction de réduction du radical DPPH par un agent antioxydant. La réduction du radical 1,1-Diphenyl-2-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazine (DPPH) entraîne une décoloration de la solution, permettant d'évaluer les capacités de piégeage de radical oxydant d'une molécule antioxydante par suivi spectrophotométrique à la longueur d'onde 517 nm. (adaptée du manuel technique d'utilisation du kit DPPH, Dojindo)..... | 74 |
| Figure 1.9 : Schéma illustrant le protocole suivi pour l'analyse de l'activité antibactérienne des extraits de marennine sur différents souches de <i>V. splendidus</i> . MIC: Concentration Minimum d'inhibition. Les bactéries ne se développent plus en présence du composé testé, mais leur croissance reprend après remise en culture sur gel d'agar. MBC: Concentration Bactéricide Minimum. Les bactéries ne se développent pas en présence de l'extrait testé, et leur croissance ne reprend pas une fois remises en culture sur gel d'agar (créé avec BioRender.com). | 80 |
| Figure 2.1: Microscopic pictures of the four inocula of <i>H. ostrearia</i> strains used for culture A to D. Cells sampled at the beginning of each culture and observed using light microscopy or detailed otherwise. Scale bar corresponds to 10 μm | 101 |
| Figure 2.2: Growth curve measured for <i>H. ostrearia</i> using Gompertz model to fit cell concentration (Biomass, 10^6 cell L^{-1} , with initial biomass = $100 \cdot 10^6 \text{ cell L}^{-1}$), estimated by cell count (n=3), as a function of time. Model done for each of the four cultures in MPBR. Values of R^2 of each model are indicated on the graph. | 102 |
| Figure 2.3: Cell density (N, 10^6 cell L^{-1}) reached during the stationary phase and mean EMn concentration (mg L^{-1}) measured in the culture medium in four different cultures in MPBR ($d=0,1 \text{ d}^{-1}$, ES 1/3+Si) using three strains of <i>H. ostrearia</i> (NCC553, NCC531, NCC529). Results are expressed as the mean \pm standard deviation of $n \geq 3$ values measured during stationary phases of culture. Different letters indicate significant group difference (ANOVA, LSD; $p < 0.05$, $R^2_N=0,96$, $R^2_{\text{EMn}} = 0.97$, Annex 1, Table S 1) | 104 |
| Figure 2.4 : Antioxydant and antibacterial activities of marennine extracts produced by three <i>H. ostrearia</i> strains. (a) Dose-response curves of <i>V. splendidus</i> 4D1-8 exposed to a concentration range (mg L^{-1}) of marennine extract [EMn] over 24h exposition. Each value represents the mean \pm standard deviation of (n=3), and three clones of the <i>Vibrio</i> strain were exposed to each extract. $R^2_{\text{NCC529}} = 0.78$, $R^2_{\text{NCC531}} = 0.90$, $R^2_{\text{NCC553}} = 0.78$. (b) Dose- | |

response linear regression of DPPH radicals exposed to a concentration range (mg L^{-1}) of marennine extract [EMn]. $R^2_{\text{globalmodel}}=0,92$. Each value represents the mean \pm standard deviation of ($n=3$). Values are reported in Table S 6. For both a and b figure, marennine extracts obtained from *H. ostrearia* NCC529 in black (circle), NCC531 in green (cross or diamond), and NCC553 in red (square). (c) EMn concentration inducing 20% (IC20 $\text{mg}_{\text{EMn}} \text{L}^{-1}$) of *V. splendidus* growth inhibition (solid histogram) or DPPH radical scavenging (lined histogram). Results are expressed as mean \pm sd ($n=3$). Different letters indicate significant group difference, comparisons were made separately for antibacterial (ANOVA, $F = 0.261$, $p = 0.779$) and antioxidant (ANCOVA, $F= 18.947$, $p= 0.004$) bioactivities. 123

Figure 2.5: Absorption spectra of the marennine extracts produced by the three strains of *H. ostrearia* NCC553, NCC531 and NCC 529. (a) UV-Vis spectra of the extracts in nanopure water at pH 7. (b) ATR-FTIR spectra of the freeze-dried marennine extracts. Bands assignments are described in Table S 10 and Table S 11, respectively. 124

Figure 3.1: Evolution of marennine production in *H. ostrearia* NCC 531 MPBR culture ($D=0.1\text{d}^{-1}$). EMn volumetric productivity of MPBR P_v ($\text{mg}_{\text{EMn}}\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$) in lined green bars, represented as mean \pm standard error ($n=3$), specific EMn gross production inside the culture, R_{EMn} ($\text{mg}_{\text{EMn}}10^6\text{cell}^{-1}\text{L}^{-1}$) in plain blue bars represented as calculated value \pm 95% uncertainty, cumulative EMn production (P_c) (mg) in blue dots represented as calculated value \pm 95% uncertainty ($R^2=0.99$). 159

Figure 3.2 : Growth curves measured for *H. ostrearia* NCC 531 using a Gompertz model to fit two biomass indicators evolutions along time. The biomass indicators used were (a) cell concentration (N , 10^6 cell L^{-1} , with initial $N = 100 \cdot 10^6 \text{ cell L}^{-1}$), estimated by cell count ($n=3$), as function of time (d) and (b) chlorophyll *a* concentration ($[\text{Chl}_a]$, ng L^{-1} , with initial $[\text{Chl}_a]= 244 \text{ ng L}^{-1}$), as function of time. All measurements were performed daily in triplicate ($n=3$) before and after culture homogenization, to sample the pelagic phase (pelagic) and total biomass (total). Dots represent experimental points \pm SD, and lines correspond to Gompertz modeling done one the 20 first days of culture \pm 95% uncertainty ($R^2_{N \text{ total}}=0.99$; $R^2_{N \text{ pelagic}}=0.98$; $R^2_{[\text{Chl}_a] \text{ total}}=0.99$; $R^2_{[\text{Chl}_a] \text{ pelagic}}=0.97$) 160

Figure 3.3 : Physiological profile of *H. ostrearia* cells along its cultivation in MPBR. Physiological parameters are $[\text{Chl}_a]_{\text{spe}}$, the specific Chl_a concentration of cells of the total biomass (lined green area, $\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$), $[\text{CarT}]_{\text{spe}}$, the specific total carotenoid content of cells in the total biomass (dotted orange area, $\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$). All values are presented as mean \pm SD of $n=3$. The last physiological parameter is F_q'/F_m' , effective quantum yield of PSII at growth irradiance measured for pelagic biomass (for PAR = 200 μmol

photons $\text{m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) (plain black dots, arbitrary units). Values were estimated from the daily measured P/E curve \pm SE..... 161

Figure 3.4 : Absorption spectra of the marennine extracts produced by *H. ostrearia*, harvested during exponential, stationary and senescent phase of its culture in fed-batch, in MPBR ($D=0.1 \text{ d}^{-1}$). (a)ATR-FTIR and (b)UV-Visible spectrum of marennine extracts harvested at three distinct stages of *H. ostrearia* NCC531 MPBR culture. The extracts correspond to the blue water intermediate fraction obtained by double ultrafiltration and diafiltration at 30- and 3-kDa cutoffs, respectively, as proposed by Pouvreau *et al.* (2006b)..... 164

Figure 3.5 : Bioactivity of marennine extracts harvested at three distinct stages of *H. ostrearia* NCC531 MPBR culture. (a) Dose-response curves of *V. splendidus* 4D1-8 exposed to a concentration range (mg L^{-1}) of marennine extract [EMn] over 24h exposition. Each value represents the mean \pm standard deviation of ($n=3$), and three clones of the *Vibrio* strain were exposed to each extract. $R^2_{\text{exponential}}= 0.77$, $R^2_{\text{stationary}} = 0.90$, $R^2_{\text{end}}= 0.79$. (b) Dose-response linear regression of DPPH radicals exposed to a concentration range (mg L^{-1}) of marennine extract [EMn]. $R^2=0,97$. Each value represents the mean \pm standard deviation of ($n=3$). For both A and B figure, marennine extracts obtained from BW1 in blue (square), BW2 in green (circle), and BW3 in red (cross). The extracts correspond to the blue water intermediate fraction obtained by double ultrafiltration and diafiltration at 30- and 3-kDa cutoffs, respectively, as proposed by Pouvreau *et al.* (2006b)..... 165

Figure 4.1 : Purification process enabling the five studied extracts to be obtained: without the additional purification step MMW-UF and with the additional purification step MMW-SPE, LMW-SPE, HMW-SPE, and EPS-H2O (created with BioRender.com)..... 190

Figure 4.2 : Marennine extract concentration inducing 20 (IC20, lined histogram) or 50% (IC50, plain histogram) DPPH scavenging. Concentrations are expressed as (a) mass concentrations (mg L^{-1}) and (b) the equivalent extracellular marennine chromophore absorbance (a.u.) of each extract. Results are expressed as mean \pm SD ($n=3$). Different letters indicate significant group difference (ANOVA, LSD; $p < 0.05$)..... 197

Figure 4.3 Marennine extract concentration inducing 50 (IC50) or 20% (IC20) of *V. splendidus* growth inhibition after 24h of exposition in LB2% NaCl. Both IC20 and IC50 are expressed in (a) mass concentrations (mg L^{-1}) and in (b) equivalent absorptivity (a.u.) according to the maximal absorbance of each extract. For each type of extract, IC50 is on the left (darker colour), and IC20 on the right (lighter colour). Box plots display the results observed for

| | |
|--|-----|
| 4 strains of <i>V. splendidus</i> tested. The table displays the number of conclusive 20 or 50% growth inhibition observed (n=12)..... | 199 |
| Figure 4.4 : UV-Visible spectra of the different blue water extracts at pH 7. Characteristic bands (grey area) are detailed in Table 4.1. | 201 |
| Figure 4.5 : ATR-FTIR spectra of the different blue water extracts. Characteristic bands (grey area) refer to assignments indicated in Table 4.2. | 203 |
| Figure 4.6 : Marennine extract (a) carbohydrate content ($\text{mg}_{\text{eq.Glucose}} \text{mg}_{\text{DW}}^{-1}$) and (b) composition ratio ($\text{mg}_{\text{EMn}} \text{mg}_{\text{eq.Glucose}}^{-1}$). Results are expressed as mean \pm sd (n=3). Different letters indicate significant group difference (ANOVA, LSD; $p < 0.05$)..... | 206 |
| Figure 18: Hypothèses concernant l'impact du procédé de culture de <i>H. ostrearia</i> sur la qualité de la marennine produite, lors d'une culture en fed-batch. Avec [EMn] concentration en marennine extracellulaire dans le surnageant de culture, $P_{\text{spécifique}}$ productivité spécifique en marennine des cellules de <i>H. ostrearia</i> en culture (créé avec BioRender.com). | 232 |
| Figure 19 : Hypothèses de l'impact du procédé de raffinage sur la qualité de l'extrait de marennine obtenu et ses conséquences sur ses bioactivités antibactériennes et antioxydantes. Avec SPE extraction sur phase solide, HMW haut poids moléculaire, LMW faible poids moléculaire, UF ultrafiltration (créé avec BioRender.com)..... | 233 |
| Figure 20 : Système de production de marennine pour la production d'un extrait utilisable en intrant en aquaculture. Système intégrant les solutions proposées dans le cadre de cette étude pour améliorer les productivités en marennine et la fiabilité de la qualité de l'extrait final. Avec F_q'/F_m' le rendement photosynthétique du photosystème II, UF correspondant à la double ultrafiltration 30 et 3 kDa de Pouvreau <i>et al.</i> (2006b) EPS substances polymériques extracellulaires, EMn marennine extracellulaire (créé avec BioRender.com)..... | 238 |

Figure S. 1 :Linear regression between pigment specific content of cells at the beginning of the culture ($P_{spe\ initial}^T$ ($\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$)) and cell length (μm). Linear model corresponds to the black line, the dotted grey curves correspond to the prediction interval at a confidence level of 95% of the prediction model, the continuous grey lines correspond to the punctual prediction interval at a confidence level of 95%. $R^2=0.69$ 131

Figure S. 2: Linear regression between pigment specific content of cells during the stationary phase of the culture (P_{spe}^T ($\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$)) and cell length (μm). Linear model corresponds to the black line, the dotted grey curves correspond to the prediction interval at a confidence level of 95% of the prediction model, the continuous grey lines correspond to the punctual prediction interval at a confidence level of 95%. $R^2=0.70$ 132

Figure S. 3: Linear regression between cell biovolume (Bv (μm^3)) and specific EMn productivities (P_s ($\text{mg}_{EMn} 10^9 \text{ cell}^{-1} \text{ d}^{-1}$)) observed during stationary phase of the culture. Linear model corresponds to the black line, the dotted grey curves correspond to the prediction interval at a confidence level of 95% of the prediction model, the continuous grey lines correspond to the punctual prediction interval at a confidence level of 95%. $R^2=0.66$ 133

Figure S. 4 : MPBR pictures taken before and after daily complete homogenisation of the culture of *H. ostrearia* with a magnet bar placed in the reactor. 135

Figure S. 5 Logarithm regression of cumulative production of extracellular marennine (P_c) during cultivation of *H. ostrearia* NCC53 in MPBR. $R^2=0.99$, $P_c = 46.1/(1+\exp(-0,3*(\text{time}-12,3)))$. Parameters are detailed in the table below the graph. Confidence intervals (95%) in solid line, prediction interval (95%) in dotted line 175

Figure S. 6: Dose-response curve of the scavenging effect of marennine extracts on the DPPH (diphenyl picrylhydrazyl) radical. The concentrations of marennine are expressed as the final concentration in the reaction mixture ($C_m \text{ mg L}^{-1}$). The percentage values are means of three replicates \pm sd and each extract has been tested 3 times. 217

Figure S. 7: *Vibrio splendidus* dose-response curves after 24h of exposition to marennine extracts. Four strains have been tested, 4D1-8, 4G1-8, 4G4-4, 3T8-11. Marennine concentrations are expressed as the final concentration in the reaction mixture ($C_m \text{ mg L}^{-1}$). Percentage values are means of three replicates \pm sd, each extract has been tested three times. 219

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

| | | |
|-------------|------------------------------------|--|
| BW | Blue water | Eau bleue |
| DW | Dry weight | Masse sèche |
| EMn | Extracellular marennine | Marennine extracellulaire |
| EPS | Extracellular polymeric substances | Substances polymériques extracellulaires |
| HMW | High molecular weight | Haute masse moléculaire |
| IMn | Intracellular marennine | Marennine intracellulaire |
| LMW | Low molecular weight | Basse masse moléculaire |
| MMW | Medium molecular weight | Masse moléculaire moyenne |
| MPBR | Submerged membrane photobioreactor | Photobioreacteur à membrane immergée |
| SPE | Solid phase extraction | Extraction sur phase solide |
| UF | Ultrafiltration | Ultrafiltration |

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. MISE EN CONTEXTE

D'ici 2050, l'humanité devrait compter 9,5 milliards d'individus. Si nos modes de consommations n'évoluent pas la quantité de ressources nécessaires pour subvenir aux besoins de cette population correspondra à celle que pourrait fournir 2 à 8 planètes Terre (UNICEF, 2022). Une mise à niveau de nos systèmes de production et de consommation est nécessaire pour fournir une alimentation suffisante en quantité et en qualité à l'ensemble de la population mondiale, tout en limitant l'impact de cette production sur les écosystèmes qu'elle côtoie.

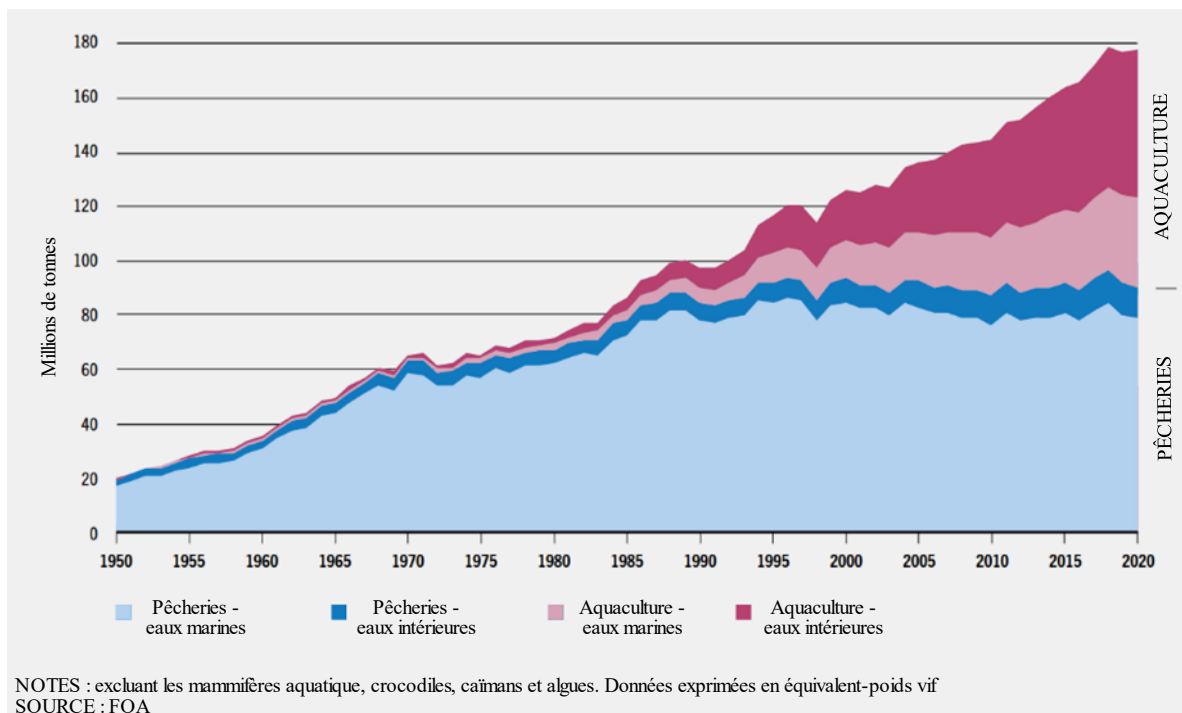


Figure 1 : Évolution de la production alimentaire provenant de la pêche et de l'aquaculture depuis 1950 (adaptée du rapport FAO, 2022)

L'aquaculture est le seul secteur alimentaire qui affiche une croissance (5.3% entre 2011 et 2018, Figure 1) plus forte que la croissance de la population humaine (3.2% pour la même période, FAO, 2022). La ressource alimentaire aquatique, regroupant les résultats de la pêche et de l'aquaculture, constitue aujourd'hui 17% de l'apport alimentaire mondial en protéine animale, chiffre qui peut atteindre 50% dans certains pays d'Afrique et d'Asie. Son apport protéique, mais également en acides gras essentiels (Omega-3) et micronutriments biodisponibles justifie son importance dans la course à la sécurité alimentaire (FAO, 2022). Dans le secteur de l'exploitation des ressources aquatiques, seule l'aquaculture est responsable de la croissance de la production depuis les années 80 (Figure 1). L'aquaculture présente donc un fort potentiel pour s'attaquer au défi d'une production alimentaire répondant aux attentes d'une population grandissante. Ce faisant, il est impératif que cette croissance réponde aux contraintes de durabilité économique, écologique et sociale (FAO, 2022).

L'une des branches prometteuses de l'aquaculture est celle de la production de bivalves, qui en plus de proposer un apport nutritif équilibré, peut permettre le développement économique des communautés côtières, tout en contribuant écologiquement à la régulation des écosystèmes côtiers (FAO, 2022). C'est une aquaculture dite « extractive », sans ajout de nourriture, car les bivalves consomment de grandes quantités de phytoplanctons riches en nutriments, réduisant ainsi les impacts de l'eutrophisation (Naylor *et al.*, 2021). De toutes les productions aquacoles animales, la production des bivalves génère les plus faibles émissions de CO₂ (pratiquement nulle) tout en ayant un bilan négatif d'azote et de phosphore sur l'environnement (Gephart *et al.*, 2021). Comme pour l'ensemble des ressources naturelles, la stabilité de celle-ci peut être menacée par des épidémies. Dans le cas des bivalves, ces épidémies résultent souvent de bactéries pathogènes du genre *Vibrio* (Paillard *et al.*, 2004), dont l'émergence est accélérée par l'utilisation d'antibiotiques de synthèse et les changements climatiques. Les épidémies de vibriose pourraient ainsi devenir responsables de plus de 10 millions de pertes des productions aquicoles d'ici 2050 (Naylor *et al.*, 2021 ; Sanches-Fernandes *et al.*, 2022). La recherche de traitements durables devient urgente à l'heure où l'intensification des systèmes d'aquaculture crée des zones à haut risque,

en favorisant l'émergence de souches pathogènes multirésistantes. Ces méthodes prennent la forme de vaccins, d'immunostimulants ou encore de probiotiques, mais l'absence de système immunitaire adaptatif chez les bivalves limite les possibilités de traitements (Pérez-Sánchez *et al.*, 2018).

C'est dans ce contexte et pour répondre à ce besoin que nous proposons d'axer la recherche sur la marennine, le pigment produit *Haslea ostrearia*. Ce pigment présente, entre autres, des activités antibactériennes (Falaise *et al.*, 2019b ; Tardy-Laporte *et al.*, 2013) et antioxydantes (Pouvreau *et al.*, 2008a). Ces propriétés font de ce composé un potentiel atout multifonctionnel pouvant aider à réguler la charge bactérienne d'un écosystème tout en limitant le stress oxydatif pouvant se déclencher chez des bivalves faisant face à une perturbation physiologique (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2020). La marennine rentre ainsi entrer dans la catégorie des postbiotiques (Bondad-Reantaso *et al.*, 2023), offrant une protection pour plusieurs espèces de bivalves (Turcotte *et al.*, 2016). De plus, en s'accumulant sur la chair des bivalves (Gastineau *et al.*, 2014), la marennine se présente comme un traitement naturellement localisé. A cela s'ajoute qu'à la suite de plus de deux siècles de consommation humaine à travers des huîtres classées fines de claires vertes, la marennine promet une certaine sécurité alimentaire (Soletchnik *et al.*, 2001).

2. HASLEA OSTREARIA – DIATOMÉE BLEUE

2.1 Origine

Les diatomées, micro-organismes appartenant au phylum des Heterokontophyta sont des microalgues brunes unicellulaires pouvant être trouvées sous forme individuelle, en colonies ou en filaments dans la colonne d'eau ou sous forme de biofilm à la surface d'un substrat meuble ou dur. (Medlin et Kaczmariska, 2004 ; Obata *et al.*, 2013 ; Sabater, 2009). Il existerait entre 20 000 et 2 millions d'espèces, soit une importante diversité qui leur vaut d'être retrouvées aussi bien en eaux douces (lacs, rivières) qu'en eaux salées (mers, océans) (Spaulding *et al.*, 2021). Ceux sont des diatomées marines pennées, de la classe des

Bacillariophyceae, qui sont désignés comme agent causal du verdissement des huîtres de Marennes Oléron, mets reconnu en France depuis le XVIII^e siècle (Lankester, 1885). Ce phénomène, comme son nom l'indique, correspond à l'apparition de la couleur bleu vert au niveau de la chaire, particulièrement sur les palpes labiaux et les branchies, des bivalves cultivés dans ces bassins. Cette coloration s'accompagne de changements organoleptiques des huîtres ainsi « verdies », qui leur vaut d'être particulièrement appréciées par les consommateurs. Le verdissement est aujourd'hui considéré comme un raffinage et apporte aux huîtres "fines de claire vertes" une valeur économique plus importante que les huîtres classiques. Si le verdissement est observé depuis le XVII^e siècle (Sprat, 1667 d'après Gastineau *et al.*, 2014), ceux sont les travaux de Gaillon (1820) qui l'associent pour la première fois à la présence d'un microorganisme ingéré par les bivalves. Celui-ci est alors initialement classé dans le domaine Bacteria sous le nom de *Vibrio ostrearius* Gaillon. Cette classification sera révisée une première fois et le taxon *V. ostrearius* sera désigné *Navicula ostrearia* (Gaillon) Bory (Lamouroux *et al.*, 1827), transférant ainsi ce microorganisme dans le domaine des Eukaryota et la classe des Bacillariophyceae. En 1974, Simonsen crée le genre *Haslea* et désigne *Haslea ostrearia* (Gaillon) Simonsen (1974), anciennement *N. ostrearia*, comme son genre type (Guiry et Guiry, 2024 ; Poulin et Méléder, 2019). L'étude de cette diatomée permet alors la première description de la marennine, un pigment bleu synthétisé et naturellement externalisé par *H. ostrearia*. Se retrouvant directement dans l'environnement aquatique, la marennine externalisée ainsi que celle dans les diatomées bleues ingérées s'accumule sur les bivalves qui se nourrissent par filtration des particules organiques planctoniques présentes dans leur habitat (Gastineau *et al.*, 2018 ; Prasetya, 2015 ; Prasetya *et al.*, 2017a, 2017b, 2020a).

2.2 Répartition

2.2.1 Liée à l'activité ostréicole

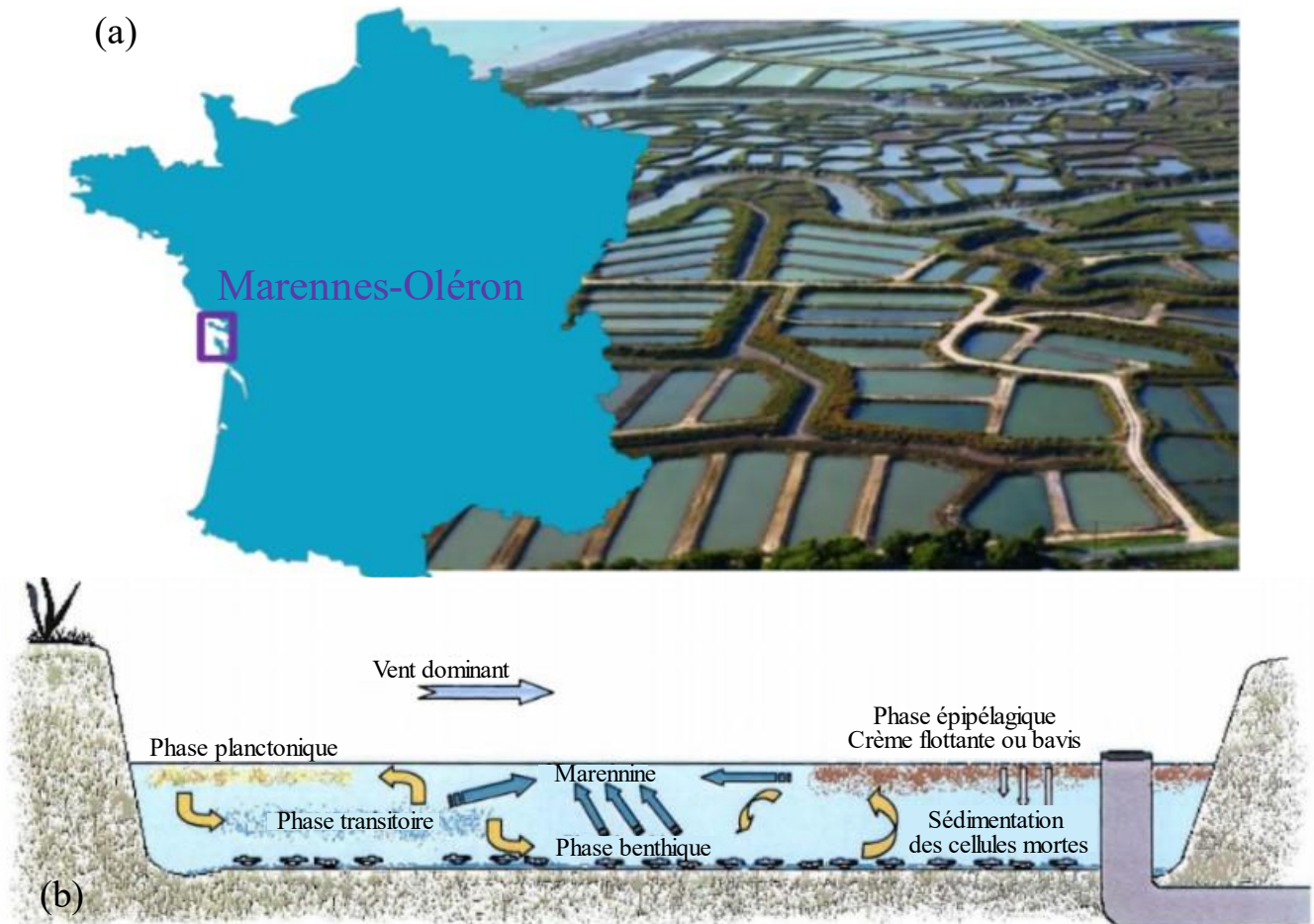


Figure 2 : *Haslea ostrearia* et le verdissement des huîtres dans les claires ostréicoles de Marennes-Oléon. (a) Photographie aérienne montrant les claires ostréicoles de Marennes Oléron (adaptée de Falaise, 2019); (b) représentation schématique en vue transversale d'une claire ostréicole (adaptée de Robert, 1973)

Haslea ostrearia est historiquement retrouvée dans les claires ostréicoles (Figure 2) de Marennes Oléron, constituées de bassins artificiels utilisés lors de la période d'affinage des huîtres. Cette pratique consiste à immerger les huîtres adultes dans des bassins de surface moyenne de 400 m² pendant plusieurs semaines, notamment pour y développer leurs caractéristiques organoleptiques (Gastineau *et al.*, 2014). Ces bassins sont alimentés au rythme des marées, qui font varier la composition nutritionnelle de l'environnement, ainsi que sa profondeur (de 25 à 60 cm). Les conditions de ce biotope sont donc particulièrement fluctuantes, et ne permettent que le développement des micro-organismes capables de s'y

adapter. *Haslea ostrearia* s’y développe naturellement par périodes, appelée efflorescences, de février à juin et de septembre à novembre (Turpin, 1999). Sa présence dans ce type de biotope, à Marennes Oléron et ailleurs (Mitchell *et al.*, 1917 ; Petersen, 1914 ; Seveno *et al.*, 2023 ; Tuke, 1662) témoigne ainsi de son potentiel d’adaptation aux environnements de fortes luminosités (Rech, 2008), à la salinité fluctuante, mais également la récurrence de l’association entre ces diatomées et la présence de bivalves.

2.2.2 En milieu naturel

Depuis la caractérisation de la diatomée *H. ostrearia* dans les claires ostréicoles, et grâce à l’utilisation de marqueurs génétiques (Gabed *et al.*, 2022 ; Gastineau *et al.*, 2021 ; Seveno *et al.*, 2023), 36 espèces du même genre ont été décrites (Guiry et Guiry, 2024). Au sein du genre *Haslea*, cinq espèces se distinguent phylogénétiquement des autres et formant un clade de *Haslea* bleues : *H. ostrearia*, *H. provincialis*, *H. karadagensis*, *H. nusantara* et *H. silbo*, (Gabed *et al.*, 2022 ; Seveno *et al.*, 2023). Elles produisent toutes un pigment bleu appelé *marennine like pigment*, se distinguant de la marennine par leurs spectres d’absorbance ou par leurs activités biologiques (Gastineau, 2011 ; Gastineau *et al.*, 2021 ; Prasetya *et al.*, 2020b). *Haslea ostrearia* reste une des espèces du genre *Haslea* la plus cosmopolites puisqu’elle a pu être identifiée en milieu naturel sur les côtes atlantiques est (Europe), ouest (É.-U.), et au niveau de l’archipel des Canaries. Elle a été également identifiée sur les côtes de la mer baltique, celles de la mer méditerranéenne, ainsi que dans l’océan Pacifique sur les côtes australiennes (Guiry et Guiry, 2024). L’état des connaissances actuel ne permet pas d’expliquer la répartition géographique de *H. ostrearia*. D’une part, la rareté d’observations de comportement planctonique en milieu semble réduire les probabilités d’une répartition par dérive dans la colonne d’eau, du moins à grande échelle. D’autre part, les capacités de *H. ostrearia* à produire du biofilm, ainsi qu’à recouvrir le périphyton ainsi que certaines espèces de macroalgues soutiennent l’hypothèse d’une influence anthropique sur la répartition de l’espèce (Seveno *et al.*, 2023). Le transport maritime ayant servi de vecteur pour le déplacement de nombreux organismes, et notamment ceux formant des biofilms s’attachant aux coques des navires, combiné à

l'internationalisation des échanges issus de l'aquaculture pourrait expliquer en partie la répartition de *H. ostrearia*.

2.3 Cytologie

Le frustule

Haslea ostrearia, en tant que diatomée, possède une enveloppe rigide composée de silice, appelée frustule, entourant son protoplaste. Dans le cas de *H. ostrearia*, le frustule a une forme lancéolée et observe un rétrécissement de sa largeur au niveau des apex (Figure 4) (Poulin et Méléder, 2019 ; Round *et al.*, 1990). Il se compose de deux thèques, l'épithèque et l'hypothèque, liées entre elles au niveau de leurs cingula (Figure 3). Le frustule possède

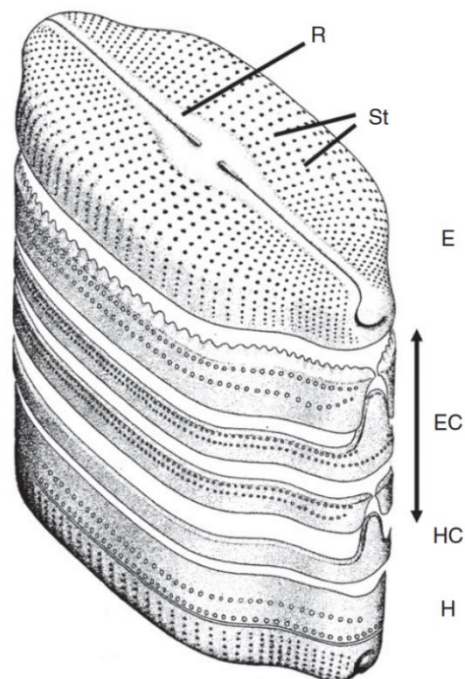


Figure 3 : Schéma montrant les différentes parties l'épithèque et de l'hypothèque formant le frustule des diatomées pennées. E : épivalve, EC : épicingulum, HC : hypocingulum, H : hypoalve, R : raphé, St : stries (extrait de Sabater, 2009 initialement adapté de Round *et al.*, 1990)

en premier lieu un rôle mécanique de protection physique vis-à-vis du monde extérieur. Sa porosité, quant à elle, rend possibles les échanges chimiques entre le micro-organisme et son

environnement (Ghobara *et al.*, 2019 ; Sabater, 2009). Enfin, la transparence du frustule combinée à son architecture spécifique permet non seulement à la cellule d'accéder à la lumière, mais d'en optimiser sa capture chez certaines espèces (Ghobara *et al.*, 2019 ; Gordon *et al.*, 2009).

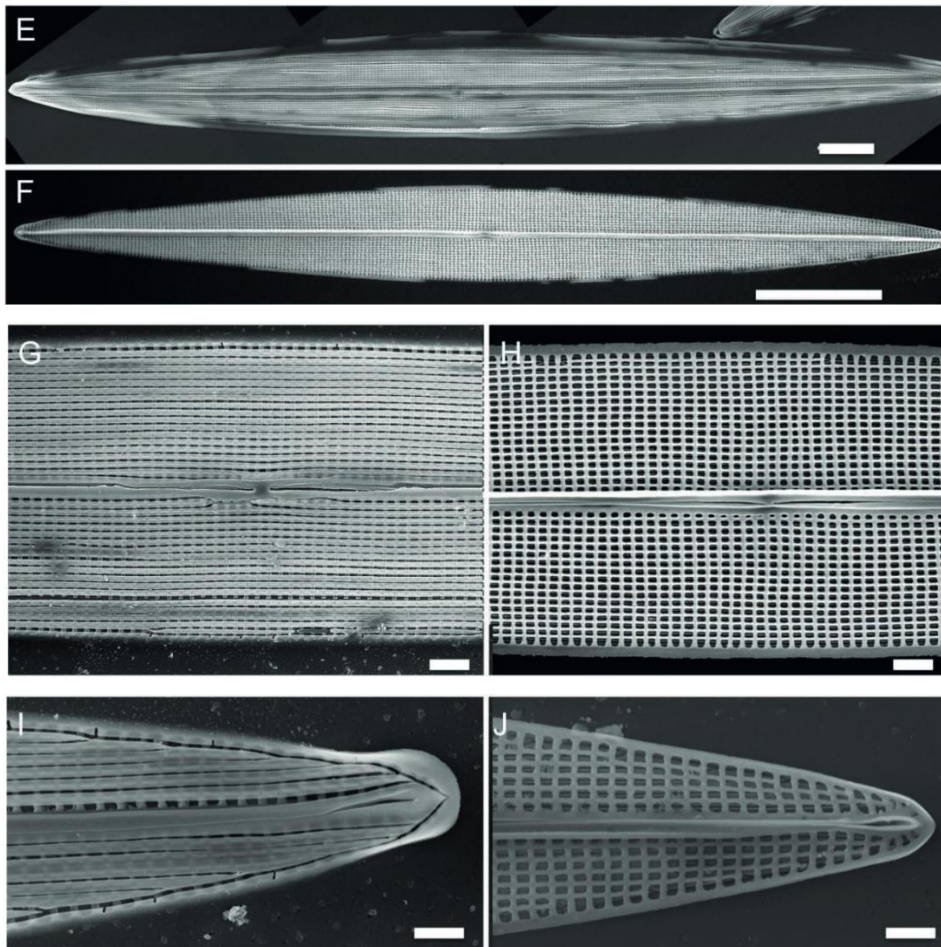


Figure 4 : Observations au microscope électronique à balayage (MEB) du frustule de *H. ostrearia*. E, vue externe d'une valve nettoyée, montrant les stries parallèles longitudinales ; F, vue interne d'une valve nettoyée de la culture, montrant les stries transapicales croisées à angle droit par des stries longitudinales plus denses ; G, vue externe du centre de la valve montrant les stries longitudinales, les terminaisons du raphé étroitement espacées et l'absence de zones distinctes ; H, vue interne du centre de la valve, montrant le motif de stries croisées et la costa axiale surélevée bordant seulement un côté du raphé ; I, vue externe de l'apex de la valve montrant chaque strie périphérique fusionnant au-delà de la zone terminale à l'apex ; J, vue interne de l'apex de la valve montrant les deux motifs de stries, la costa axiale et l'helictoglossa. Barres d'échelle : E = 5 μm ; F = 10 μm ; G-J = 1 μm (extraites de Poulin et Méléder, 2019).

Organisation intracellulaire

L'organisation intracellulaire de *H.ostrearia* est variable, et fluctue en fonction des conditions environnementales et de son état physiologique. Néanmoins, la structure de base correspond à celle décrite par Nassiri *et al.*, 1998 et est illustrée par la Figure 5. *Halsea ostrearia* possède deux chloroplastes pariétaux comportant chacun cinq à sept pyrénoides, structures optimisant la fixation du carbone inorganique. Ces chloroplastes sont entourés de quatre membranes, témoignant des deux endosymbioses à l'origine des bacillariophycées (Goss *et al.*, 2020). La membrane chloroplastique la plus externe est commune avec la membrane externe du noyau situé au centre de la cellule. Le cytoplasme de la cellule est particulièrement réduit, se limitant à l'espace laissé autour des deux vacuoles. Ces dernières voient leur taille varier selon l'état de la cellule. Elles peuvent être visibles lorsqu'elles prennent la quasi-totalité de l'espace intracellulaire, mais leur volume tend à diminuer à mesure de l'accumulation de vésicules acides contenant la marennine aux apex, et le long des parois de la diatomée. Cette accumulation de vésicules bleues observées chez *H. ostrearia*, correspond à la production de marennine intracellulaire (IMn), et s'accompagne de changements au niveau de l'ultrastructure de la cellule. Le volume des vacuoles diminue, les chloroplastes se raccourcissent et des vésicules lipidiques apparaissent (Nassiri *et al.*, 1998).

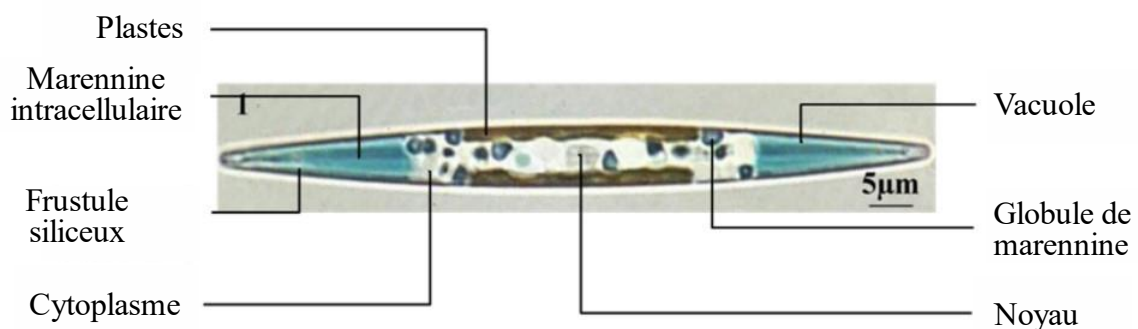


Figure 5 : Observation au microscope optique de *H. ostrearia*, montrant les principaux éléments de sa structure (extraite de Nghiem-Xuan, 2019).

2.4 Métabolisme optimisé pour la fixation du carbone inorganique

Le succès écologique des diatomées à l'échelle de l'évolution peut s'expliquer par leur capacité à se développer dans des environnements lumineux fluctuants, faisant d'eux les principaux producteurs primaires du milieu aquatique (Behrenfeld *et al.*, 2021). *Haslea ostrearia* ne fait pas exception et apparaît comme étant particulièrement adaptée pour une assimilation efficace du carbone inorganique et une captation optimale de l'énergie lumineuse, expliquant en partie les efflorescences observées chez les diatomées du genre *Haslea* (Seveno *et al.*, 2023).

Ces adaptations prennent la forme d'optimisations structurales comme le frustule, dont l'architecture participerait à améliorer la captation lumineuse (Ghobara *et al.*, 2019 ; Gordon *et al.*, 2009). Les pyrénoides, autre adaptation structurale, sont des organites composés principalement de RuBisCO se trouvant au niveau des thylakoïdes dans les chloroplastes. Ils ont pour rôle d'optimiser la fixation du carbone inorganique en faible concentration dans l'environnement aquatique (Morant-Manceau *et al.*, 2007 ; Round *et al.*, 1990 ; Spaulding *et al.*, 2021). Des adaptations métaboliques sont également retrouvées chez *H. ostrearia*, avec notamment la mise en évidence de l'activation d'une voie de type-C4 pour la fixation du carbone pouvant améliorer le piégeage du carbone inorganique sous forme de malate, dans le but de dissiper un surplus d'énergie lumineuse (Obata *et al.*, 2013 ; Rech, 2008). Il a été remarqué, également, que les diatomées tendaient à sécréter de grandes quantités de substances extracellulaires polymériques (EPS), et ce plus spécifiquement dans les situations de stress. De ce fait, cette voie de synthèse apparaît comme une stratégie d'évacuation d'un surplus de fixation de carbone qui peut être associé à une forte luminosité (Staats *et al.*, 2000 ; Underwood *et al.*, 2004). Les EPS ainsi produites sont utilisées dans le cadre de la motilité des diatomées, leur permettant de se déplacer dans une zone à la luminosité plus favorable. Les EPS servent également de médiateurs d'interactions écosystémiques, facteur clé de la formation de biofilm en interaction avec d'autres microorganismes (Antunes *et al.*, 2019). Ce biofilm, en plus de son rôle d'auto-ombrage (Mouget *et al.*, 1999), permet la mise en place d'un consortium microalgues-bactéries où les échanges nutritionnels favorisent la

stabilité d'un environnement propice au développement des micro-organismes le composant (Antunes *et al.*, 2019).

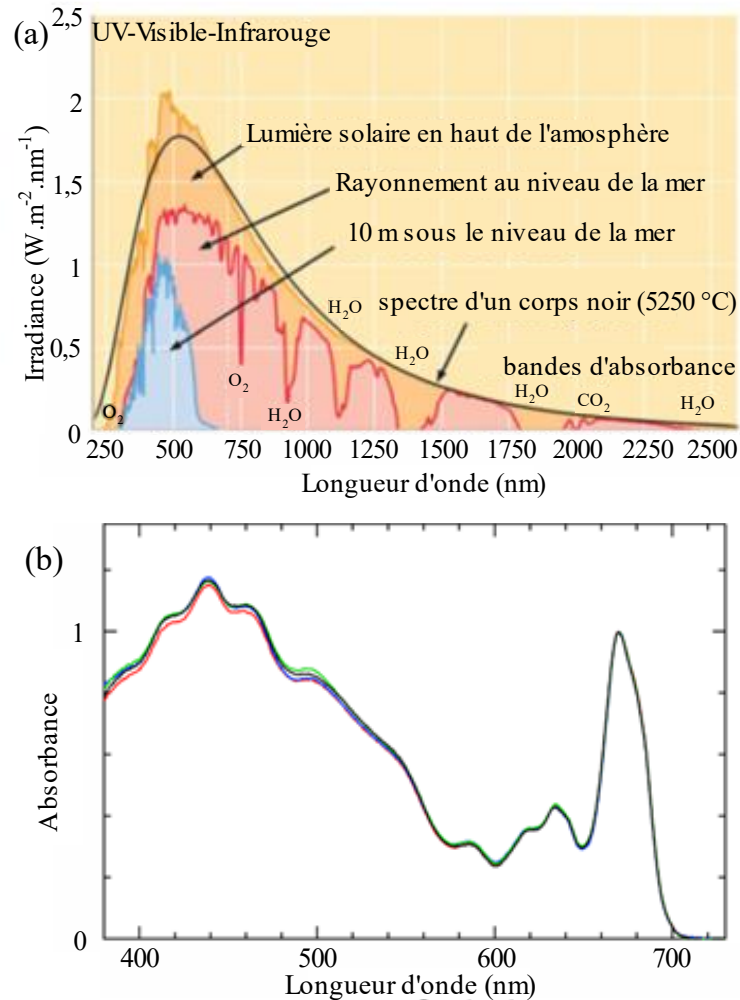


Figure 6 : Adaptation des diatomées à leur environnement lumineux. (a) Spectre d'irradiance montrant les longueurs d'onde accessibles selon l'environnement terrestre ou aquatique (extrait de Ghobara *et al.*, 2019) mis en parallèle avec (b) le spectre d'absorbance des cellules de diatomées (extrait de Tanabe *et al.*, 2020).

Concernant la phase photochimique de la photosynthèse (*c.-à-d.* phase claire), les diatomées se distinguent des autres organismes photosynthétiques par leur composition pigmentaire. En effet, si le fonctionnement de l'appareil photosynthétique correspond à celui retrouvé chez les chlorophycées, celui-ci s'en distingue au niveau des antennes collectrices. Ces dernières, retrouvées au niveau des thylakoïdes, sont composées de chlorophylle a, chlorophylle c et sont également riches en fucoxanthines (Goss *et al.*, 2020). Cet assemblage

de pigments photosynthétiques permet une meilleure collecte des longueurs d'onde entre 460 et 570 nm, correspondant au spectre accessible en milieu aquatique (Figure 6a et b), ainsi qu'une optimisation de la dissipation d'excès d'énergie lumineuse (Tanabe *et al.*, 2020). Contrairement aux chlorophycées, il n'existe pas plusieurs antennes collectrices spécifiques aux différents photosystèmes, et celles-ci ne sont pas regroupées en grana, mais sont réparties sur l'ensemble des thylakoïdes (Goss *et al.*, 2020). D'autres caroténoïdes, au rôle cette fois uniquement photoprotecteur, sont retrouvés chez les diatomées, les principaux étant la bêta-carotène, la diadinoxanthine, et la diatoxanthine (Goss *et al.*, 2020 ; Obata *et al.*, 2013). Ils viennent compléter les stratégies de dissipation d'excès énergétique chez les diatomées comme *H. ostrearia*.

En plus de ces adaptations, des études récentes démontrent que les diatomées seraient capables de compenser l'apport en énergie chimique (ATP, NADPH, H⁺) manquante en cas de faibles activités photosynthétiques, par un couplage entre la phase sombre de la photosynthèse et la respiration mitochondriale décrit par Bailleul *et al.* (2015). Cette stratégie expliquerait leur importante capacité à assimiler du CO₂, et donc en grande partie leur succès écologique.

2.5 Développement cyclique

2.5.1 Cycle de vie

Le cycle de vie des diatomées pennées telles que *H. ostrearia* est qualifié de monogénétique diplophasique. Cela se traduit par un cycle de vie principalement végétatif et diploïde, avec un recours ponctuel à la reproduction sexuée (Figure 7).

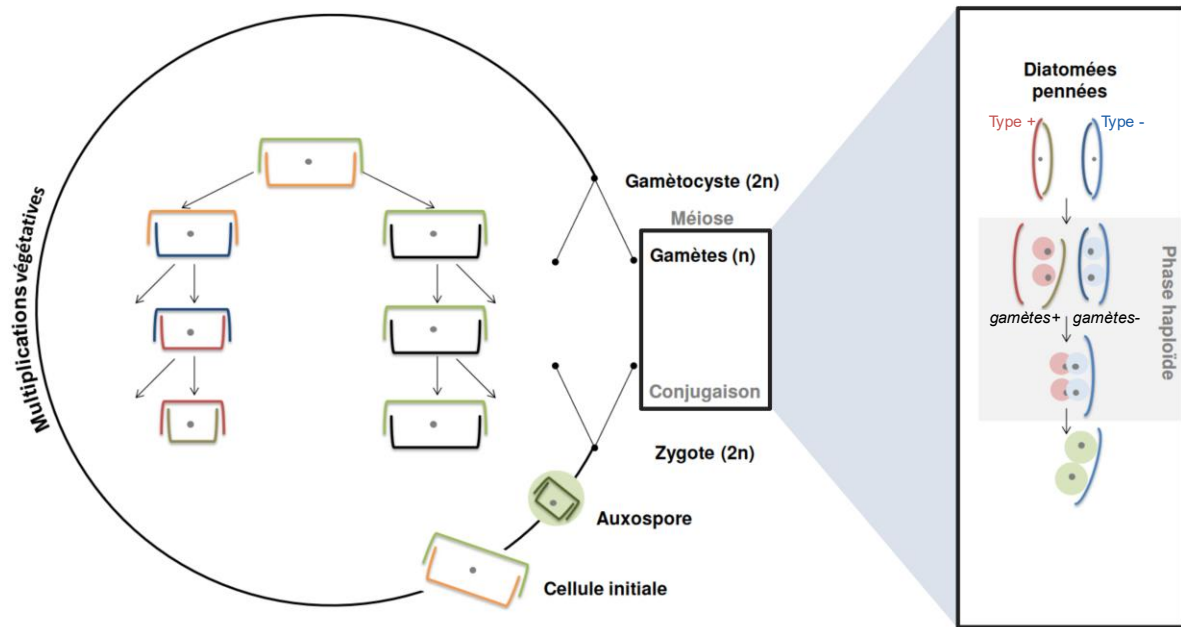


Figure 7 : Cycle de vie monogénétique diplophasique des diatomées pennées (adapté de Falaise, 2019)

Multiplication végétative chez *Haslea ostrearia*

Le frustule, coquille de silice rigide, est à l'origine du rétrécissement cellulaire progressif, mais inévitable, observé chez les diatomées (Amato, 2010). Ce rétrécissement est connu sous le nom de loi de Macdonald-Pfitzer (Hense & Beckmann, 2015). En phase végétative, les cellules se multiplient par divisions mitotiques successives et d'une cellule mère, deux cellules filles sont obtenues. La mitose se déroule à l'intérieur du frustule de la cellule mère. Après la cytokinèse, les deux cellules filles héritent chacune d'une valve du frustule initial. Cette valve deviendra par la suite l'épithèque de leur propre frustule. De cette manière, seule la deuxième valve, l'hypothèque, est synthétisée *de novo* par les cellules filles. La fabrication de celle-ci débutant avant même la séparation des deux valves mères, l'hypothèque aura une taille inférieure à la valve héritée. Le résultat de la reproduction végétative d'une diatomée donne alors deux pseudo "clones", l'un de la même taille que la diatomée initiale, l'autre, légèrement plus petit (Figure 7) (Chepurnov *et al.*, 2004 ; Davidovich *et al.*, 2009). La répétition d'un tel mécanisme, à mesure des divisions successives, entraîne une réduction de la taille moyenne des cellules d'une même lignée,

jusqu'à atteindre une taille critique ne permettant plus la reproduction végétative des cellules. Ce vieillissement de la population cellulaire connaît une solution : l'auxosporulation, mode de reproduction sexuée chez les diatomées pennées raphides (Chepurnov *et al.*, 2004 ; Davidovich *et al.*, 2009).

Reproduction sexuée chez Haslea ostrearia

Chez les diatomées, la phase de reproduction sexuée est très courte, comparée à la phase végétative qui peut durer plusieurs années. Très coûteuse en énergie, elle n'est ni une stratégie de dormance ni une stratégie de prolifération pour *H. ostrearia*. Du fait de sa rareté, ce phénomène est difficilement observable, ce qui explique qu'il soit peu décrit dans la littérature. Cette étape du cycle de vie d'une diatomée reste néanmoins essentielle, étant la seule manière pour les diatomées de régénérer la taille de leurs cellules. (Amato, 2010 ; Chepurnov *et al.*, 2004 ; Davidovich *et al.*, 2009). Chez les diatomées pennées raphides, auxquelles appartient *H. ostrearia*, la reproduction sexuée se fait par auxosporulation, mode de reproduction caractéristique des diatomées (Pouličková *et al.*, 2019). Chez *H. ostrearia*, ce mode de reproduction est allogame et isogame : les gamètes à l'origine du zygote proviennent de deux individus, mais ne présentent aucune différence phénotypique, contrairement aux diatomées centriques (Chepurnov *et al.*, 2004 ; Davidovich *et al.*, 2009). Le déclenchement de l'auxosporulation a lieu lorsqu'un ensemble de conditions s'alignent : intrinsèques aux cellules (compatibilité génétique de deux souches, hétérothallisme, stade de maturité sexuelle des cellules) et environnementales (température, luminosité, agitation, etc.) (Davidovich *et al.*, 2009; Davidovich *et al.*, 2018; Mouget *et al.*, 2009). L'ensemble constitue le cycle de vie monogénétique diplophasique de *H. ostrearia* (Figure 7).

2.5.2 Cycle écophysiological : origine des efflorescences

Au cycle de vie d'une lignée cellulaire s'ajoute, chez *H. ostrearia*, un cycle écophysio­logique à l'échelle d'une population, propre à l'environnement où celle-ci est retrouvée.

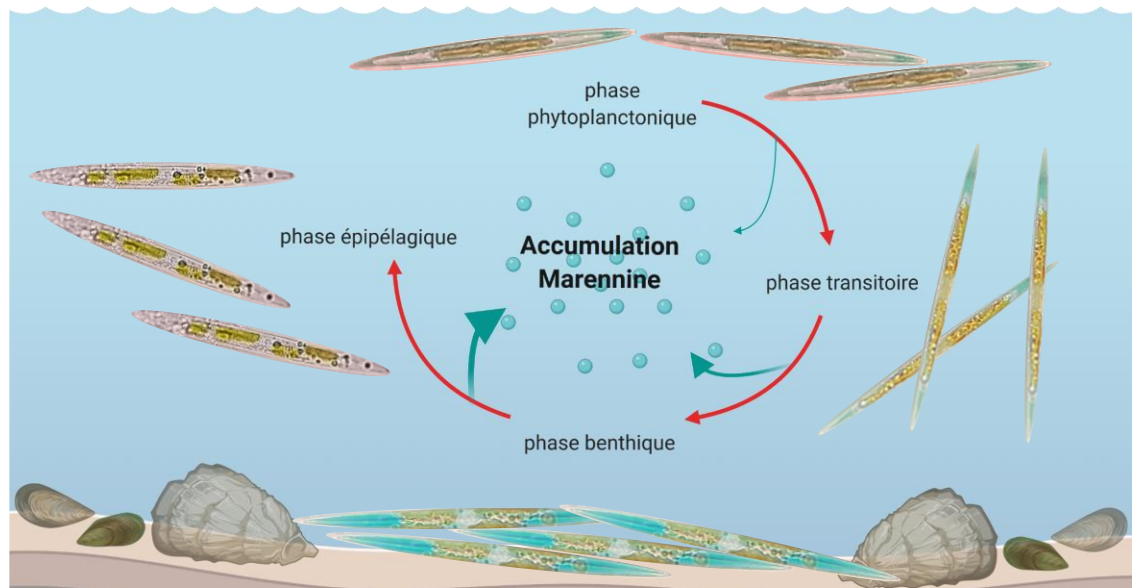


Figure 8 : Schéma résumant le cycle ty­chopélagique de *H. ostrearia* et l'évolution de l'état des cellules au cours de celui-ci. Les différents organismes présents sur le schéma ne sont pas à l'échelle (d'après Nassiri *et al.*, 1998 et Robert, 1973).

Le cycle écophysio­logique le mieux décrit pour *H. ostrearia* correspond à celui observable chez les populations retrouvées dans les eaux saumâtres peu profondes des claires ostréicoles. Dans ces bassins, *H. ostrearia* adopte un comportement pelago-benthique qui peut être qualifié de ty­chopélagique (Moreau, 1969 ; Robert, 1973 ; Turpin, 1999). Cela se manifeste par une alternance entre un comportement principalement benthique et une remise en suspension dans la colonne d'eau, au gré des flux de celle-ci. Ce cycle s'accompagne d'une modification visible de l'organisation cellulaire (Figure 8). La phase planctonique se compose de cellules présentant deux longs chloroplastes pariétaux et la quasi-absence de marennine au niveau de leur apex. Au cours de cette phase planctonique, il est pressenti que les cellules présentent une forte activité photosynthétique, relativement aux cellules retrouvées dans la phase benthique. En phase transitoire, les apex des cellules se chargent en marennine au détriment des chloroplastes qui commencent à se raccourcir et légèrement se

déformer. Cette phase correspond à la migration des cellules de la phase planctonique à la phase benthique. En fin de phase transitoire, les cellules apparaissent quasiment entièrement remplies de marennine, avec des chloroplastes particulièrement déformés et rétrécis. Une fois agglomérées en phase benthique, celles-ci se chargent en gouttelettes lipidiques et forment un biofilm. Il semblerait alors que la quantité de marennine relarguée dans l'environnement soit plus importante (Pouvreau, 2006), et leur activité photosynthétique diminuée. Il n'est pas exclu qu'à ce stade de leur vie, les cellules présentent un métabolisme hétérotrophe (Neuville, 1974 ; Robert *et al.*, 1981), contrastant avec le métabolisme photoautotrophe des cellules en phase planctonique. En phase benthique, les cellules chargées en gouttelettes lipidiques finissent par se détacher du biofilm. L'accumulation de ces cellules en surface forme la phase épipélagique, aussi appelée crème flottante (Robert, 1973 ; Turpin, 1999). Plusieurs hypothèses quant à leur devenir ont été avancées. La première, majoritairement admise, considère que les cellules dégènèrent et sédimentent dans le fond des bassins. La deuxième, possible, mais difficilement observable, suggère que lorsque les conditions se réunissent, ces cellules puissent redémarrer un cycle de production de marennine, ou, si les cellules ont atteint la maturité, entrer en phase de reproduction sexuée.

Le ou les évènements moteurs de cette dynamique pélogo-benthique sont encore mal compris. Il est supposé que la stabulation de l'eau des claires entre deux marées hautes serait à l'origine de l'entrée en phase transitoire des cellules, en entraînant un rythme semi-continu d'apport nutritionnel (Robert, 1973 ; Turpin, 1999). Ainsi, l'existence de ces cycles tiendrait principalement du rythme des marées lorsque les conditions de températures et d'éclairement sont optimales. La remise en suspension des cellules lors de l'apport d'eau, et leur sédimentation une fois l'épisode de turbulence terminé justifient ainsi l'appellation tychopélagique (« Tycho » du grec ancien *τύχων, τύκῆον*, signifiant « Chanceux ») du cycle. Cependant, la distinction de la phase phytoplanctonique et de la phase benthique du cycle écophysologique de *H. ostrearia* se retrouve à plusieurs échelles. Les différences observées au niveau de la composition de la phycosphère des cellules, de leur ultrastructure et de leur état physiologique suggèrent que la remise en suspension aléatoire dans la colonne d'eau ne serait pas un évènement anodin pour la biomasse cellulaire. En effet, en plus de l'observation

de cellules chargées en marennine majoritairement dans la phase benthique, les populations phytoplanctonique et benthique se distingue du point de vue de leurs métabolomes et de la composition de leurs phycosphères (Lépinay *et al.*, 2016, 2018). Ces observations suggèrent que le consortium symbiotique entre *H. ostrearia* et la communauté microbienne l'entourant verrait sa dynamique impactées au gré de la variabilité des paramètres environnementaux. Ces modifications pourraient expliquer les changements métaboliques observés chez *H. ostrearia* (Neuville, 1974 ; Rech, 2008 ; Robert *et al.*, 1981) d'une phase du cycle écophysologique à l'autre. Une des hypothèses concernant cette hétérogénéité marquée d'une population de *H. ostrearia* en claires ostréicoles pourrait être liée à la formation de biofilm des individus sédimentés. La multiplication cellulaire engendrerait la présence, en surface de ce biofilm, d'individus résultants de la mitose, n'ayant pas encore accumulé de marennine, et moins attachés à la matrice du biofilm, plus prône à être remise en suspension. Il est important de noter que ce cycle écophysologique tycho-pélagique n'a été jusqu'à présent observé que dans les claires ostréicoles, et que cette dynamique résulte potentiellement de l'écosystème complexe et spécifique s'y trouvant. Du fait de son aspect aléatoire, il semble peu profitable de chercher à le reproduire en culture industrielle contrôlée. En revanche, elle démontre la plasticité et la capacité d'adaptation de *H. ostrearia* à un environnement fluctuant, ainsi que l'importance que peut avoir la périodicité des conditions dans le maintien en vie d'une population de *H. ostrearia*, et sa productivité en marennine.

En milieu naturel, *H. ostrearia* a principalement été observée sous forme de biofilm, repérable à sa couleur bleue, dans des eaux peu profondes et calmes (Seveno *et al.*, 2023). Il n'est cependant pas exclu que l'absence d'observation du comportement planctonique de *H. ostrearia* résulte de la rareté de l'évènement, sachant que de tels comportements ont pu être décrits pour des espèces du genre *Haslea*, comme *H. gigantea* (Hustedt) (Gastineau *et al.*, 2016). Concernant la phase benthique, des travaux récents ont permis de décrire l'enchaînement des évènements menant à une efflorescence, pour des espèces de diatomées bleues (Seveno *et al.*, 2023). Ainsi, dans des eaux de salinité d'environ 39 PSU, calmes et peu profondes, les efflorescences de *Haslea spp.* apparaissent à la suite de l'efflorescence du phytoplancton. L'hypothèse avancée serait alors que la sédimentation de matières organiques

mortes suivant l'efflorescence phytoplanctonique soit minéralisée par les bactéries du benthos, ce qui, combiné à l'augmentation de l'irradiance, favoriserait la multiplication rapide de la population de *Haslea spp.* en milieu naturel.

2.6 Valorisation de *Haslea ostrearia*

Si *H. ostrearia* offre de nombreuses possibilités de valorisation, sa production de marennine reste la plus étudiée, et est au cœur de cette étude. Cependant, dans un soucis d'optimisation des ressources énergétiques utilisées pour la culture de microalgues, il est aujourd'hui encouragé de valoriser un maximum des co-produits de celle-ci. D'autant plus que la capacité de *H. ostrearia* à externaliser naturellement sa production de marennine représente un avantage notoire quant à la possibilité de valoriser le reste de la biomasse restée intacte.

2.6.1 Frustule

Le frustule des cellules de diatomées suscite un intérêt grandissant, et ce dans de nombreux domaines, faisant de ce co-produit de la production des diatomées l'un des plus prometteurs (Lebeau et Robert, 2003). Le secteur biomédical notamment, cherche à utiliser ces polymères de silice pour leurs propriétés physico-chimiques compatibles avec la délivrance précise de molécules thérapeutiques dans l'organisme. La fabrication de tels polymères étant extrêmement coûteuse, des structures naturellement produites comme le frustule des diatomées présenteraient un avantage considérable pour poursuivre le développement de tels outils biomédicaux (Maher *et al.*, 2019). Le frustule des diatomées peut également être valorisé comme agent de décontamination d'eaux polluées (Savio *et al.*, 2022). L'utilisation de ces nanostructures trouve aussi des applications comme agent filtreur dans de nombreux domaines (Parkinson et Gordon, 1999). Les propriétés optiques de cette coquille de silice peuvent également servir de filtres UV ou bien de matériau conducteur, améliorant les performances des panneaux solaires (Ghobara *et al.*, 2019). Les propriétés abrasives et décolorantes associées aux poudres de silice pourraient également s'appliquer

au frustule et promouvoir son utilisation dans des secteurs comme celui de la cosmétique (Lebeau et Robert, 2003 ; Parkinson et Gordon, 1999). La valorisation du frustule apparaît donc comme une option intéressante pour maximiser l'utilisation des différents produits d'une culture de diatomées telle que *H. ostrearia*.

2.6.2 Biobrut

Les microalgues et particulièrement les diatomées sont recherchées pour leur production d'acides gras (Cointet, 2019 ; Lebeau et Robert, 2003). L'obtention d'une production suffisante à une valorisation économiquement envisageable requiert, cependant, des conditions de cultures spécifiques. Même dans de telles circonstances *H. ostrearia* n'est pas la souche la plus pertinente en termes de productivité lipidique (Cointet, 2019). En revanche, une valorisation du carbone organique contenu par la biomasse totale pourrait être moins contraignante et donc plus intéressante. Celui-ci peut être transformé en biopétrole brut, aussi appelé « biobrut » (Wang et Seibert, 2017). Cette huile brute peut être obtenue à partir de la biomasse humide, par liquéfaction hydrothermale (*Hydrothermal liquefaction HTL*) du contenu protéique, des lipides et des polysaccharides contenus dans la biomasse récoltée. Les avancées concernant le raffinage de cette huile brute sont prometteuses (Peng *et al.*, 2020 ; Zhang *et al.*, 2022b), rendant intéressante la perspective de valorisation des coproduits d'une production de marennine dans le domaine énergétique.

2.6.3 Substances polymériques extracellulaires

Les diatomées sont connues pour leur production de substances polymériques extracellulaires (EPS). La production d'EPS varie d'une espèce à l'autre et selon les conditions environnementales dans lesquelles se développent les diatomées (Gügi *et al.*, 2015). Si cette variabilité complique la caractérisation précise de cette production, il est cependant admis que chez les diatomées, ces EPS se composent en majorité de polysaccharides, en plus petites proportions de peptides, et que les lipides n'y sont pas retrouvés (Xiao et Zheng, 2016). La composition en EPS d'un surnageant de culture de

diatomées sera grandement influencée par les conditions de cultures de celle-ci (Underwood *et al.*, 2004), et dans le cadre de la production de *H. ostrearia*, très peu d'études ont été menées concernant la nature des coproduits de la marennine retrouvés dans le surnageant de culture (Bélanger *et al.*, 2020, *soumis*, Chehour, *soumis*). Pourtant, les nombreuses études cherchant à caractériser la production d'EPS d'autres espèces de diatomées d'intérêt ont rapporté les multiples bioactivités associées à ces biomolécules. Ces activités, notamment antitumorales, antivirales et antibactériennes (Xiao et Zheng, 2016), font de ces macromolécules des produits potentiellement valorisables aussi bien dans le domaine biomédical qu'en aquaculture en passant par l'agroalimentaire. Ces études sont encourageantes dans le cadre d'une valorisation des coproduits d'une production de marennine, mais démontrent la nécessité au préalable d'effectuer une caractérisation de la production d'EPS propre à une combinaison de procédés de culture et de raffinage. En effet, l'influence des conditions de culture et de production sur la qualité des EPS (Underwood *et al.*, 2004), et la complexité concernant les relations structure-fonction des EPS et de leur bioactivité (Ale *et al.*, 2011 ; Andrew et Jayaraman, 2020 ; Gügi *et al.*, 2015 ; Xiao et Zheng, 2016) pourrait complexifier la valorisation de produit de qualité stable.

2.6.4 Pigments photosynthétiques

Si la marennine extracellulaire reste le pigment d'intérêt concernant la culture de *H. ostrearia*, la récupération de la biomasse microalgale en parallèle de sa production pourrait donner lieu à la récupération d'autres pigments à haute valeur économique retrouvés chez cette diatomée. La fucoxanthine est le pigment chloroplastique suscitant le plus d'intérêt dans la valorisation des diatomées (Bayu *et al.*, 2020). Ce pigment de la famille des xanthophylles est particulièrement recherché pour son potentiel d'utilisation en tant qu'aliment fonctionnel du fait de ses bioactivités anti-obésité, antioxydante, antidiabétique, anti-angiogénique et anti-métastatique (Bayu *et al.*, 2020). Ce pigment est principalement obtenu à partir de macroalgues brunes, mais son obtention à partir de microalgues brunes (*i.e.* les diatomées) présenterait l'avantage de ne pas dépendre des saisons, mais principalement de la productivité de la souche choisie dans les conditions de cultures préalablement déterminées. De plus,

certaines espèces de diatomées ont démontré des productivités spécifiques 10 à 20 fois plus importantes que celle des macroalgues brunes actuellement utilisées comme sources de fucoxanthine (Bayu *et al.*, 2020). La faisabilité économique d'une telle extraction chez *H. ostrearia* reste à vérifier, sa production de fucoxanthine n'ayant pas été étudiée dans un objectif de valorisation (Mouget *et al.*, 1999, 2004). Ces travaux laissent à penser que *H. ostrearia* pourrait tout de même atteindre des performances au moins équivalentes à celles des macroalgues brunes les plus productives (Bayu *et al.*, 2020). En effet, une productivité spécifique allant de 2 à 8 mg.g⁻¹ matière sèche de fucoxanthine, a pu être relevée selon l'intensité et la qualité lumineuse de l'environnement (avec pour *H. ostrearia*, 1 g_{matière sèche} éq. à 800 x 10⁶ cell, d'après Nghiem-Xuan, 2019).

3. LA MARENNINE

3.1 Nature

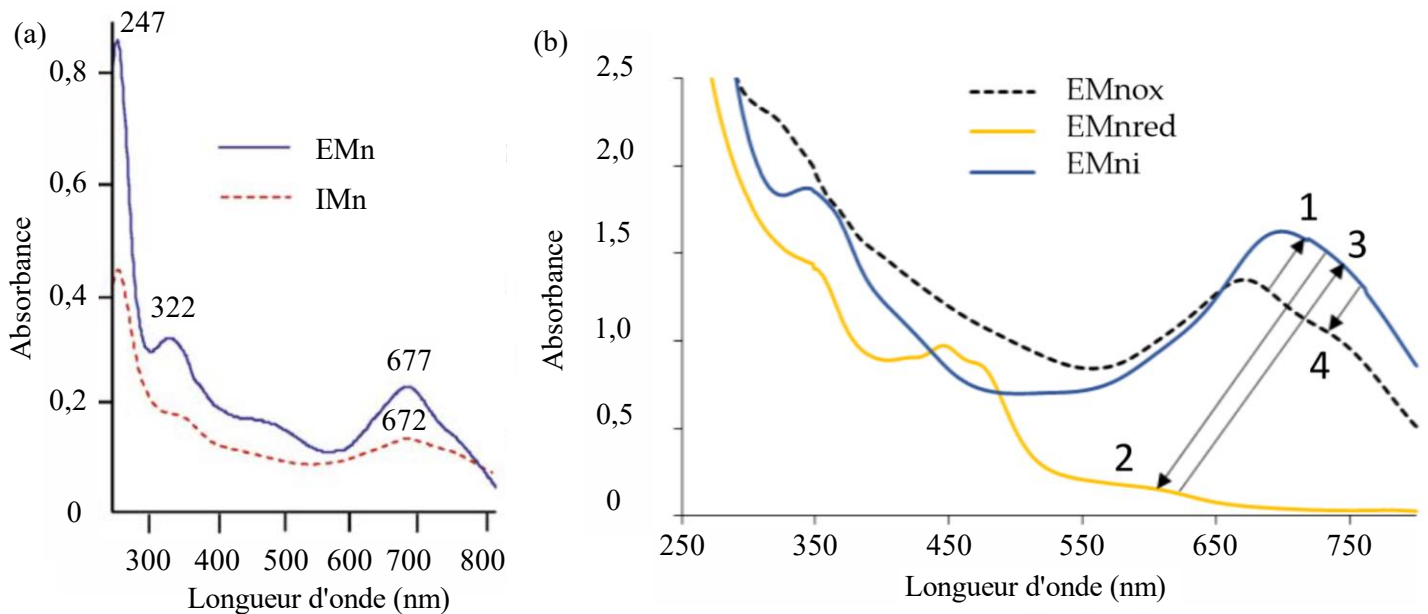


Figure 9 : Spectres d'absorbance de la marennine intracellulaire (IMn) et extracellulaire (EMn). (a) Spectres d'absorbance UV-Visible de la marennine intracellulaire et extracellulaire purifiée, montrant les différentes bandes caractéristiques de l'IMn et de l'EMn (extrait de Pouvreau, 2006) ; (b) spectres d'absorbance de l'EMn selon son stade d'oxydation. EMnox : stade oxydé, EMni : stade intermédiaire, EMnred : stade réduit de l'EMn, les flèches numérotées indiquent l'enchaînement des stades lors d'une réaction d'oxydoréduction (extrait de Francezon *et al.*, 2021)

La marennine, pigment hydrosoluble, polyanionique, non photosynthétique produit par *H. ostrearia*, existe sous deux formes distinctes (Pouvreau, 2006). La marennine intracellulaire (IMn) fait référence au pigment lorsque ce dernier est stocké au niveau des apex des cellules, dans des vésicules acides (Nassiri *et al.*, 1998). Son poids moléculaire, obtenu à partir de l'extrait purifié, est de 10751 Da et son spectre d'absorbance UV-visible à pH 8.0 montre deux pics : un à 247 nm et le second, à l'origine de son apparence bleu-vert, à 672 nm (Figure 9a). La marennine extracellulaire (EMn) correspond, quant à elle, à la version externalisée de ce pigment. Le poids moléculaire de l'extrait purifié est réduit à 9893 Da, et son spectre d'absorbance UV-visible, relativement à l'IMn, révèle un pic supplémentaire à 322 nm (Figure 9a). La marennine présentant un comportement halochromique, selon le pH de son environnement, le spectre d'absorbance du chromophore change, faisant évoluer la couleur apparente de la molécule. Les travaux de Francezon *et al.* (2021) ont notamment permis de relier ces changements de couleur au niveau d'oxydation de la molécule (Figure 9b).

La nature de ce pigment et de son chromophore ont longtemps fait débat, mais les récents travaux de Zebiri *et al.* (2023) et de Yusuf *et al.* (2023) concluent sur la nature principalement polysaccharidique de ce pigment atypique. Il s'agirait d'un hétéropolysaccharide, composé d'environ 50 unités de monosaccharides, dans lesquelles se retrouve en majorité du galactose, rhamnose, xylose et en plus faibles proportions du mannose et du fucose. Si l'étude de Zebiri *et al.* (2023), se basant sur le résultat d'une hydrolyse chimique, ne permet pas de détecter la présence de glucose, celle de Yusuf *et al.* (2023), partant d'une hydrolyse enzymatique de la marennine, suggère la présence d'unités 1-3- β -glucan. Les travaux de Zebiri *et al.* (2023) suggèrent également un fort niveau de ramification du polysaccharide et soutiennent la présence de groupements acétyle. La présence de groupements sulfatés, souvent retrouvés chez les EPS des diatomées (Xiao et Zheng, 2016), reste encore à vérifier. Elle est suggérée par les travaux de Bélanger *et al.* (*soumis*), mais les conditions d'hydrolyse utilisées par Zebiri *et al.* (2023) lors de l'étude de la structure de la marennine n'ont pas permis d'en détecter. Enfin, si l'étude des extraits de marennine purifiés (IMn et EMn) a défini un poids moléculaire autour de 10 kDa, l'étude de

sa purification par Pouvreau *et al.* (2006b) et avant lui Vandanjon *et al.* (1999) a mis en lumière sa nature polydispersée (Figure 10). L'origine de celle-ci reste encore inconnue, et pourrait résulter de différents niveaux de polymérisation du pigment lui-même comme d'une agrégation par liaisons non covalentes de la marennine avec d'autres polymères retrouvés en solution. Ainsi, il est couramment admis que la fraction principale de la marennine est retrouvée entre 3 et 30 kDa (Pouvreau *et al.*, 2006b).

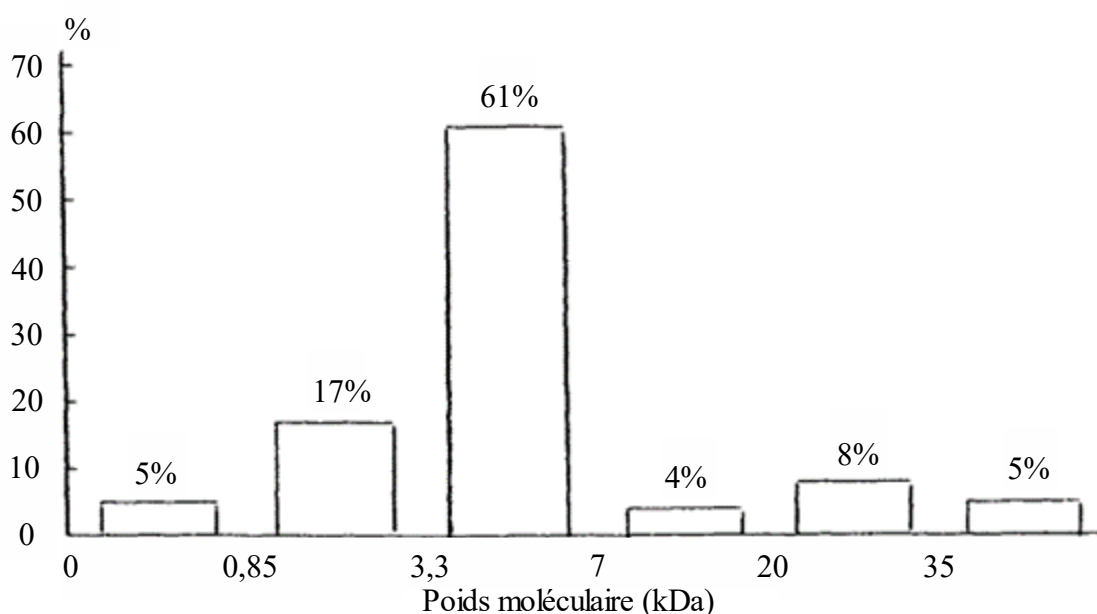


Figure 10 : Profil de polydispersion de la marennine. Histogramme de répartition (%) du poids moléculaire de la marennine (extrait de Vandanjon *et al.* 1999).

Concernant l'origine de la couleur de la marennine, celle-ci reste encore à déterminer. Les travaux de Zebiri *et al.*, 2023 ne permettent pas la détermination avec certitude de sa nature, et la séparation de l'origine de la couleur du reste de la molécule reste encore à l'étude. Cependant, les hypothèses des différentes études gravitant autour de la marennine semblent converger vers la présence d'un chromophore, relié de manière covalente ou par l'intermédiaire de liaison de Van der Waals, à un squelette polysaccharidique. En effet, si une couleur bleue peut provenir de la présence de métaux, la détection de structures phénoliques par Pouvreau *et al.* (2006a) ainsi que l'observation de signaux, certes faibles,

mais suggérant la présence de cycles aromatiques lors des analyses structurales menées par Gastineau *et al.* (2014), Yusuf *et al.* (2023) et Zebiri *et al.* (2023), laissent à penser qu'une molécule aromatique pourrait être à l'origine de la couleur de la marennine. Cette hypothèse est également soutenue par l'étude des propriétés halochromiques de la marennine portée par Francezon *et al.* (2021), qui s'expliquerait alors par le niveau d'oxydation du chromophore (Figure 9b). Ainsi la forme réduite de la marennine apparaîtrait jaune, la forme oxydée correspondrait à sa forme native bleu-vert, *i.e.* telle que retrouvée dans son milieu naturel à $\text{pH} \approx 7.8$. La forme intermédiaire apparaîtrait, elle, à un $\text{pH} 4$ d'un bleu plus clair que la forme native, et correspondrait à la forme retrouvée dans les vésicules intracellulaires de *H. ostrearia* (Francezon *et al.*, 2021 ; Nassiri *et al.*, 1998).

3.2 Biosynthèse et devenir de la marennine

Lorsqu'il s'agit d'expliquer la production de marennine, il est essentiel de faire la distinction entre la synthèse de la forme intracellulaire (IMn) et l'externalisation de la forme extracellulaire (EMn). Ainsi, le bleuissement des diatomées *H. ostrearia* résulte de



Figure 11 : Observation au microscope optique d'une vésicule chargée en marennine (en bas à gauche) retrouvée dans le milieu de culture après son externalisation d'une cellule de *H. ostrearia*. Barre d'échelle = 15 μm .

l'accumulation, au niveau des apex des cellules, de la forme intracellulaire de la marennine (IMn) (Nassiri *et al.*, 1998 ; Pouvreau, 2006). Si la ou les voies métaboliques à l'origine de la synthèse d'IMn ne sont pas encore définies, la structure hétéropolysaccharidique de la marennine suggère un lien entre sa synthèse et les voies métaboliques à l'origine de la production d'exopolysaccharides (Gügi *et al.*, 2015). Suivant cette logique, il est probable que les vésicules de marennine suivent la même voie d'externalisation que les EPS, excrétées au niveau du raphé (Robert *et al.*, 2002). Au moment de l'excrétion, les vésicules observées dans l'environnement aqueux (Figure 11) finissent par se rompre, libérant la marennine. Le changement d'environnement résultant de cette externalisation pourrait être à l'origine des différences observées entre l'IMn et l'EMn. À cette voie active d'excrétion de la marennine, s'ajoute une voie passive potentielle : le relargage de marennine intracellulaire, encore en voie de synthèse ou non, au moment de l'ouverture du frustule, soit au moment de la multiplication végétative et au moment de la mort cellulaire (Bornet et Chatin, 1895 d'après Pouvreau *et al.*, 2006a).

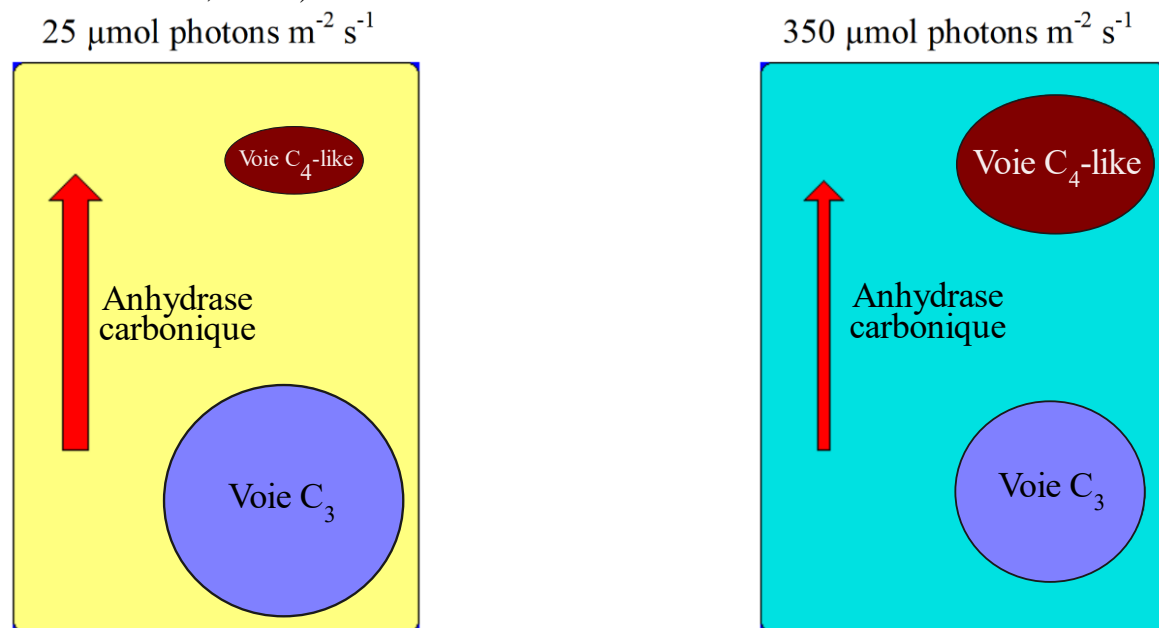


Figure 12 : Impact de l'intensité lumineuse sur l'assimilation du carbone inorganique par *H. ostrearia*, et lien avec sa production de marennine. Une faible intensité lumineuse (c.-à-d. $25 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$) n'entraîne pas de production de marennine, tandis qu'une forte intensité lumineuse (c.-à-d. $350 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$) entraîne un bleuissement des cellules, donc une production et une accumulation de marennine intracellulaire (extrait de Rech, 2004).

En distinguant synthèse et excrétion de la marennine, deux dynamiques de production peuvent être étudiées, et une nouvelle lecture des travaux étudiant le déterminisme de la production de marennine peut être effectuée. Ainsi, les conclusions de Gastineau *et al.* (2014) et Rech (2004, 2008) soulignent la corrélation entre la quantité d'IMn chez *H. ostrearia* et l'intensité lumineuse, associant la synthèse de marennine au métabolisme primaire de la photosynthèse tout en soulignant le lien entre le bleuissement des cellules et le changement de stratégie d'incorporation du carbone inorganique (Rech, 2008) (Figure 12). La synthèse de l'IMn résulterait alors d'une adaptation de type C4 du métabolisme primaire à son environnement lumineux. En ce qui concerne l'excrétion du pigment, il a été observé que des conditions favorisant la formation de biofilm pouvaient intensifier son externalisation (Lebeau *et al.*, 1999 ; Rincé *et al.*, 1999). L'intensification de la production d'EPS associée à la production de biofilm viendrait alors justifier l'externalisation accrue d'EMn. La logique voudrait qu'un stress entraînant une mortalité cellulaire importante puisse également donner lieu à un relargage d'EMn dans l'environnement de manière passive. Si ces deux causes ont d'apparence la même conséquence du point de vue de la production en marennine, dans un contexte de culture cellulaire, elles nécessitent deux gestions différentes. L'externalisation active d'EMn serait compatible à une culture continue, tandis qu'un relargage passif conviendrait mieux au mode de culture en batch ou semi-continu. Le choix du mode de culture n'est pas anodin, la qualité finale de l'extrait de marennine obtenue étant susceptible d'en être affectée. En effet, la production d'EPS, dont la marennine fait partie, par les diatomées est reconnue pour être modulée selon les conditions de culture de celles-ci (Gügi *et al.*, 2015 ; Myklestad *et al.*, 1989 ; Myklestad et Haug, 1972 ; Pierre *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2015 ; Xiao et Zheng, 2016).

Il faut également noter que l'état des connaissances actuel ne permet pas de différencier l'EMn produite par voie active ou provenant d'une autre voie d'externalisation. Pourtant l'importance de la voie d'externalisation et de conditions physiologiques de la production des exopolysaccharides sur la composition de leur squelette polysaccharidique a déjà fait l'objet de discussions (Gügi *et al.*, 2015 ; Underwood *et al.*, 2004) et ces modifications structurales pourraient s'appliquer à l'EMn. En empruntant différentes voies, dans des

conditions physiologiques différentes, des changements au niveau du squelette polysaccharidique de l'EMn peuvent être attendus tout comme la nature et la quantité des co-produits, autres EPS par exemple, retrouvés dans le surnageant de culture. Il est donc tout à fait envisageable que, ce qui est perçu comme un seul et même pigment dans l'environnement de *H. ostrearia*, puisse observer une certaine variabilité chimique et structurale. Cette variabilité pourrait avoir un impact direct sur les nombreuses activités biologiques reconnues de ce pigment. En effet, leurs origines chimiques et structurales restent pour le moment inconnues, et la littérature existante sur la structure du pigment ne permet aucune certitude à ce sujet. De plus, le lien structure-activité des EPS des diatomées est réputé très complexe (Xiao et Zheng, 2016). D'une part, les activités associées à ces molécules pourraient soutenir le rôle actif du squelette polysaccharidique de la marennine dans ses bioactivités (Xiao et Zheng, 2016 ; Zhang *et al.*, 2017). D'autre part, la présence supposée d'un chromophore pourrait également expliquer ces activités, de telles structures ayant souvent été associées aux activités retrouvées chez la marennine (Begum *et al.*, 2016 ; Bouarab-Chibane *et al.*, 2019 ; Perron et Brumaghim, 2009 ; Pouvreau *et al.*, 2008a ; Walsh *et al.*, 2019 ; Zeb, 2020). L'impossibilité à l'heure actuelle d'étudier séparément ces deux sous parties de la marennine complexifie l'étude de l'origine structurale et chimique des bioactivités de ce pigment.

3.3 Activités biologiques de la marennine et rôles supposés pour *Haslea ostrearia*

Si la rareté de la couleur bleue dans la nature (Newsome *et al.*, 2014) rend l'existence de la marennine intrigante, les questionnements concernant l'avantage évolutif apporté à *H. ostrearia* par la marennine, justifiant sa préservation à travers l'évolution, restent en suspens. Pourtant, comprendre la ou les causes de la production de ce pigment est une étape clé pour l'optimisation de sa production. Les différentes études visant à répondre à cette question laissent paraître la marennine comme un pigment multifonctionnel, permettant aux *Haslea* de se développer dans des écosystèmes spécifiques, comme les claires ostréicoles. Cette multifonctionnalité se traduit d'une part par ses activités biologiques antibactériennes, antivirales, antifongiques et antioxydantes qui offrent un avantage à *H. ostrearia* en réduisant notamment la pression de compétition avec les autres micro-organismes cherchant à occuper

la même niche écologique (Bergé *et al.*, 1999 ; Falaise *et al.*, 2019b ; Gastineau *et al.*, 2014 ; Permatasari *et al.*, 2019 ; Pouvreau *et al.*, 2006a, 2008a ; Prasetya *et al.*, 2021). Ces mêmes activités biologiques apporteraient également un avantage pour les macro-organismes, comme les bivalves, se trouvant à proximité. Le mucus de ces derniers pourrait entretenir la biomasse phytoplanctonique de l'écosystème, créant indirectement une interaction réciproquement bénéfique entre les bivalves et *Haslea* (Falaise *et al.*, 2019a ; Gastineau *et al.*, 2014 ; Laurent et Cognie, 2000 ; Prasetya *et al.*, 2020a ; Robert *et al.*, 1981 ; Turcotte *et al.*, 2016). Ainsi la marennine pourrait expliquer la prépondérance, dans ces bassins ostréicoles, de ces diatomées alors favorisées par rapport au reste des phytoplanctons (Turpin, 1999). D'autre part vient s'ajouter l'effet d'ombrage entraîné par la présence d'EMn dans l'environnement, venant freiner le développement des autres espèces phytoplanctoniques présentes. En modifiant cette fois les paramètres physiques de l'environnement, *Haslea* réduit une nouvelle fois la pression de compétition de son environnement biotique (Pouvreau *et al.*, 2007 ; Tremblin *et al.*, 2000). Ce faisant, l'EMn modifie la qualité, mais également la quantité de lumière incidente. Si cela n'empêche pas le développement de *H. ostrearia*, ce mécanisme est suspectée de participer à la stratégie d'auto-ombrage de ces diatomées, qui cherchent à se protéger d'un surplus d'énergie lumineuse retrouvé dans des bassins extérieurs peu profonds comme les claires (Turpin, 1999). Enfin, la marennine ferait partie de la catégorie des composants allélochimiques, des études ayant démontré l'existence d'effets allélopathiques de la marennine envers d'autres microalgues, dont la nature et l'intensité dépendent de l'espèce co-cultivée (Pouvreau *et al.*, 2007 ; Prasetya *et al.*, 2016). Ainsi, la littérature suggère que la synthèse et l'externalisation de la marennine pourraient principalement résulter de l'environnement lumineux et biotique de *H. ostrearia*.

3.4 Valorisation de la marennine

La marennine reste la principale voie de valorisation de *H. ostrearia*, car la rareté d'un tel pigment dans la nature a retenu l'intérêt de la recherche depuis plus de 150 ans. L'élucidation de sa structure, de son rôle *in situ*, et de ses potentielles activités biologiques ont été au cœur des travaux menés sur les diatomées du genre *Haslea*. L'intérêt porté à la

marennine ne se limite plus au verdissement des huîtres, mais touche à présent de nombreux secteurs allant de l'aquaculture, à la pharmacologie, en passant par l'industrie cosmétique et agroalimentaire. Cet intérêt grandissant résulte de ses nombreuses activités biologiques compatibles aux enjeux actuels (Gastineau *et al.*, 2014). En aquaculture, la recherche d'alternatives aux antibiotiques de synthèse pousse au développement de solutions naturelles, et la marennine en se plaçant dans la catégorie des postbiotiques apparaît comme une bonne candidate (Bondad-Reantaso *et al.*, 2023). Elle pourrait freiner le développement des pathogènes du genre *Vibrio* dans les cultures de bivalves, et ce par des mécanismes non bactéricides, mais bactériostatiques, limitant l'émergence de résistance chez les bactéries (Bouhleb *et al.*, 2021 ; Falaise *et al.*, 2019b ; Permatasari *et al.*, 2019 ; Tardy-Laporte *et al.*, 2013). Toujours en aquaculture, la marennine pourrait avoir un effet prophylactique sur les larves de certains bivalves, comme démontré sur *Mytilus edulis* et *Plactopecten magellanicus*, en améliorant leur taux de survie en présence de *Vibrio* et ce, à faible concentration (*i.e.* 0,1 mg.L⁻¹) (Latour *et al.*, 2023 ; Turcotte *et al.*, 2016). En cosmétique, la volonté de réduire le coût énergétique derrière la synthèse de principes actifs, ainsi que de répondre à la demande grandissante de produits d'origine naturelle, encourage ce secteur à utiliser des actifs naturels, et la marennine, par son pouvoir colorant, ses activités antiprolifératives, et antioxydantes, pourrait répondre aux demandes de ce secteur (Carbonnelle *et al.*, 1999 ; Gastineau *et al.*, 2012 ; Pouvreau *et al.*, 2006a, 2008b). L'utilisation de molécules actives produites par les microalgues est d'autant plus intéressante que l'utilisation de microalgues comme bioraffinerie donne accès à de meilleures productivités de molécules d'intérêt et ne nécessite pas de terres arables à sa mise en place, en comparaison à la culture de plantes terrestres (Benedetti *et al.*, 2018). Dans le cas de *H. ostrearia* s'ajoute sa capacité à externaliser naturellement un pigment bleu, un avantage non négligeable pour réduire le coût de purification de ce composant. Le secteur de l'alimentation humaine pourrait également s'intéresser à la marennine comme ingrédient fonctionnel, d'autant que la consommation de ce pigment par le biais des huîtres fines de claire vertes se faisant depuis plusieurs siècles, n'a été associée à aucune toxicité (Gastineau *et al.*, 2014). Finalement, d'autres propriétés, comme l'activité antiproliférative de la marennine contre

certaines lignées de cellules cancéreuses, ou encore des propriétés anticoagulantes restent à explorer, pouvant susciter l'intérêt de la recherche médicale (Bergé *et al.*, 1999 ; Carbonnelle *et al.*, 1999 ; Falaise, 2019 ; Gastineau *et al.*, 2012 ; Pouvreau, 2006).

4. LE DEFI DE LA PRODUCTION DE MARENNINE

4.1 Culture de *Haslea* et production de marennine

4.1.1 Production

Le principal frein à la valorisation de la marennine se trouve dans la difficulté à maîtriser sa production. En milieu naturel, sa productivité connaît de grandes irrégularités au fil des saisons, en dépendant directement des périodes d'efflorescence de *H. ostrearia* dans ces bassins (Turpin, 1999). Pour permettre une valorisation de la marennine, des solutions sont à l'étude pour parvenir à produire de manière stable et en quantité suffisante de l'eau bleue, surnageant de culture contenant la marennine extracellulaire, mais deux éléments viennent freiner cette optimisation. D'une part, la tendance à sédimenter de la biomasse et son comportement tychoyélagique rendent l'utilisation des photobioréacteurs classiques peu favorable pour la culture de *H. ostrearia*. Les techniques d'homogénéisation communément utilisées ne sont pas toujours adaptées à la sensibilité de la diatomée (Prasetya *et al.*, 2022) qui semble privilégier des zones de faibles turbulences pour se développer (Seveno *et al.*, 2023). D'autre part, les possibilités d'enrichissement du milieu nutritionnel sont limitées. La silice, élément essentiel au développement des diatomées du fait principalement de leur frustule, ne peut pas être retrouvée en grande concentration en solution nutritionnelle à pH biologique – entre 7 et 8 – au risque de précipiter avec les autres sels nutritifs du milieu. La silice est donc maintenue en concentration limitante, relativement aux besoins de *H. ostrearia*, réduisant les possibilités de production intensifiée de biomasse (Nghiem Xuan *et al.*, 2020). Pour contourner ces limites, plusieurs stratégies ont été employées (Figure 13). Il est important de noter que les performances de celles-ci en termes de productivité

en marennine sont difficilement comparables. En effet, les méthodes de quantifications du pigment ayant évolué en parallèle de l'optimisation des cultures, seuls les travaux publiés après ceux de Pouvreau *et al.* (2006b) utilisent la méthode standard actuelle de quantification, par suivi d'absorbance du chromophore. Si les approches d'optimisation peuvent être discutées, les comparaisons des productivités en marennine sont à prendre avec précaution.

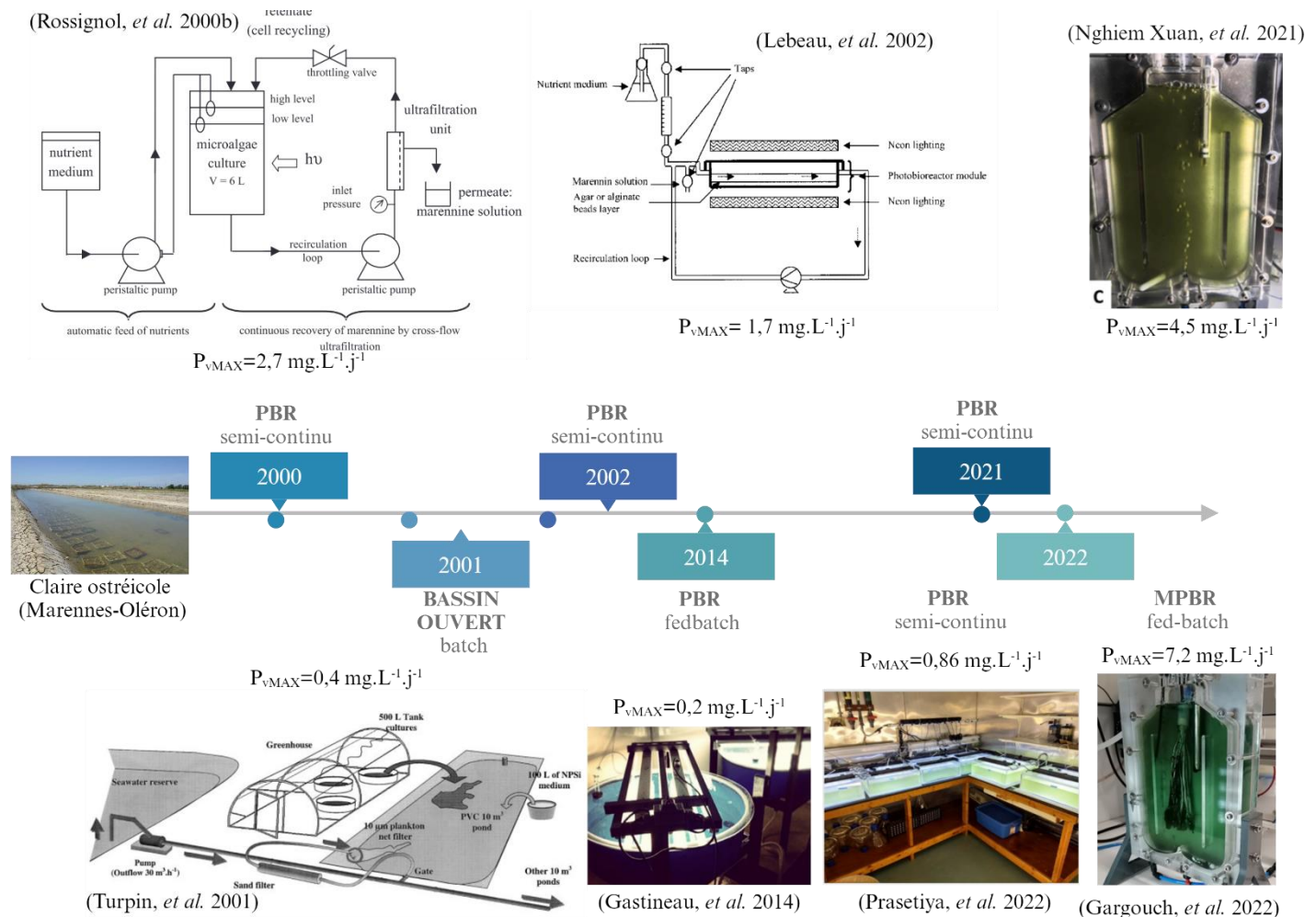


Figure 13 : Evolution des procédés de culture mis en place pour optimiser la culture de *H. ostrearia*. Les différents procédés, bassin, photobioréacteur (PBR) ou photobioréacteur à membrane immergée (MPBR), et leurs modes de fonctionnement sont associés à leurs productivités volumétriques maximales en marennine extracellulaire (P_{vMAX}) (adaptée de Nghiem Xuan, 2019).

La première stratégie, mise en place par Turpin *et al.* (2001) consiste à compenser les faibles concentrations par des volumes de culture plus importants. Pour cela, un mode

d'alimentation en fed-batch est mis en place (*i.e.* apport semi-continu de milieu de culture neuf, sans récolte de la biomasse), tout en laissant la biomasse sédimenter par l'absence d'agitation. Cette solution est facile à mettre en place, mais nécessite de grands volumes d'eau, de l'espace pour les cultures et la montée en échelle peut s'avérer particulièrement chronophage (compter 30 jours pour la montée en échelle des inocula et 10 jours de cultures en bassins).

Dans le but de réduire le volume d'eau utilisé lors de ces cultures, et garantir une robustesse des performances du procédé, le passage d'une culture en bassins extérieurs à un photobioréacteur en conditions contrôlées a été envisagé. Celui-ci donne accès à la maîtrise des paramètres environnementaux, tels que la température, le pH, la quantité et la qualité de l'éclairage, offrant la possibilité de concentrer la biomasse et donc sa production en marennine, et ainsi améliorer les productivités volumiques d'un procédé de culture. Gastineau *et al.* (2014) a mis en place une culture de 100 L maintenue sur 30 jours permettant une production contrôlée à une échelle préindustrielle. Cette approche a pour limite son mode de fonctionnement en batch obligeant la récolte de la biomasse pour récolter la production de marennine à chaque fin de culture. Lebeau *et al.* (2002) propose la culture de *H. ostrearia* fixée dans des matrices artificielles d'agar, cherchant à favoriser le développement de *H. ostrearia* sous forme de biofilm, et permettre la récolte de marennine extracellulaire en continu, sans récolte de biomasse. Si les cultures se maintiennent dans un premier temps et permettent une récolte continue d'eau bleue, l'accès aux nutriments limité par la matrice d'agar, ainsi qu'un renouvellement de la biomasse freinée par celle-ci, ne permettent pas d'envisager cette solution pour une culture continue de marennine sur le plus long terme.

Une autre approche permettant d'améliorer les productivités volumétriques en marennine d'un procédé de culture consiste à augmenter les productivités spécifiques en marennine des cellules en soulevant le verrou de la limitation en nutriments. L'une des stratégies alors envisageable repose sur le passage de culture en mode semi-continu ou continu, et consiste à renouveler le milieu nutritionnel de cette culture pour entretenir la croissance de la biomasse, repoussant la limite nutritionnelle du système de culture. Ce

renouvellement se fait sans augmenter le volume de la culture, contrairement au fonctionnement en fed-batch classique proposé par Turpin *et al.* (2001). Cependant, le faible taux de croissance de la biomasse de *H. ostrearia* demande une adaptation de ce mode de fonctionnement, qui consiste à laisser sédimenter les cellules avant la récolte du milieu de culture pour réduire la perte en biomasse à chaque renouvellement du milieu. C'est la stratégie validée lors de l'étude de Prasetiya *et al.* (2022), qui parvient à maintenir les cultures de *H. ostrearia* sur 150 jours, et à atteindre des concentrations de 10 mg.L⁻¹ de marennine extracellulaire. Toujours selon le principe du renouvellement en semi-continu du milieu de culture, des systèmes de production hybrides ont été mis en place permettant de séparer dans la chambre de culture la gestion de la biomasse de celle du surnageant de culture. Ces systèmes de culture, maintenus en mode fed-batch à volume constant, permettent de récolter l'eau bleue, sans la biomasse cellulaire, par filtration semi-continue à l'aide d'une membrane immergée dans la chambre de culture. Initialement proposé par Rossignol *et al.* (2000b) puis optimisé récemment par Gargouch *et al.* (2022), ce type de systèmes permet d'obtenir des densités de biomasse inédites pour une culture de *H. ostrearia*, et favorise ainsi la productivité volumique et spécifique en marennine du procédé. De telles performances sont également permises grâce à un milieu nutritionnel enrichi en nutriments limitants, soit la silice, l'azote et le phosphore pour la culture de *H. ostrearia* (Nghiem Xuan *et al.*, 2020 ; Turpin *et al.*, 1999). Les travaux de Nghiem Xuan *et al.* (2020) proposent une stratégie consistant à ajouter quotidiennement les nutriments les plus limitants séparément du reste du milieu de culture. Cet ajout quotidien permet d'éviter le phénomène de précipitation, et entraîne une augmentation de la productivité cellulaire en marennine, suite au rehaussement des limites nutritionnelles du milieu. Cette approche d'enrichissement, combinée au découplage de la gestion de la biomasse et de l'eau bleue, permet d'atteindre des concentrations en marennine de 30 mg.L⁻¹ en culture, et les plus hautes productivités volumétriques en marennine mesurées à l'heure actuelle, en atteignant 7,2 mg.L⁻¹.j⁻¹ (Gargouch *et al.*, 2022).

4.1.2 Raffinage

Dans un contexte de valorisation de la marennine, l'optimisation de sa production passe aussi par le choix des étapes de raffinage du pigment. Ce choix débute dès la culture de *H. ostrearia* puisqu'en ne récoltant que la marennine extracellulaire, naturellement externalisée par les cellules dans leur environnement de culture, et non la marennine intracellulaire, l'étape supplémentaire d'extraction du pigment est évitée. Une fois l'eau bleue (*blue water*, BW) récoltée, celle-ci peut être plus ou moins raffinée selon le niveau de pureté recherché. L'eau bleue correspond au surnageant de culture de *H. ostrearia* filtré à minima à 0.2 µm pour éliminer la majorité des bactéries (Cordier *et al.*, 2020 ; Yang et Nagata, 2021), et est

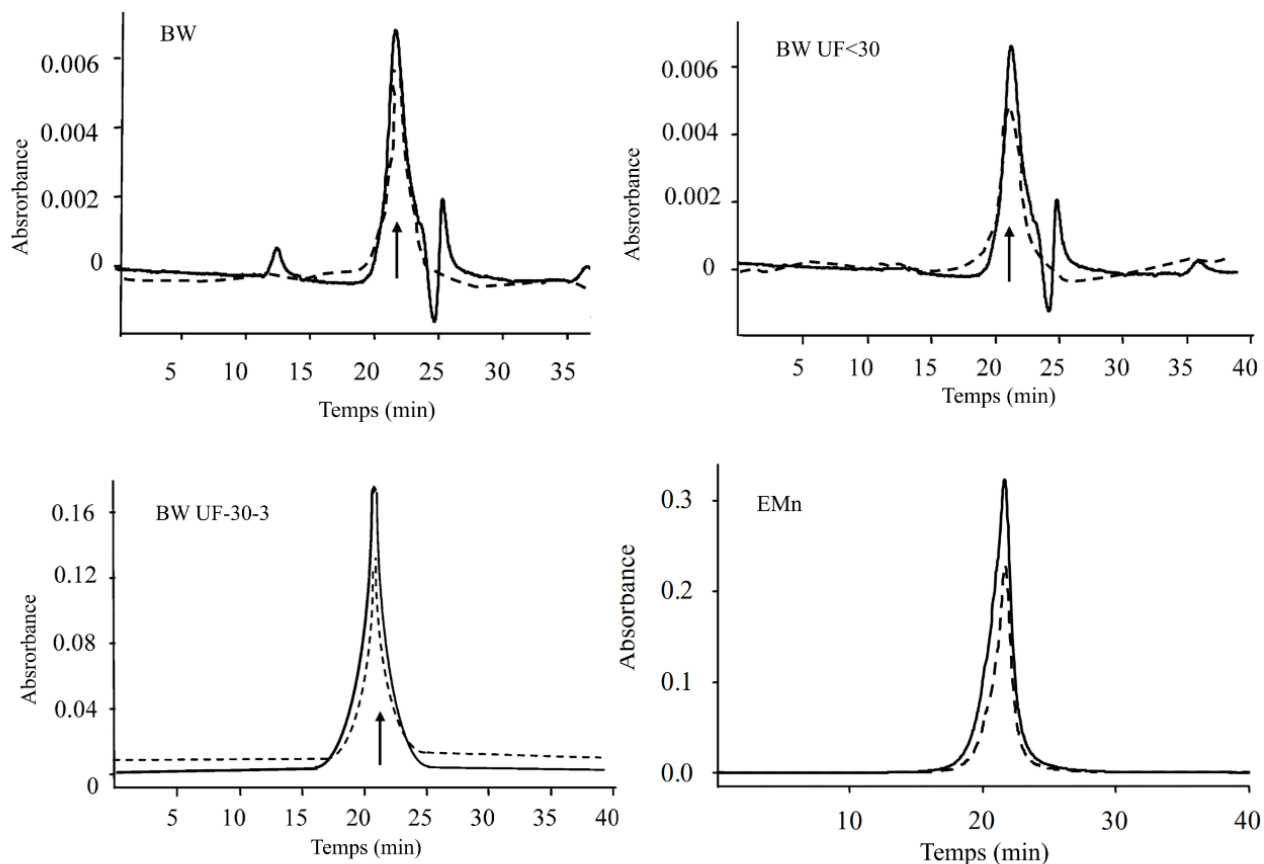


Figure 14 : Niveau de pureté de l'extrait de marennine au cours de son raffinage selon le protocole de Pouvreau, *et al.* 2006. Chromatogrammes de suivi par spectrophotométrie de l'élution sur gel HPLC de la marennine à plusieurs étapes de son raffinage. Le suivi est effectué à 280 nm (ligne) et à 674 nm (pointillé) sur l'eau bleue (BW), avant et après une ultrafiltration au seuil de coupure de 30 kDa (BW UF< 30 kDa), une diafiltration sur une membrane de seuil de coupure de 3 kDa (BW UF-30-3), puis une purification par chromatographie à échange d'anions (EMn) (adapté de Pouvreau *et al.* 2006)

considérée comme l'extrait brut de marennine extracellulaire. Pour aller plus loin dans l'extraction de la marennine sous sa forme native, une concentration et une séparation de la fraction contenant le pigment du reste du surnageant doivent être menées. À l'heure actuelle, trois approches ont été développées pour la marennine.

La première, proposée par Pouvreau *et al.* (2006b) passe par une concentration et prépurification utilisant une ultrafiltration à 30 kDa (BW UF<30) puis une diafiltration à 3 kDa (BW UF-30-3), à la suite desquelles une fraction purifiée à 90% est obtenue (Figure 14, Tableau 1). S'en suit une étape de purification de l'eau bleue concentrée par séparation sur chromatographie à échange d'anions qui permet l'obtention d'un extrait de marennine considéré comme pure (EMn) (Figure 14, Tableau 1).

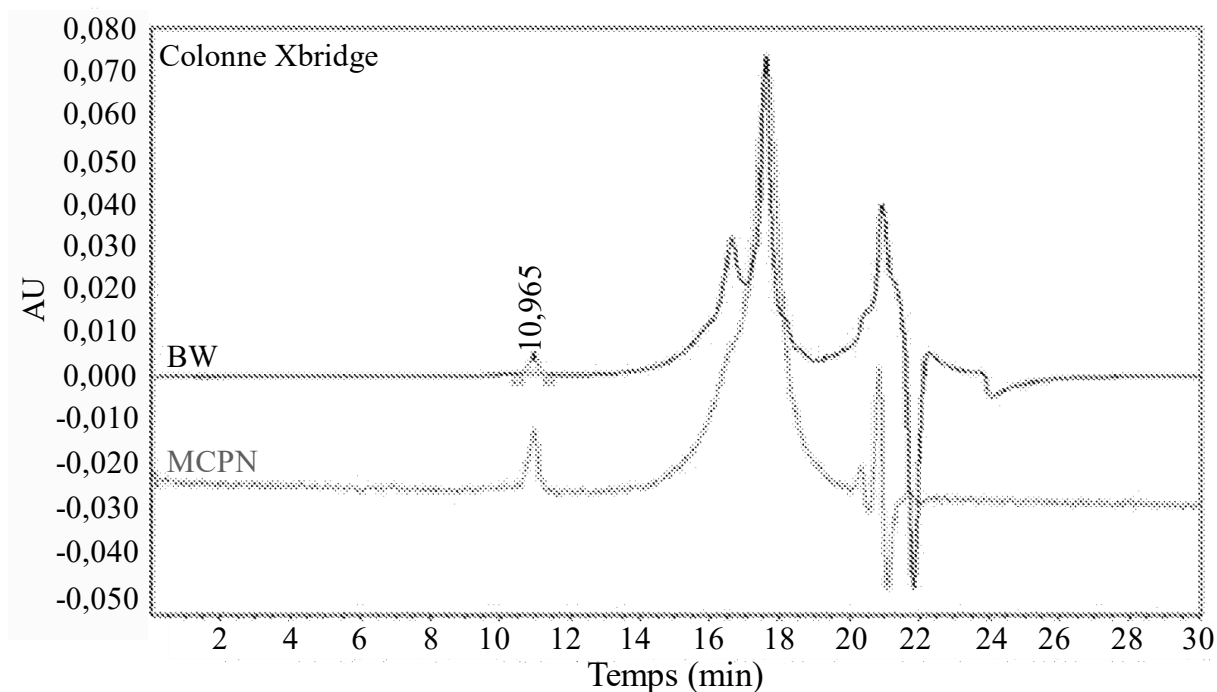


Figure 15 : Niveau de pureté de l'extrait de marennine avant et après raffinage selon le procédé d'obtention d'une solution aqueuse enrichie en pigment bleu (FR3089231A1). Chromatogramme d'élution d'une chromatographie d'exclusion de taille (SEC-HPLC) d'une solution aqueuse enrichie en pigment bleu de type marennine (MCPN) obtenue selon le procédé d'invention de Falaise *et al.* (2020) et d'une eau bleue (BW) (adapté de Falaise *et al.* (2020))

Une seconde approche de raffinage de la marennine extracellulaire est proposée par Bélanger *et al.* (2020) et base le mécanisme d'extraction et de séparation sur l'utilisation des

interactions ioniques. Cette approche débute par une séparation de la fraction bleue du reste du surnageant de culture par une extraction sur phase solide (*Solid Phase Extraction*, SPE) composée de flocons de graphite, suivie d'une désorption au butanone permettant de récupérer la fraction retenue contenant la marennine. De cette fraction hydro-organique sont séparées une fraction bleue, contenant la marennine, d'une fraction jaune, dont la composition est encore à l'étude, par le biais d'une gélotion ionotropique, utilisant les cations divalents Ca^{2+} (SPE-GCB, Tableau 1).

Enfin la troisième approche permettant de récupérer la marennine contenue dans le surnageant de culture est proposée par Falaise *et al.* (2020), et fait l'objet d'un procédé d'invention (n°FR3089231A1). Cette stratégie de raffinage se base sur une préconcentration de la fraction bleue par précipitation chimique à l'hydroxyde de sodium, suivie d'une solubilisation de la phase pigmentée précipitée, une dialyse, et double ultrafiltration à 30 et 1 kDa (Figure 15).

Tableau 1 : Ratios d'absorbance des longueurs d'onde (nm) caractéristiques de la marennine. Comparaison des extraits de marennine obtenus par double ultrafiltration (UF30-3 kDa), précédé d'une extraction sur phase solide et d'une gélotion ionotropique comme proposé par Bélanger *et al.* (2020) (SPE-GCB-UF), ou suivi d'une purification par chromatographie anionique (UF-AE) comme proposé Pouvreau *et al.* (2006b). (adapté de Bélanger *et al.*, 2020)

| Méthode d'extraction de la marennine | 247/322 | 247/677 |
|--------------------------------------|-------------|-------------|
| SPE-GCB-UF | 2,60 ± 0,04 | 5,07 ± 0,13 |
| UF30-3 kDa | 2,86 ± 0,03 | 5,49 ± 0,07 |
| UF-AE | 2,63 | 3,50 |

Selon le besoin en marennine, une réflexion doit être menée sur la stratégie de raffinage choisie. Ce choix repose sur le coût financier et énergétique de l'approche, mais également sur le degré de pureté nécessaire à l'utilisation visée. En effet, une valorisation du pigment bleu dans le domaine de la médecine ou de la pharmaceutique ne demandera pas la même pureté qu'une valorisation en tant qu'intrant en aquaculture. Le choix repose finalement sur un dernier critère essentiel : l'aspect du pigment valorisé. Si le seul but est de conserver la

couleur pour se servir de la marennine comme pigment, la validation de la qualité obtenue ne sera pas la même que lorsque l'objectif est d'utiliser ce pigment pour ses bioactivités.

Tableau 2 : Résumé des différentes études menées sur la bioactivité de la marennine extracellulaire. Sont précisés la souche de *Haslea spp.* utilisée, lorsque celle-ci est connue, le système de culture utilisé pour la production, la méthode de raffinage utilisée pour préparer l'extrait. Avec BW, le surnageant de culture filtré à 0,20 µm ; CS, le surnageant de culture BW concentré d'après la méthode de Falaise *et al.* (2020) ; UF30-3, le surnageant de culture BW concentré par ultrafiltration à 30 kDa et dialysé par diafiltration à 3 kDa ; AE, l'extrait de marennine extracellulaire purifié d'après le protocole de Pouvreau *et al.* (2006b).

| Souche | Procédé de culture | Extrait | Bioactivité | Référence |
|----------------------------------|----------------------------|---------|---|---|
| <i>H. ostrearia</i> NCC 136 | PBR, batch | UF30-3 | Effet prophylactique | (Turcotte <i>et al.</i> , 2016) |
| <i>H. ostrearia</i> NCC 148.7 | FiOLE Erlenmeyer, batch | BW | Allélopathie | (Prasetya <i>et al.</i> , 2016) |
| <i>H. ostrearia</i> | PBR, batch | UF30-3 | Antibactérien | (Falaise <i>et al.</i> , 2019b, 2019a) |
| | | | Effet prophylactique | (Falaise <i>et al.</i> , 2019a) |
| | | CS | Effet sur <i>Sphaerechinus granularis</i> | (Falaise <i>et al.</i> , 2019a) |
| | | AE | Effet sur <i>Sphaerechinus granularis</i> et <i>Paracentrotus lividus</i> Cytotoxicité sur <i>Crassostrea gigas</i> et lignée cellulaire de poissons | (Falaise <i>et al.</i> , 2019a) |
| <i>H. provincialis</i> | N/A | AE | Antibactérien | (Tardy-Laporte <i>et al.</i> , 2013) |
| <i>H. ostrearia</i> | FiOLE Erlenmeyer, batch | BW | Allélopathie | (Prasetya <i>et al.</i> , 2020b) |
| Effet sur <i>Artemia salina</i> | | | | |
| <i>H. ostrearia</i> | | BW | Antioxydant | (Prasetya <i>et al.</i> , 2021) |
| <i>H. ostrearia</i> | N/A | BW | Antibactérien | (Permatasari <i>et al.</i> , 2019) |
| <i>H. ostrearia</i> NCC 136 | PBR, batch | AE | Antibactérien | (Gastineau <i>et al.</i> , 2014) |
| <i>H. ostrearia</i> | FiOLE Erlenmeyer, batch | AE | Antibactérien Antiviral Antiprolifératif Cytotoxique | (Gastineau <i>et al.</i> , 2012) |
| <i>H. ostrearia</i> NCC 148.7 | FiOLE Erlenmeyer, batch | AE | Antioxydant | (Pouvreau <i>et al.</i> , 2008a) |
| | | | Allélopathie | (Pouvreau <i>et al.</i> , 2007) |

Dans ce deuxième cas de figure, une vérification du maintien de la bioactivité à la suite du raffinage est nécessaire. À l'heure actuelle, il n'existe pas d'étude portant sur l'impact du procédé de production de la marennine sur ses bioactivités, à l'exception des travaux de Falaise *et al.* (2019a) sur l'impact de la marennine sur les organismes marins. Les différents travaux démontrant les propriétés de ce pigment n'ont pas nécessairement utilisé les mêmes approches de raffinage limitant la comparaison de leurs résultats (Tableau 2)

4.1.3 Conservation

L'étude récente de Prasetiya *et al.* (2022) permet de définir les bonnes pratiques de stockage concernant la marennine, en mettant en avant les principaux facteurs pouvant mener à une dégradation de la marennine à long terme. Ces travaux concluent sur l'importance de conserver les différents extraits à l'abri de la lumière, et à une température inférieure ou égale à 4 °C afin de limiter la dégradation du pigment bleu au cours du temps. L'état des connaissances actuelles ne permet pas de dire si les bioactivités de la marennine sont affectées de manière similaire au cours de la conservation du pigment.

4.2 Impact du système de culture et du raffinage sur la qualité des composés

Améliorer la productivité d'un composé d'intérêt ou de la biomasse est souvent une première étape. Elle permet d'envisager la faisabilité d'une production, et dans cette situation l'aspect quantitatif prévaut. Pourtant, l'aspect qualitatif du produit est tout aussi important en ajoutant de la valeur à la production. Concernant *H. ostrearia*, c'est la valorisation de la marennine en aquaculture qui semble la plus envisageable à l'heure actuelle (Gastineau *et al.*, 2014). Ce pigment bleu pourrait répondre aux enjeux du domaine en entrant dans la catégorie des postbiotiques (Bondad-Reantaso *et al.*, 2023), en protégeant les cultures de bivalves contre les épidémies de vibriose tout en limitant les dommages collatéraux d'un traitement antibactérien sur l'environnement ou la santé des consommateurs. La marennine présente la particularité de s'accumuler sur les branchies des bivalves (Gastineau *et al.*, 2014 ; Robert, 1973 ; Turpin *et al.*, 2001), un avantage naturel offrant la possibilité de créer

une barrière locale bioactive. Les activités portées par la marennine permettraient potentiellement une inhibition de la croissance bactérienne, le déclenchement de la réponse immunitaire des bivalves, et la réduction du stress oxydatif chez ces derniers (Falaise *et al.*, 2019a, 2019b ; Turcotte *et al.*, 2016). Il semble également pertinent de souligner que la marennine est retrouvée dans les claires ostréicoles, donc consommées *via* les huîtres y étant affinées, et ce, depuis de nombreuses années. Cet aspect est encourageant pour sa valorisation, réduisant les inquiétudes concernant les conséquences que pourrait avoir son utilisation en aquaculture sur la santé des consommateurs (Gastineau *et al.*, 2014).

4.2.1 Relation entre qualité et bioactivité

La production de marennine, un hétéropolysaccharide, doit répondre aux exigences de ce domaine de valorisation. Une purification complète de ce pigment n'étant pas forcément nécessaire à une telle valorisation, la notion de qualité va grandement dépendre de la préservation de l'efficacité bioactive du composé et de ses propriétés physico-chimiques. Les activités portées par les polysaccharides, comme la marennine, peuvent être influencées par leur composition en monosaccharides, la présence ou non de groupes fonctionnels, d'aglycones fonctionnels, comme le chromophore de la marennine, la nature des liaisons glycosidiques, la taille du composé et sa conformation. Les activités antioxydantes, par exemple, sont particulièrement reliées à la présence de mannose, galactose, rhamnose, xylose, acide uronique et inversement corrélées à la quantité de glucose (Drira *et al.*, 2021). D'autre part, les polysaccharides de petites tailles sont susceptibles d'une plus forte bioactivité antioxydante avec plus d'extrémités réductrices par unité de masse (Drira *et al.*, 2021). Concernant les activités antibactériennes des polysaccharides, leurs mécanismes sont très diversifiés et la compréhension des origines structurales et chimiques de celles-ci encore grandement incomplète (Rahmawati *et al.*, 2023). Le poids moléculaire est reconnu comme important dans les mécanismes anti-adhésion. Les travaux sur le chitosane démontrent que les plus petites fractions de ce polysaccharide (60–120 kDa) ont une plus forte efficacité à limiter l'adhésion de biofilm bactérien et fongique (Felipe *et al.*, 2019 ; Garcia *et al.*, 2020). De la même manière, la dépolymérisation a montré son efficacité à favoriser la solubilisation

des polysaccharides dans l'eau et ainsi améliorer leurs bioactivités (Rahmawati *et al.*, 2023). Les charges portées par les polysaccharides influencent aussi leurs activités antibactériennes. Le chitosane, un polycation, porte des charges positives résultant de la présence de groupements aminés. Ces charges lui facilitent l'accès aux parois cellulaires, à la surface desquelles les charges négatives sont prépondérantes (lipopolysaccharides et phospholipides), rendant ce polycation à même d'interagir et dégrader l'intégrité des cellules (Kong *et al.*, 2010 ; Rahmawati *et al.*, 2023). À l'inverse, des polyanions, porteurs de groupements sulfatés ou d'acides uroniques, seraient moins à même de se rapprocher des surfaces bactériennes. Ainsi, les activités antibactériennes portées par ces derniers pourraient résulter d'interactions indirectes, comme la chélation de cations essentiels à la stabilité membranaire des bactéries tels que le Ca^{2+} et le Mg^{2+} (Rahmawati *et al.*, 2023). Des interactions directes avec des récepteurs membranaires spécifiques ne sont cependant pas à exclure. Malgré l'abondance de groupements chargés négativement à la surface bactérienne, la répartition de ces charges doit être prise en compte. Les travaux de Cremin *et al.* (2020) soutiennent que cette répartition diffère chez les bactéries de Gram positives et négatives. Ces dernières auraient une densité de charges négatives moins importante, facilitant potentiellement l'interaction des polyanions avec certains récepteurs à la surface de leurs parois membranaires. Enfin, la présence de divers groupements fonctionnels porteurs de bioactivités peut aussi jouer un rôle primordial dans l'efficacité antibactérienne ou antioxydante des polysaccharides. Dans cette situation, l'accessibilité de ce groupement, influencée par la conformation de la molécule, le repliement du polysaccharide, peut alors être un facteur important dans l'efficacité des bioactivités portées par le composé. Puisque l'origine des bioactivités des polysaccharides est complexe et diversifiée, le choix du procédé de production et de raffinage pour les produire, en venant potentiellement moduler leur composition et leur qualité physico-chimique, peut entraîner des conséquences directes sur leurs bioactivités.

4.2.2 Impact du procédé de culture sur les polysaccharides

La qualité d'un extrait peut être modulée au moment de la culture des organismes à l'origine de leur production. Les conditions de cultures ayant un impact direct sur l'état physiologique de la biomasse, les conséquences de leur fluctuation peuvent se répercuter au niveau de la quantité et de la composition des EPS produits par celle-ci. Les facteurs abiotiques peuvent influencer la production d'exopolysaccharides. Le ratio azote/phosphore (N/P) est reconnu comme modulant grandement la productivité des microalgues en exopolysaccharides. Des études se focalisant sur *Porphyridium sp.*, une microalgue rouge, démontrent que sa production en exopolysaccharides est favorisée par un ratio N/P plus bas que celui permettant une croissance optimale de la biomasse (Lu *et al.*, 2020). La même tendance a pu être observée chez *Vischeria punctata*, une microalgue verte (Babich *et al.*, 2022), tandis que pour *H. ostrearia*, il a déjà été démontré qu'une limitation en azote pouvait déclencher une augmentation transitoire de la production de marennine (Lebeau *et al.*, 2000 ; Nghiem Xuan *et al.*, 2021). La salinité du milieu environnant pourrait, quant à elle, influencer la composition de ses exopolysaccharides, sa fluctuation entraînant un changement de source de carbone chez la microalgue (Decamp *et al.*, 2023). Le poids moléculaire des exopolysaccharides produits ainsi que leur composition en monomères peuvent aussi être amenés à changer selon le milieu nutritionnel, et ces modulations sont espèces-dépendantes (Urbani *et al.*, 2012). Le niveau de polymérisation et la composition des différentes fractions d'une production d'exopolysaccharides peuvent être influencés par des changements qualitatifs ou quantitatifs du milieu nutritionnel. En conditions optimales de croissance, Underwood *et al.* (2004) avancent que certaines diatomées sembleraient favoriser la production de carbohydrates extracellulaires plutôt que d'EPS. Les travaux de Ai *et al.* (2015) sur la diatomée *Thalassiosira pseudonana*, montrent que celle-ci, en réponse au stress nutritionnel, favoriserait la production de fraction de faible poids moléculaire, dont la composition serait optimisée pour favoriser le recyclage nutritionnel. A l'inverse, une augmentation de la production des polysaccharides de plus haut poids moléculaire serait observée pour protéger la microalgue de la dégradation par les bactéries présentes en culture. Dans certaines conditions nutritionnelles, une augmentation de la température a aussi eu pour conséquence une augmentation de la production en exopolysaccharides, chez *Phaeodactylum*

tricornutum (Nur *et al.*, 2019). Enfin le spectre lumineux, l'intensité lumineuse ainsi que la périodicité de la phase d'éclairement joueront un rôle dans la production en exopolysaccharides, puisque l'environnement lumineux aura un impact direct sur l'activité photosynthétique de ces micro-organismes. Moduler les conditions lumineuses influencent donc la fixation du carbone organique chez ces micro-organismes, et indirectement la production d'exopolysaccharides qui en découle, comme observé notamment chez la diatomée *Cylindrotheca closterium* (Staats *et al.*, 2000).

Des facteurs biotiques peuvent également jouer un rôle dans la modulation de la production de polysaccharides. Il a été démontré que la production en exopolysaccharides évoluait selon l'état physiologique, et selon la phase de croissance dans laquelle se trouve la biomasse (De Brouwer et Stal, 2002 ; Gügi *et al.*, 2015 ; Underwood *et al.*, 2004 ; Xiao et Zheng, 2016). Ces deux éléments peuvent être liés aux facteurs abiotiques décrits plus haut, puisque ces derniers influencent l'état physiologique des cellules en culture, et peuvent également moduler par d'autres facteurs biotiques comme l'état de la phycosphère. La présence de bactéries en culture s'avère favoriser l'externalisation de composés extracellulaires (Daly *et al.*, 2023) tels que les polysaccharides chez les microalgues, permettant à celles-ci de créer et entretenir un consortium bactérien favorable à sa croissance (Perera *et al.*, 2022). L'étude de l'influence de la composition de la phycosphère sur la production d'exopolysaccharides reste encore à approfondir, mais les travaux montrant l'influence de celles-ci sur l'état physiologique des microalgues (Tong *et al.*, 2023) laissent à penser qu'il pourrait exister une relation de causalité entre les deux. En poursuivant sur cette logique, la phycosphère pouvant évoluer d'une souche à l'autre au sein d'une même espèce de microalgues cultivées séparément, cela pourrait engendrer de la variabilité intersouche au niveau de leur production en exopolysaccharides. La phycosphère promet également de nouvelles perspectives d'optimisation de la production d'exopolysaccharides, basée sur un contrôle de celle-ci et implique que la qualité d'exopolysaccharides produite pourra être modifiée selon le procédé de culture utilisé. En effet, un système ouvert comme des bassins à circulation (en anglais *raceway*), un photobioréacteur favorisant l'homogénéisation de la culture, ou un photobioréacteur favorisant le développement du

biofilm microalgal ne permettront pas le développement des mêmes communautés microbiennes.

Finalement il semble important de souligner que l'ensemble des facteurs résumés ici sont interconnectés. Par exemple, les facteurs abiotiques décrits plus haut influenceront la composition de la phycosphère de la microalgue étudiée, complexifiant ainsi d'un niveau supplémentaire la compréhension de l'influence des conditions de cultures des microalgues sur leur production en exopolysaccharides.

4.2.3 Impact du procédé de raffinage sur les polysaccharides

Un procédé de raffinage modulera la qualité de l'extrait final en jouant sur des étapes de sélection basées sur plusieurs critères physico-chimiques. En entraînant le fractionnement du mélange brut, obtenu à la suite de l'extraction de la biomasse, ou dans le cas d'exopolysaccharides, de récolte du surnageant de culture, ces étapes de raffinage vont *in fine* moduler les bioactivités portées par celui-ci. Concernant les polysaccharides, le raffinage aura un impact sur les bioactivités d'un extrait en influençant sa composition à la suite d'une ou plusieurs étapes de sélections. Ces étapes peuvent se baser sur le poids moléculaire moyen des composés du mélange, ou sur les affinités de ces derniers, en jouant sur les charges portées, la polarité des différents composés, et la conformation prise par ces composés résultante de ces facteurs (Figure 16). Les principales méthodes utilisées sont résumées par Ren *et al.*, (2019) et retrouvées dans le Tableau 3.

Un raffinage utilisant des procédés basés sur la taille des composés pourra alors influencer la qualité biochimique finale des exopolysaccharides sélectionnés. De ces procédés, l'un des plus utilisés est l'ultrafiltration, reconnue pour préserver l'intégrité des composés raffinés. Tout en restant peu coûteux et facile à mettre en place, il ne requiert pas l'utilisation d'adjuvant, présentant ainsi un avantage écologique. Le pH, le contenu ionique de l'extrait initial, la pression et la température sont alors les paramètres principaux pouvant influencer la qualité de l'extrait résultant, en modulant le flux de perméation (Sun *et al.*, 2011). Une des principales limites à prendre en considération lors de l'utilisation de ce type

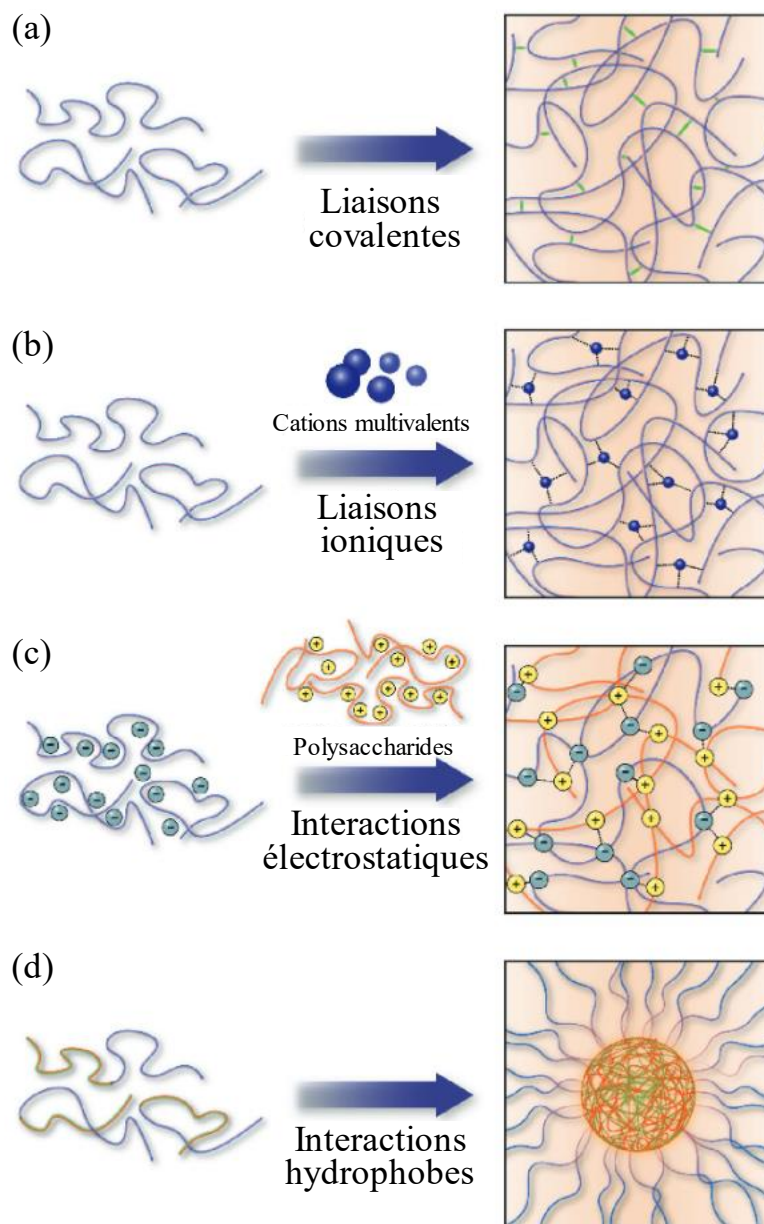


Figure 16 : Forces intra et intermoléculaires retrouvées dans les mélanges de polysaccharides. (a) Liaisons covalentes, (b) réticulations ou liaisons ioniques, (c) interactions électrostatiques, (d) interactions hydrophobes (adaptée de Miao *et al.*, 2018).

de procédés pour la préparation d'extraits de polysaccharides est la tendance à l'encrassement des membranes, et les phénomènes de polarisation de celles-ci, dont l'importance dépend de la composition en polysaccharides de la solution filtrée (Meng *et al.*, 2019) et pourrait obstruer ou simplement modifier les propriétés de filtration de la membrane choisie (Luis,

2018). Le raffinage des polysaccharides basé sur la taille des composés peut également se faire par chromatographie à exclusion stérique. Cette approche permet une purification plus complète des différents composés présents dans les mélanges complexes des extraits bruts, cependant son utilisation est moins sollicitée, un tel niveau de pureté n'étant pas toujours recherché, le coût de telles approches est évité dans la mesure du possible (He *et al.*, 2014).

D'autres techniques basent leur sélectivité sur les propriétés physico-chimiques des composés polysaccharides en mélange. La plus commune utilise un solution d'alcool, comme l'éthanol, pour précipiter les polysaccharides. La concentration en alcool sera alors le facteur principal modulant la sélectivité, différente pour chaque composé, selon ses caractéristiques structurales et son poids moléculaire (Xu *et al.*, 2014). L'étude de Xu *et al.* (2019) est un exemple concret de l'impact du choix du solvant, qui vient modifier la composition en monosaccharides des composés extraits ainsi que leur poids moléculaire moyen, l'ensemble entraînant une variabilité des activités antioxydantes des extraits résultants. Les travaux de Ziadi *et al.* (2018) comparent une approche par ultrafiltration à celle d'une approche par extraction à l'éthanol, et concluent sur les nombreuses différences qualitatives des deux extraits obtenus, stipulant que l'ultrafiltration permet un meilleur rendement de récupération. Si, dans cette étude, aucune analyse ne vient conclure sur les propriétés physico-chimiques et bioactives des deux extraits, il est probable que la variabilité qualitative résultant des différentes pratiques de raffinage se répercute sur les propriétés des fractions obtenues. Les polysaccharides peuvent également être sélectionnés sur la base des forces structurant le mélange d'exopolysaccharides (Figure 16). Le recours à des colonnes de chromatographies échangeuses d'ions pourront sélectionner les polysaccharides selon leurs charges, comme des techniques de chromatographie inversée pourront baser la sélection sur hydrophobicité des composés (Megherbi *et al.*, 2008). Cette fois encore, la température, le pH, et la pression appliqués lors de ces séparations pourra jouer un rôle significatif en affectant les charges des composés du mélange, la force des liaisons non covalentes, modulant ainsi la sélectivité du procédé. Ces stratégies, en permettant une purification plus fine, auront un impact sur la composition de l'extrait final. Cependant, en jouant sur les forces

intra et intermoléculaires du mélange, elles peuvent présenter l'inconvénient de modifier la structure des composés extraits et augmentent le risque de répercussions sur leurs propriétés.

Selon la technique de raffinage choisie, le niveau de pureté atteint ne sera pas le même (Ren *et al.*, 2019) et une variété de co-produits pourront être co-extraits. Celle-ci peut potentiellement influencer les propriétés de l'extrait final, en portant eux-mêmes des bioactivités, ou en obstruant l'origine structurale d'une activité. Une technique basée sur la taille des composés seulement pourra contenir un ensemble de polymères de natures différentes, partageant les mêmes poids moléculaires, ou des composés agrégés entre eux, de poids moléculaire apparent alors plus élevé que leur poids moléculaire réel. De la même façon, une sélection basée sur les affinités chimiques ou les forces intra et intermoléculaires pourront co-extraire des composées, par exemple, chargés de manières similaires ou encore des produits plus ou moins dégradés d'une même molécule, et même des composés aux mêmes solubilités dans un solvant choisi. Les variabilités résultantes du procédé de culture retrouvées dans la composition de l'extrait initial, *e.g.* la composition en EPS et en lysat cellulaire d'un surnageant de culture, viendra alors ajouter un niveau de variabilité supplémentaire aux extraits résultants du procédé de raffinage.

Tableau 3 : Résumé des méthodes de raffinage des polysaccharides naturels (adapté de Ren *et al.*, 2019)

| Méthode | Mécanisme | Applications | Objectifs |
|---|--|--|--|
| Précipitation fractionnée | La solubilité des polysaccharides varie selon les solvants. | Polysaccharides bruts avec une distribution de poids moléculaire différente. | Obtenir des polysaccharides de différents poids moléculaires |
| Précipitation du bromure de cetyl-triméthyl-ammonium et d'ammonium (CTAB) | Le sel d'ammonium quaternaire à longue chaîne peut former un complexe avec des polysaccharides acides ou des polysaccharides à longue chaîne, puis précipiter. | La plupart des polysaccharides bruts, en particulier les polysaccharides acides. | Obtenir des polysaccharides bruts acides et neutres |

| | | | |
|--|--|--|---|
| Complexation des métaux | Les polysaccharides peuvent être complexés avec des composés ioniques spécifiques pour précipiter. | Les polysaccharides sous leur forme native | Obtenir des polysaccharides libres aux propriétés différentes |
| Chromatographie échangeuse d'anions | Échange d'ions avec adsorption réversible et adsorption de liaison. | Les polysaccharides acides, neutres et visqueux, en particulier les polysaccharides complexes qui se lient aux protéines | Obtenir des polysaccharides homogènes |
| Chromatographie sur gel | Principe du tamis moléculaire, en fonction de la taille et de la forme des polysaccharides | Les polysaccharides sous leur forme native | Obtenir des polysaccharides homogènes de différents poids moléculaires |
| Chromatographie d'affinité | Affinité moléculaire | Polysaccharides ayant une affinité avec des groupements fixés sur des colonnes chromatographiques | Obtenir des polysaccharides homogènes aux propriétés différentes |
| Chromatographie sur colonne de cellulose | Principe du tamis moléculaire | Polysaccharides acides et neutres | Obtenir des polysaccharides de différentes gammes de poids moléculaires |
| Chromatographie sur résine macroporeuse | Tamis moléculaire et principe de l'adsorption sélective | La plupart des polysaccharides | Obtenir des polysaccharides de différentes gammes de poids moléculaires |
| Ultrafiltration | Principe du tamis moléculaire | Les polysaccharides sous leur forme native | Obtenir des polysaccharides de différentes gammes de poids moléculaires |

4.2.4 Suivi de la qualité des polysaccharides

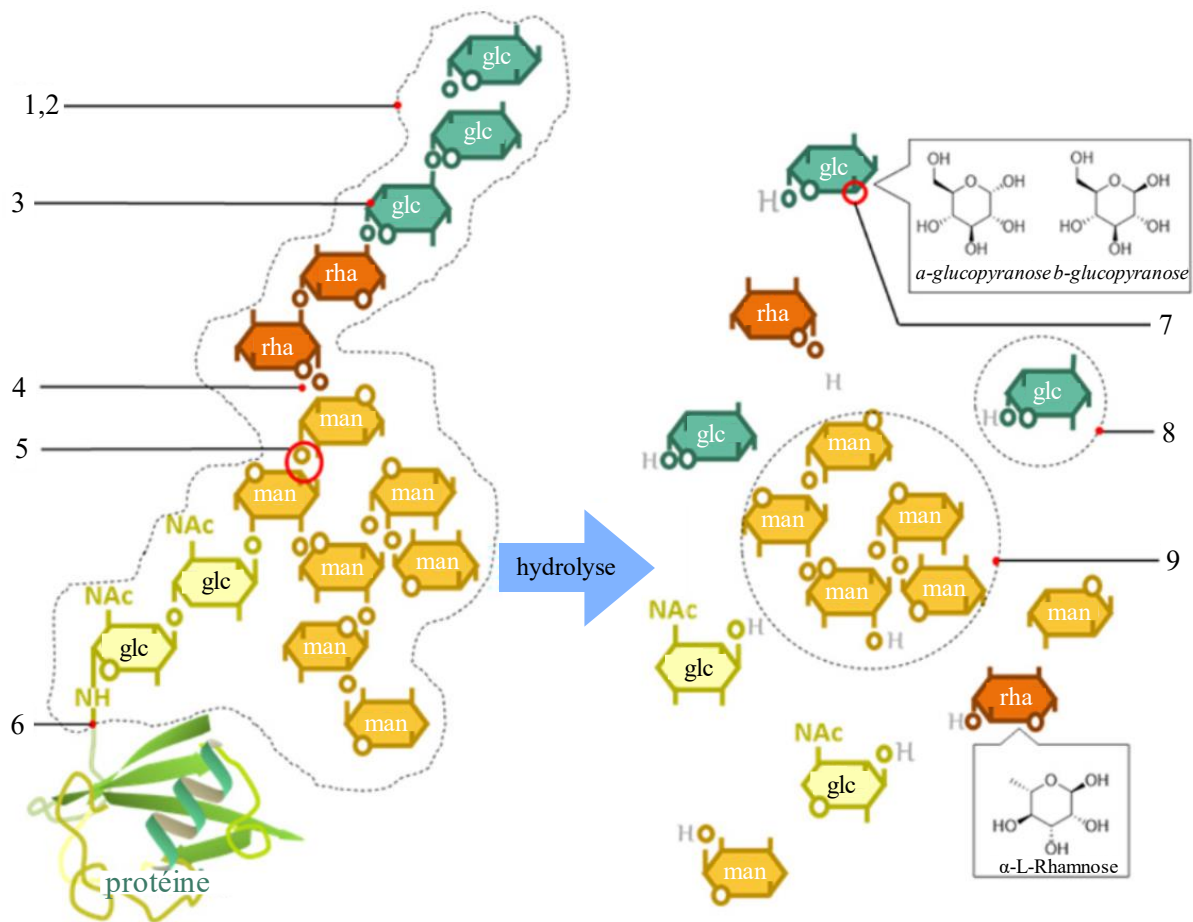


Figure 17 : Analyse de la structure primaire des polysaccharides (adaptée de Ren *et al.* 2019). Les différentes approches utilisées pour élucider la structure primaire des polysaccharides sont illustrées ci-dessus et détaillées dans le Tableau 4.

Finalement, pour s'assurer de la qualité de l'extrait de polysaccharides produit, plusieurs méthodes d'analyses complémentaires peuvent être utilisées. Le choix repose alors sur l'information recherchée, le niveau de précision visé, le coût de l'analyse et sa facilité de mise en place, la prise de décision étant souvent influencée par la forme de valorisation souhaitée pour le produit. Des méthodes de dosage sont souvent utilisées comme point de départ. La méthode développée par Dubois *et al.* (1956) est une méthode simple à mettre en place et peu coûteuse pour déterminer la teneur en sucres totaux, donnant une indication sur la pureté de la fraction d'exopolysaccharides. Pour déterminer avec plus de précision la

composition en monomères, leurs enchaînements, et les embranchements existants, des analyses structurales plus poussées sont nécessaires, résumées par Ren *et al.* (2019) (Figure 17, Tableau 4).

Tableau 4 : Méthodes utilisées pour l'étude de la structure primaire des polysaccharides (adapté de Ren *et al.*, 2019)

| Numéro Figure 17 | Objectif de caractérisation | Méthodes courantes |
|-------------------------|--|--|
| 1 | Analyse structurale globale Homogénéité et détermination du poids moléculaire | Chromatographie par perméation de gel à haute performance (HPGPC), pression osmotique, diffusion de la lumière, viscosité, électrophorèse sur gel de polypropylène, etc. |
| 2 | Analyse structurale globale Composition en monosaccharides et proportion associée | Hydrolyse acide complète, HPLC, GC, GC-MS, chromatographie ionique à haute performance, etc. |
| 3 | Forme cyclique du glycoside | Spectroscopie Raman |
| 4 | Séquence de liaisons glycosidiques | Hydrolyse acide sélective, hydrolyse séquentielle par glycosidase, résonance magnétique nucléaire |
| 5 | Substitution d'hydroxyles | Méthylation, oxydation du périodate, dégradation de Smith, GC-MS, résonance magnétique nucléaire, etc. |
| 6 | Liaison entre les chaînes de polysaccharides et les liaisons peptidiques | Hydrolyse alcaline diluée, réaction à l'hydrazine, réaction de composition des acides aminés |
| 7 | Forme amorphe substituée par des glycosides | Hydrolyse de la glycosidase, résonance magnétique nucléaire, chromatographie, infrarouge, laser, etc. |
| 8 | Type de résidu monosaccharide et site de liaison glycosidique, | analyse de méthylation, GC- MS, etc. |
| 9 | Détermination des oligosaccharides | Hydrolyse acide partielle, GC-MS, MS, etc. |

Lorsque l'extrait polysaccharidique étudié vise à être valorisé pour ses activités, une vérification de son efficacité est primordiale. Le choix du test repose alors sur les bioactivités d'intérêt et dépend du contexte de valorisation de l'extrait. L'étude des activités antioxydantes est une des plus courantes. Elle se décline sous plusieurs tests, mesurant l'efficacité de l'activité antioxydante sous plusieurs formes : la capacité à piéger des radicaux libres, testée contre les radicaux acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS•), 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH•), anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) ou hydroxyle (HO•), le pouvoir réducteur, testé sur les ions ferriques (Fe^{3+}), les capacités de protection contre l'oxydation, au travers de test de protection des pigments comme la β -carotène, ou d'acide nucléique *via* le test de protection de la thymidine (Bagchi et Jayaram Kumar, 2016 ; Ge *et al.*, 2009 ; Patel *et al.*, 2017 ; Pouvreau *et al.*, 2008a ; Rozi *et al.*, 2019). D'autres activités biologiques sont également évaluées, comme les analyses d'activités antibactériennes, qui prennent le plus souvent la forme de détermination de la concentration minimale d'inhibition (CMI), et de la concentration minimale bactéricide (CMB) d'un composé (Bouaziz *et al.*, 2015). D'autres approches consistent à étudier les cinétiques de croissance bactérienne (Falaise *et al.*, 2019b), ou encore à tester l'impact des extraits d'intérêt sur le développement de biofilm bactérien (Sayem *et al.*, 2011). Enfin, de manière moins courante, mais cohérente selon le secteur de valorisation visé, d'autres bioactivités retrouvées chez les polysaccharides peuvent être suivies, comme leurs propriétés antivirales, d'anticoagulation, antiprolifératives contre certaines lignées de cellules cancéreuses, ou encore des activités anti-glycation, cytotoxique ou apoptotique (Bergé *et al.*, 1999 ; Patel *et al.*, 2017 ; Zhao *et al.*, 2020).

5. CONCLUSION ET OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

Cela fait maintenant plus de deux siècles que *H. ostrearia* et sa production de marennine motivent la recherche à leur sujet. Le moteur principal en fut pendant longtemps leur lien de causalité avec le verdissement des huîtres, phénomène d'importance économique notoire en France (Gabed *et al.*, 2022). L'actualité évoluant, les motivations derrière la production de marennine changent également, et aujourd'hui ce pigment se présente comme

un composé bioactif naturel dont les propriétés pourraient être valorisées pour répondre aux défis auxquels fait face l'aquaculture.

L'étude approfondie de la marennine est encore souvent ralentie par des productivités faibles, comparées aux productivités d'autres métabolites retrouvés chez les diatomées. À titre d'exemple, la production de lipides peut atteindre $48 \text{ mg.L}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pour certaines souches de *Staurosira sp.* (Cointet *et al.*, 2019). Ainsi, bien que les récentes avancées concernant l'élucidation de la nature de la marennine soient encourageantes (Yusuf *et al.*, 2023 ; Zebiri *et al.*, 2023), la structure primaire reste encore en grande partie inconnue, tout comme la nature du chromophore. L'origine des bioactivités associées aux extraits de marennine n'est pas caractérisée, et celles-ci pourraient tout aussi bien être portées par le ou les chromophores comme provenir d'autres éléments du squelette polysaccharidique. Ces sous-unités de la marennine peuvent être affectées différemment au cours du processus de production, de la culture au raffinage, tout comme la nature des co-extraits retrouvés dans l'extrait de marennine, sa purification complète n'étant pas envisageable pour sa valorisation en aquaculture. Un travail important reste à mener pour caractériser la variabilité apportée par le système de culture et le procédé de raffinage sur la production de marennine, la maîtrise de l'impact de ces facteurs sur les productivités et la qualité de l'extrait étant de première importance pour soutenir la valorisation de ce pigment.

L'étude suivante vise à apporter de nouveaux éléments de réponse aux limites évoquées, au travers de trois objectifs principaux. Premièrement, notre étude cherche à montrer dans quelles mesures le procédé de culture utilisé pour la production de marennine peut influencer les productivités et la qualité de ce pigment. Pour ce faire, l'impact du changement de souche de *H. ostrearia* (chapitre 2), puis celui de l'évolution de l'état physiologique de la biomasse lors d'une culture sur sa production en marennine seront évalués (chapitre 3). Cette étude se focalisera par la suite sur l'impact du procédé de raffinage employé sur la qualité de l'extrait de marennine, et analysera de quelle manière celui-ci pourrait avoir un impact sur sa valorisation en aquaculture (chapitre 4). Finalement, l'ensemble de ce travail devrait permettre de définir les procédés de production de marennine

à favoriser dans un contexte de valorisation du pigment en aquaculture (Conclusion générale).

Pour répondre à ces objectifs, cette étude se fonde sur trois hypothèses. La première stipule qu'un système hybride, de type MPBR, permet une production de marennine fiable, optimale et facilement adaptable aux différentes souches de *H. ostrearia* (Chapitre 2). La deuxième hypothèse soutient que la physiologie des diatomées régit *in fine* la variabilité de la quantité et de la qualité de la marennine produite. (Chapitres 2 et 3). Enfin la troisième hypothèse est que le procédé de raffinage peut altérer la qualité de l'extrait de la marennine, entraînant une variabilité des réponses de bioactivité du pigment. (Chapitre 4)

CHAPITRE 1

MATERIEL ET METHODES

1.1 CULTURE DE *HASLEA OSTREARIA* ET PRODUCTION DE MARENNINE

1.1.1 Les souches de *Haslea ostrearia*

Les différentes souches de *H. ostrearia* utilisées au cours de cette étude ont été fournies par la « Nantes Culture Collection » (NCC, Nantes Université, France). Au cours de cette étude, 4 souches différentes de *H. ostrearia* ont été utilisées : *H. ostrearia* NCC519, *H. ostrearia* NCC529 et *H. ostrearia* NCC531 isolées dans la baie de Bourgneuf (Loire-Atlantique, France), et *H. ostrearia* NCC553 résultant d'une auxosporulation entre *H. ostrearia* NCC527 et *H. ostrearia* NCC532, toutes deux isolées de la baie de Bourgneuf (Loire-Atlantique, France).

1.1.2 Les milieux de culture

Dans le cadre des expérimentations du chapitre 2 et 3, le milieu de culture Provasoli ES 1/3 (Provasoli *et al.*, 1957 ; Robert, 1983) a été utilisé pour le maintien des souches et la production d'inoculum. Un milieu ES 1/3 enrichi en silicate et nitrate a été utilisé pour les cultures en photobioréacteur. Une eau de mer naturelle filtrée (filtre 0,2µm - Sartobran® P) a été autoclavée pour servir de base à la préparation du milieu de culture. L'eau de mer a ensuite été enrichie selon le protocole « Enriched Seawater 1/3 » (ES1/3) de Provasoli *et al.* (1957) modifié avec une source de phosphate inorganique comme proposé par Nghiem-Xuan (2019), de manière stérile à l'aide d'une unité de filtration (0,2 µm - Sartolab™ P20 Plus). Le pH a été ajusté à 7,8 et la salinité à 28 g.L⁻¹. Pour les cultures en photobioréacteur, la concentration finale en nitrate a été ajustée à [NaNO₃] = 0,15 g.L⁻¹, et le bicarbonate ainsi que la silice ont été ajoutés directement au milieu de culture de manière à atteindre une

concentration finale de $[\text{NaHCO}_3] = 0,42 \text{ g.L}^{-1}$, $[\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}] = 0,03 \text{ g.L}^{-1}$, en évitant la précipitation des sels comme proposés par Nghiem-Xuan (2019).

Dans le cadre du chapitre 4, la culture de *H. ostrearia* a utilisé le milieu de culture F/2 (Guillard, 1975), enrichi en silicate tel que $[\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}] = 0,03 \text{ g.L}^{-1}$.

1.1.3 Les systèmes de culture

1.1.3.1 Préculture

L'entretien des souches se fait par transfert successif, aussi appelé repiquage. Les souches sont cultivées dans des Erlenmeyers de 500 mL remplis de 250 mL de culture, placés à 16°C, et éclairés par des DEL blanches à $100 \mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$, suivant un cycle lumière/obscurité de 14/10h, avec des repiquages toutes les deux semaines. Au moins un mois avant le passage en culture en photobioréacteur, la fréquence des repiquages a été intensifiée pour maintenir la biomasse en phase de croissance exponentielle avec un repiquage tous les 4 jours, à 18°C, et sous une intensité lumineuse de $200 \mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, suivant un cycle lumière/obscurité de 14/10h.

1.1.3.2 Culture en photobioréacteur à membrane immergée (MPBR)

Le MPBR développé par Gargouch *et al.* (2022) (Figure 1.1) a été utilisé pour l'étude menée dans le chapitre 3 et le chapitre 4, ainsi que pour produire une partie des extraits de marennine étudiés dans le chapitre 5. Il se compose de deux éléments principaux : une chambre de culture et une membrane immergée. La chambre de culture de type plan, d'un volume de 1L et d'une épaisseur de 3 cm, présente une surface spécifique de $33 \text{ m}^2.\text{m}^{-3}$. Une sonde (Vernier pH sensor, Switzerland) immergée dans la culture permet le suivi du pH et de la température. La température de la chambre de culture est maintenue à 18°C grâce à la climatisation de la pièce. Le pH est maintenu à 7,8 et ajusté par injection de CO_2 dans la chambre de culture. Celle-ci est régulée par une électrovanne, permettant la libération de CO_2 dans la culture lorsque le pH dépasse la valeur seuil fixée par la consigne. L'intensité

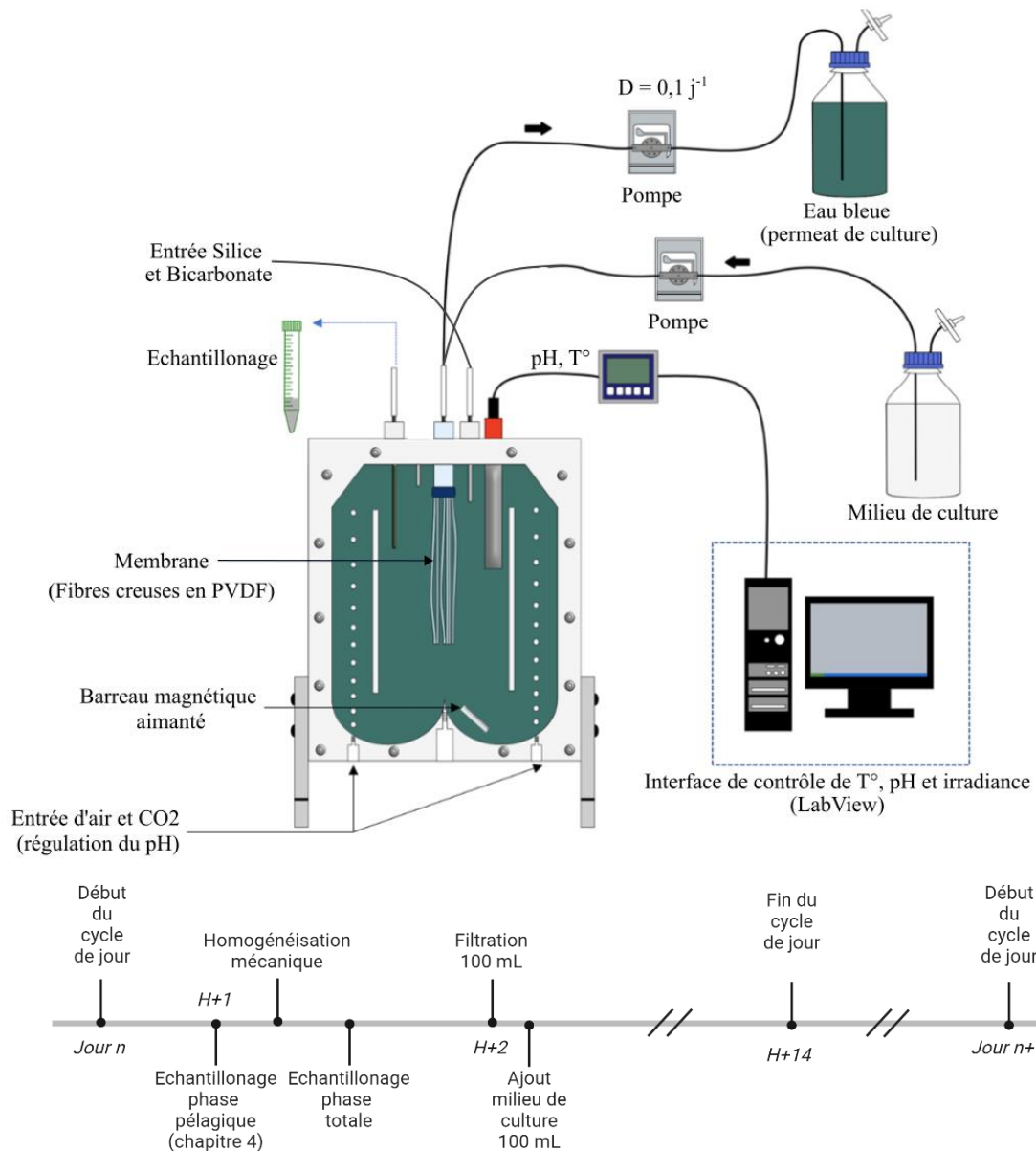


Figure 1.1 : Culture de *H. ostrearia* en photobioréacteur à membrane immergée (MPBR). La culture de *H. ostrearia* est menée en mode fed-batch à volume constant et la récolte du surnageant de culture (eau bleue) est réalisée en semi-continu. Le schéma résume le montage du MPBR, et une frise temporelle résume la chronologie d'une journée type de culture (adaptée de Gargouch *et al.*, 2022) créé avec BioRender.com.

lumineuse fournis par un panneau de LEDs blancs, placé de manière à atteindre l'irradiance souhaitée à l'intérieur de la chambre de culture. Pour ce faire une calibration externe est réalisée en amont de la culture à l'aide d'une sonde LICOR. Un cycle lumière/obscurité de

14h/10h est également mis en place. L'interface LabView permet la gestion de l'ensemble de ces consignes. L'homogénéisation de la culture se fait selon la technologie Airlift (Pruvost *et al.*, 2009), et deux entrées d'air filtré (filtre air Sartorius™ Midisart™, en PTFE 2000) situées en bas de la chambre de culture permettent une homogénéisation en continu. La membrane immergée dans la chambre de culture présente un seuil de coupure de 0,05 µm, se compose de 40 fibres creuses en PVDF (polyvinylidène fluoride) (VMA Industries, France), dont une extrémité est bouchée, pour une surface totale de 0,0373 m². Cette membrane, reliée à une pompe à piston, permet de récolter par filtration un volume choisi de milieu de culture, mais aussi d'alimenter la culture par rétrolavage (Figure 1.1). Le taux de dilution (D, j^{-1}) appliqué aux différentes cultures a été calculé comme suit :

$$D = \frac{Q}{V_r} \quad (\text{Équation 1})$$

avec Q le taux de filtration (mL.j⁻¹), et V_r le volume total de la culture dans le réacteur (mL).

Avant chaque culture, le MPBR est rempli à l'acide peroxyacétique (5 mM) et 100 mL d'acide sont filtrés par la membrane. L'ensemble est laissé à stériliser pendant 30 minutes, puis rincé à l'eau osmosée, jusqu'à atteindre un pH neutre.

L'inoculation de la culture sur fait à partir d'1L d'inoculum de 100 cell.L⁻¹. La culture est alors laissée en batch pendant 48h sous un éclairage de 100 µmol de photons.m⁻².sec⁻¹. Après quoi l'intensité lumineuse est augmentée à 200 µmol de photons.m⁻².sec⁻¹, et une filtration ponctuelle de 100 mL quotidienne est mise en place pour le reste de la culture. La biomasse est alors cultivée en fed-batch à volume constant, par un renouvellement de 100 mL ($D= 0,1 j^{-1}$) de milieu de culture quotidien, à la suite de la filtration d'un volume équivalent. Le temps de séjour de la biomasse tend vers l'infini, celle-ci étant entièrement retenue dans le réacteur par les membranes de seuil de coupure de 0,05 µm (à l'exception de l'échantillonnage). La marennine produite par *H.ostrearia* est naturellement externalisée et se retrouve en solution dans le milieu de culture, appelé alors eau bleue (Blue Water, BW). Cette eau bleue est récoltée quotidiennement par filtration de la culture. La récolte se fait alors en semi-continu et le taux de dilution est de $D=0,1 j^{-1}$.

Pour assurer le suivi de la culture, un échantillonnage quotidien de 7 mL est effectué avant et/ou après une homogénéisation mécanique de la culture à l'aide d'un barreau magnétique placé au moment de la stérilisation à l'intérieur de la chambre de culture (Figure 1.1).

1.1.3.3 Culture en PBR

Pour l'étude menée dans le chapitre 4 concernant l'impact du procédé de raffinage sur la qualité des extraits de marennine, l'ensemble des eaux bleues a été fourni par la station aquicole de Pointe-au-Père (Université du Québec à Rimouski, Québec, Canada). Ces extraits ont été obtenus à partir de cultures d'*H. ostrearia* NCC 519 pour les échantillons MMW-UF et NCC553 pour MMW-SPE, HMW-SPE, LMW-SPE et EPS-H₂O.

Les cultures de *H.ostrearia* ont été menées dans un prototype de photobioréacteur en acrylique à fond plat permettant une culture de 30 L selon le protocole présenté par Prasetiya *et al.*, (2022) (Figure 1.2). Les cultures ont été réalisées dans un milieu de culture F/2 autoclavé (Guillard, 1975) enrichi en silicates (30 mg.L⁻¹). La lumière a été fournie par un système de LEDs blancs, placé au-dessus du PBR, et réglé à une irradiance de 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pour un cycle lumière/obscurité de 14h/10h. La température et la salinité ont été maintenues à 20°C et 28 ppt respectivement. De l'air filtré (0,22 μm) a été injecté à la surface de l'eau sans mélanger la culture de microalgues. Un taux de dilution de 25% a été appliqué dès que la concentration en marennine dans la chambre de culture dépassait 6 mg L⁻¹. Chaque récolte d'eau bleue a été réalisée de manière à laisser un maximum de biomasse dans la chambre de culture, c'est-à-dire sans homogénéiser la biomasse sédimentée dans la chambre de culture. S'en est suivi un ajout de milieu de culture, d'un volume équivalent à celui récolté, soit 25% du volume total de la culture. Le mode de culture de la biomasse se rapproche d'un fonctionnement en fed-batch à volume constant, tandis que la production d'eau bleue est effectuée en semi-continu.

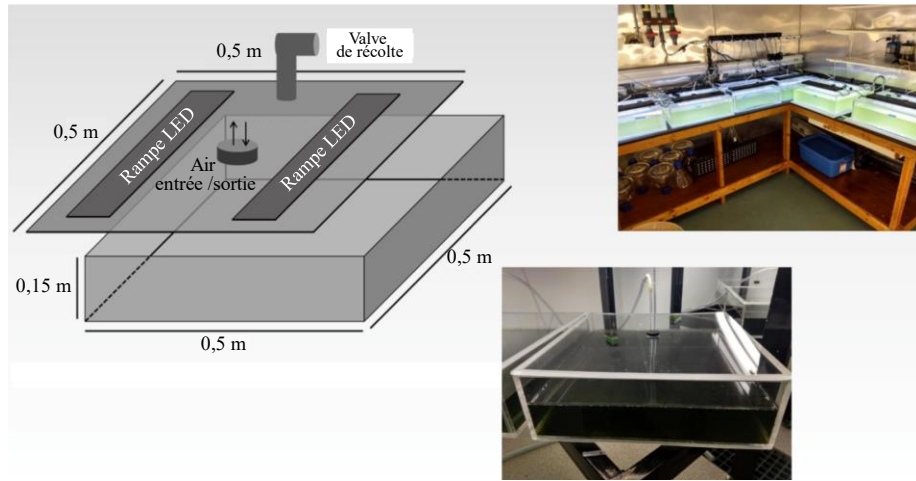


Figure 1.2 : Photobioréacteur (30 L) utilisé pour la culture de *H. ostrearia* en mode semi-continu (d'après Prasetya *et al.*, 2022)

1.2 OBTENTIONS DES EXTRAITS DE MARENININE (EAU BLEUE)

1.2.1 Préparation des extraits de mareninine produits en MPBR

Pour mener l'étude des extraits de mareninine dans le chapitre 2 et 3, les eaux bleues obtenues en MPBR ont été préparés selon un protocole d'ultrafiltration en cascade adapté de Pouvreau *et al.* (2006b) (Figure 1.3).

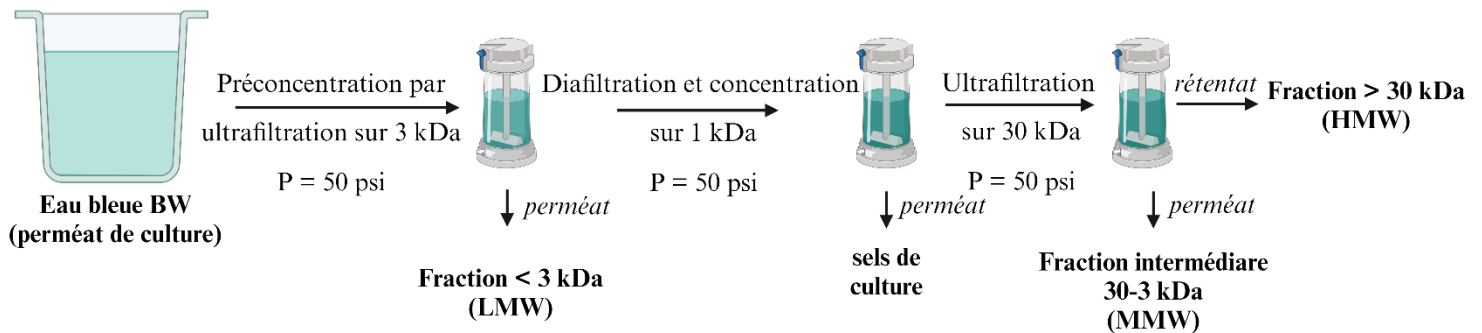


Figure 1.3 : Protocole d'ultrafiltration suivi pour les eaux bleues produit en MPBR. Protocole de raffinement utilisant une cellule AMICON® de 400 mL, et diafiltration réalisée à l'eau nanopure (basé sur le protocole de Pouvreau *et al.* 2006) créé avec BioRender.com.

Préconcentration

Les eaux bleues récoltées lors des cultures en MPBR ont été préalablement filtrées à l'aide d'une unité de filtration, avec un diamètre de pores de 0,2 µm (Sartolab™ P20 Plus), pour retirer toute contamination, c'est-à-dire les microorganismes et autres particules pouvant être retrouvées dans l'eau bleue, avant d'être conservées à 4°C et à l'obscurité. Elles ont ensuite été préconcentrées par ultrafiltration, à un seuil de 3 kDa (Ultracel® membrane, MilliporeSigma) (T= 20°C, P= 22 psi) (Figure 1.3), à l'aide d'une cellule à agitation AMICON® 400 mL (MilliporeSigma), jusqu'à ce que le facteur de réduction volumique se trouve entre 10 et 15. Les extraits obtenus (rétentat, BW-UF3) sont conservés à -20°C, à l'obscurité.

Ultrafiltration

Les eaux bleues concentrées (BW-UF3) sont diafiltrées à un seuil de coupure de 1kDa. Cette étape est menée sur cellules à agitation AMICON® 400 mL (MilliporeSigma) (T = 20°C) reliée à un réservoir Cornelius ball lock de 19 L (Amcyl, Wyoming, MN, USA) rempli d'eau nanopure et pressurisé avec de l'azote à 50 psi. Les extraits obtenus sont ensuite ultrafiltrés à un seuil de coupure de 30 kDa (Ultracel®, MilliporeSigma), utilisant la même cellule AMICON® (T = 20°C), pour permettre la récupération du perméat contenant la fraction de masse moléculaire intermédiaire (MMW, Figure 1.3).

1.2.2 Préparation des extraits de marennine produits en PBR

Pour mener à bien l'étude présentée dans le chapitre 4, une production de marennine dédiée fut nécessaire. Les extraits de marennine ont été obtenus à partir d'eaux bleues fournies par la station aquicole de Pointe-au-Père (Université du Québec à Rimouski, Québec, Canada) raffinées selon le protocole de Bélanger *et al.* (*soumis*) (Figure 1.4).

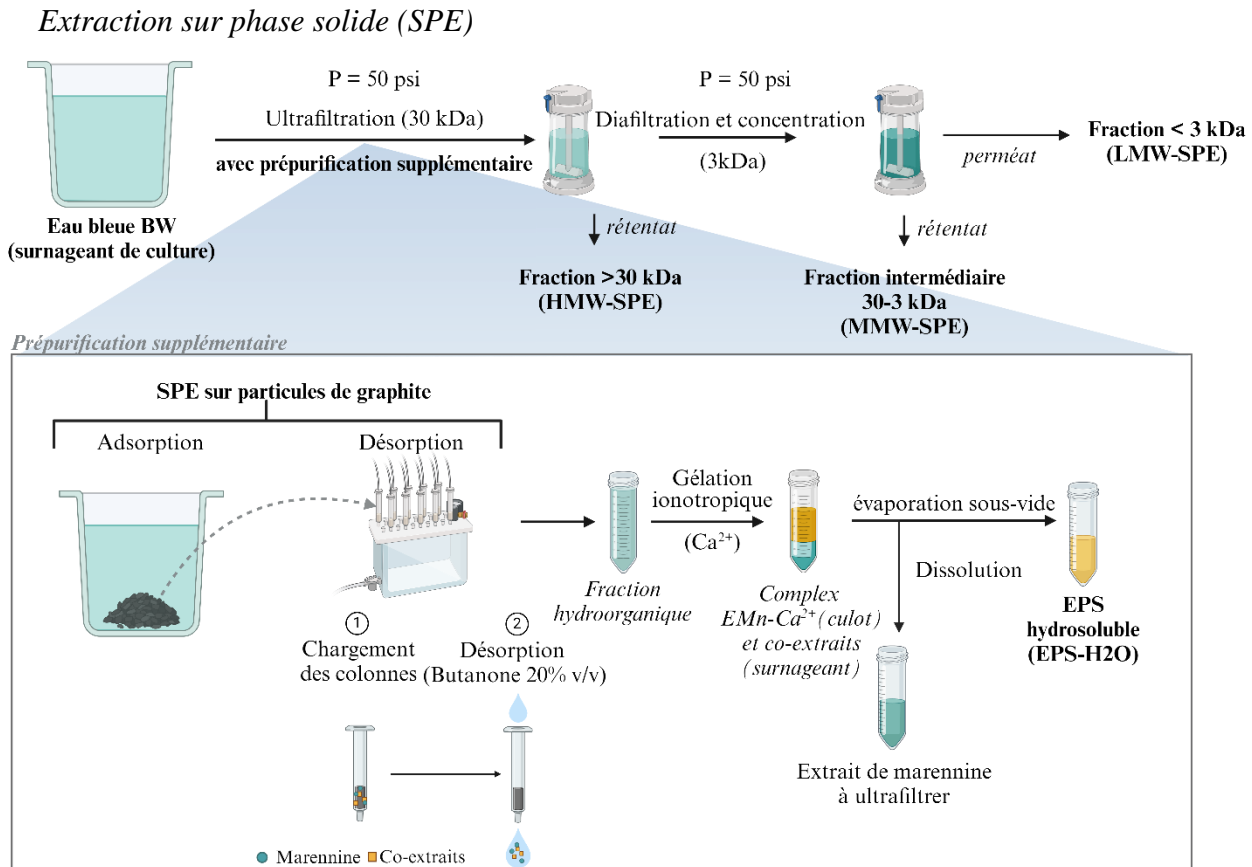


Figure 1.4 : Raffinage de l'eau bleue par extraction sur phase solide (SPE), combinée à une gélation ionotrope suivie d'une double ultrafiltration (d'après le protocole de Bélanger *et al. soumis*) créé avec BioRender.com.

Les eaux bleues produites lors des cultures en PBR ont été préconcentrées sur phase solide (flocons de graphite) (Figure 1.4). Cette approche permet la rétention de la fraction du perméat de culture contenant la marennine pour l'obtention d'un extrait brut hydroorganique (BW-SPE). Une poudre de graphite naturel, contenant des particules de taille 325 mesh, avec une uniformité de 50-70 %, et une teneur en carbone de 99 % (Sigma-Aldrich, CA) sont directement ajoutés au perméat du culture, à raison de 189 g de graphite.au.L de perméat (au, unité arbitraire référant à l'absorbance maximale dans le visible avec 1 cm de parcours optique). L'ensemble est soumis à une agitation mécanique vigoureuse dans un réservoir conique équipé d'un récipient à fond amovible (FermZilla Tri-Clover, KegLand, Noble Park North, Victoria, Australia), à l'aide d'une perceuse à percussion de marque King Canada (6.3

A, mandrin de 1/2 po), équipée d'un mélangeur à coulis de 24 po, puis laissé à décanter. Les flocons de graphites sont récupérés puis chargés sur une colonne de chromatographie frittée de 53 mm de diamètre par 254 mm de longueur effective (Synthware, Pleasant Prairie, WI, USA), pour procéder à l'élution du rétentat, en utilisant une solution aqueuse de butanone (20 %, v/v), à raison de 2 à 4 mL.g⁻¹ de graphite.

Gélation ionotropique et ultrafiltration

Une gélation ionotropique utilisant du phosphate disodique et de l'acétate de calcium est réalisée sur les extraits BW-SPE, comme proposé par Bélanger, *et al.*(*soumis*) (Figure 1.4). La réaction entre l'acétate de calcium et l'ion hydrogénophosphate forme un sel insoluble similaire à l'hydroxyapatite, qui en se liant aux groupements chargés négativement sur les chaînes de polymère, entraîne la formation d'un hydrogel de marennine. Une centrifugation est réalisée pour séparer la fraction bleue, contenant la marennine précipitée et la fraction jaune contenant des polymères extracellulaires (Exopolymeric substances, EPS) co-extraits lors de la SPE sur graphite. La marennine contenue dans 500 mL d'extrait brut hydroorganique contenant 20 % de butanone (v/v), a été précipitée en ajoutant successivement 25 mL d'une solution de 781 mM d'hydrogénophosphate de sodium et 25 mL d'une solution de 1041 mM d'acétate de calcium, atteignant ainsi des concentrations finales de 15 mM et 20 mM par unité d'absorbance à la longueur d'onde maximale dans le visible avec un parcours optique de 1 cm, respectivement. Les réactifs et l'extrait brut ont été mélangés directement dans un récipient de centrifugation d'une capacité de 1 L en polypropylène et agité pendant 10 minutes. Le volume a été ajusté à 1 L avec de l'eau nanopure avant d'être centrifugé à 4000 g pendant 10 minutes (Beckman Coulter Avanti J-E, rotor JLA 9.1000). Le surnageant a été conservé pour une extraction ultérieure des EPS. Le précipité a été rincé à trois reprises en le resuspendant dans 1 L d'eau nanopure et en centrifugeant pour éliminer le surnageant de lavage (4000 g, 10 min). Le précipité a ensuite été dissous dans de l'EDTA à pH 8, à une concentration correspondant à 1,5 mole d'EDTA par mole de calcium ajouté. La solution a été purifiée par ultrafiltration en cascade, à l'aide de membranes de cellulose régénérée (76 mm) de seuils de coupure moléculaire de 30, 3 et

1 kDa (Ultracel®, MilliporeSigma), menées sur cellules à agitation AMICON® 400 mL (MilliporeSigma, Oakville, ON, Canada), dans un réservoir Cornelius ball lock de 19 L (Amcyl, Wyoming, MN, USA) rempli d'eau nanopure et pressurisé avec de l'azote à 50 psi.

Les EPS ont été extraits à partir du surnageant de centrifugation, d'abord en éliminant le solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif (40°C, < 25 mbar). Le solide est ensuite dissous dans un volume minimal de HCl 30 mM, puis neutralisé avec une solution équimolaire de NaOH et filtré sous vide sur un filtre en cellulose (Whatman #2). La solution est ensuite diafiltrée en mode continu sur une membrane de 1 kDa avec de l'eau nanopure, congelée à -80°C, puis lyophilisée (FreeZone 2.5, Labconco, Kansas City, MO, USA). L'extrait sec est ensuite fractionné par cinq extractions solide-liquide avec du méthanol. Suite à l'ajout de méthanol, la suspension est centrifugée 5 minutes à 20 000 g, puis le surnageant est réservé, combiné puis évaporé pour donner la fraction EPS-MeOH. Le solide est évaporé sous jet d'azote et donne la fraction EPS-H₂O.

1.3 METHODES ANALYTIQUES

1.3.1 Suivi de culture

Pour assurer le suivi de la culture, un échantillonnage quotidien de 7 mL est effectué avant et/ou après une homogénéisation mécanique de la culture. L'agitation est permise grâce à la présence d'un barreau magnétique placé au moment de la stérilisation à l'intérieur de la chambre de culture. À l'aide d'un aimant, la culture peut ainsi être homogénéisée, et assurer un prélèvement homogène. L'accès à la culture se fait grâce à une sortie reliée à un tuyau de prélèvement immergé dans la culture. Au moment de l'échantillonnage, une seringue stérilisée est placée à l'extrémité extérieure du tuyau et le volume nécessaire est prélevé par aspiration. L'ouverture du tuyau est permise seulement pendant l'aspiration pour éviter toute entrée par cette ouverture, et la fermeture est assurée par une pince de Mohr. Cet échantillonnage est réalisé avant et après homogénéisation de la culture (Chapitre 3) ou

uniquement après homogénéisation (Chapitre 2), et lors de la première heure d'éclairage du cycle lumière/obscurité (14h/10h) (Figure 1.2).

1.3.1.1 Comptage cellulaire

La densité cellulaire (N (cell.L⁻¹)) de la culture a été déterminée par comptage sur cellule de Nageotte (Marienfeld, AQRA, India) (Figure 1.5) et calculée comme suit :

$$N = \frac{n}{V} \quad (\text{Équation 2})$$

avec n le nombre de cellules, V le volume de comptage, soit un volume de 5 μL correspondant à un comptage des 4 bandes de 1,25 μL . Tous les comptages sont réalisés en triplicata de 300 ± 50 cellules, à 3 endroits aléatoires de la chambre de comptage.

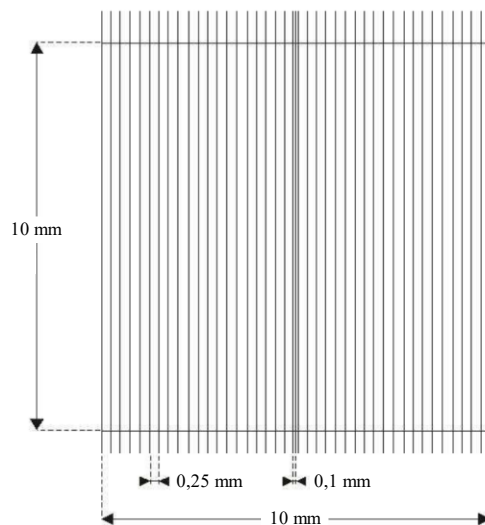


Figure 1.5 : Chambre de comptage d'une cellule de Nageotte. La chambre de comptage est séparée par des gravures en 40 bandes correspondant chacune à un volume de 1,25 μL .

Le taux de croissance moyen μ (j^{-1}) observé lors de la phase de croissance de la culture est calculé d'après la formule :

$$\mu = \frac{\ln(N_n/N_0)}{t_n - t_0} \quad (\text{Équation 3})$$

avec N_n la concentration de cellules présentes en culture au temps t_n dans la culture (cell.L^{-1})
 t_n temps écoulé depuis le début de la culture (jours, j). N_0 la concentration initiale de cellules
en culture à t_0

1.3.1.2 Dosage des pigments chloroplastiques

Le dosage des pigments chloroplastiques des cellules en culture a été réalisé selon le protocole de Ritchie, (2008). Trois volumes de 1,5 mL de culture ont été centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes. Les culots obtenus ont été remis en suspension dans 1,5 mL de solution d'acétone à 90 % et homogénéisés par sonication, jusqu'à la disparition complète du culot et de suspension visible à l'œil nu. Après 3 heures à l'obscurité et à 4°C, les 3 homogénats ont été centrifugés 15 minutes à 2400 g. Les surnageants obtenus ont ensuite été analysés par spectrophotométrie visible (spectrophotomètre JASCO V-630). Finalement, les concentrations des échantillons en chlorophylle a ($[\text{Chl}_a]$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$), chlorophylle c ($[\text{Chl}_c]$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$) et caroténoïdes totaux ($[\text{CarT}]$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$) ont été obtenues grâce aux équations de Caspers et Ritchie (Caspers, 1970 ; Ritchie, 2008), et aux mesures d'absorbance à 480 nm, 630 nm, 645 nm, 665 nm, 750 nm des homogénats, telles que:

$$[\text{Chl}_a] = (-0,3002 * (A_{630} - A_{750}) - 1,7538 * (A_{645} - A_{750}) + 11,9092 * (A_{665} - A_{750})) * \frac{V_{\text{acetone}}}{V_{\text{échantillon}}} * l \quad (\text{Équation 4})$$

$$[\text{Chl}_c] = (23,6723 * (A_{630} - A_{750}) - 7,9057 * (A_{645} - A_{750}) - 1,5467 * (A_{665} - A_{750})) * \frac{V_{\text{acetone}}}{V_{\text{échantillon}}} * l \quad (\text{Équation 5})$$

$$[\text{CarT}] = (4 * (A_{480} - A_{750})) * \frac{V_{\text{acetone}}}{V_{\text{échantillon}}} * l \quad (\text{Équation 6})$$

$$P^T_{\text{spe}} (\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}) = \frac{[\text{Chl}_a] + [\text{Chl}_c] + [\text{CarT}]}{N} * 10^3 \quad (\text{Équation 7})$$

avec A_λ l'absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde donnée (λ), V_{acetone} le volume d'acétone utilisé pour l'extraction des pigments (mL), V_{sample} le volume de l'échantillon initial

(mL), l la longueur du trajet optique (cm), Chl_a , Chl_c et $CarT$ respectivement chlorophylle a, chlorophylle c et caroténoïdes totaux, et P_{spe}^T la teneur spécifique en pigments totaux ($\mu\text{g}\cdot 10^6\text{cell}^{-1}$).

1.3.1.3 Modélisation de la croissance de la population

Dans le cadre du chapitre 2 et 3, la courbe de croissance de la population de *H. ostrearia* a été modélisée pour faciliter les comparaisons d'une culture à l'autre. Cette modélisation a été effectuée à partir de deux indicateurs de la biomasse, la concentration en cellules dans la culture, N ($\text{cell}\cdot\text{L}^{-1}$), et la concentration en chlorophylle a dans la culture (Thiviyanathan *et al.*, 2024), $[Chl_a]$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Le modèle utilisé est celui de Gompertz (Gompertz, 1997 ; Tjørve et Tjørve, 2017) :

$$Y = A * e^{(-e^{(-\mu_{max}*(X-X_c)})} \quad (\text{Équation 8})$$

avec Y , concentration de la biomasse selon l'indicateur utilisé ($N \cdot 10^6 \text{ cell}\cdot\text{L}^{-1}$ ou $[Chl_a] \mu\text{g}_{Chl_a}\cdot\text{mL}^{-1}$), A , asymptote de la courbe, correspondant à concentration maximale de biomasse atteinte ($N_{max} \cdot 10^6 \text{ cell}\cdot\text{L}^{-1}$ ou $[Chl_a]_{max} \mu\text{g}_{Chl_a}\cdot\text{mL}^{-1}$), μ_{max} le taux de croissance maximal (j^{-1}), X_c , le jour auquel la biomasse atteint le centre de sa phase exponentielle de croissance (j), et X variable du jour de culture (j).

Pour permettre la modélisation des courbes de culture, les données ont été transformées selon le logarithme népérien, et la biomasse initiale n'étant pas nulle, celle-ci a été prise en compte telle $Y_x = \ln\left(\frac{[biomasse]_x}{[biomasse]_1}\right)$, sachant que pour $X = 1 \text{ j}$, la biomasse initiale valait $N = 100 \cdot 10^6 \text{ cell}\cdot\text{L}^{-1}$ et $[Chl_a] = 244 \mu\text{g}_{Chl_a}\cdot\text{mL}^{-1}$.

La modélisation a été réalisée avec le logiciel R, à l'aide des ensembles de fonctions « nlme » et « twNlme ».

1.3.1.4 Mesure fluorimétrique

Dans le cadre de l'étude du chapitre 3, des analyses fluorimétriques utilisant la fluorimétrie par modulation d'impulsions en amplitude (*pulse-amplitude modulation*, PAM) (Figure 1.6) ont été réalisées hors ligne, à partir de l'échantillonnage quotidien avant homogénéisation de la culture, comme décrit plutôt. Ces mesures ont eu pour objectif de vérifier la faisabilité d'un suivi des capacités photosynthétiques des cellules en culture, comme indicateur de l'état général de la culture. Des paramètres découlant de ces mesures, le rendement d'utilisation de la lumière par le photosystème II (F_q'/F_m') à une intensité lumineuse de $200 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a été utilisé comme indicateur apportant une information sur le niveau de saturation des photosystèmes des cellules dans des conditions lumineuses proches de celles retrouvées en culture.

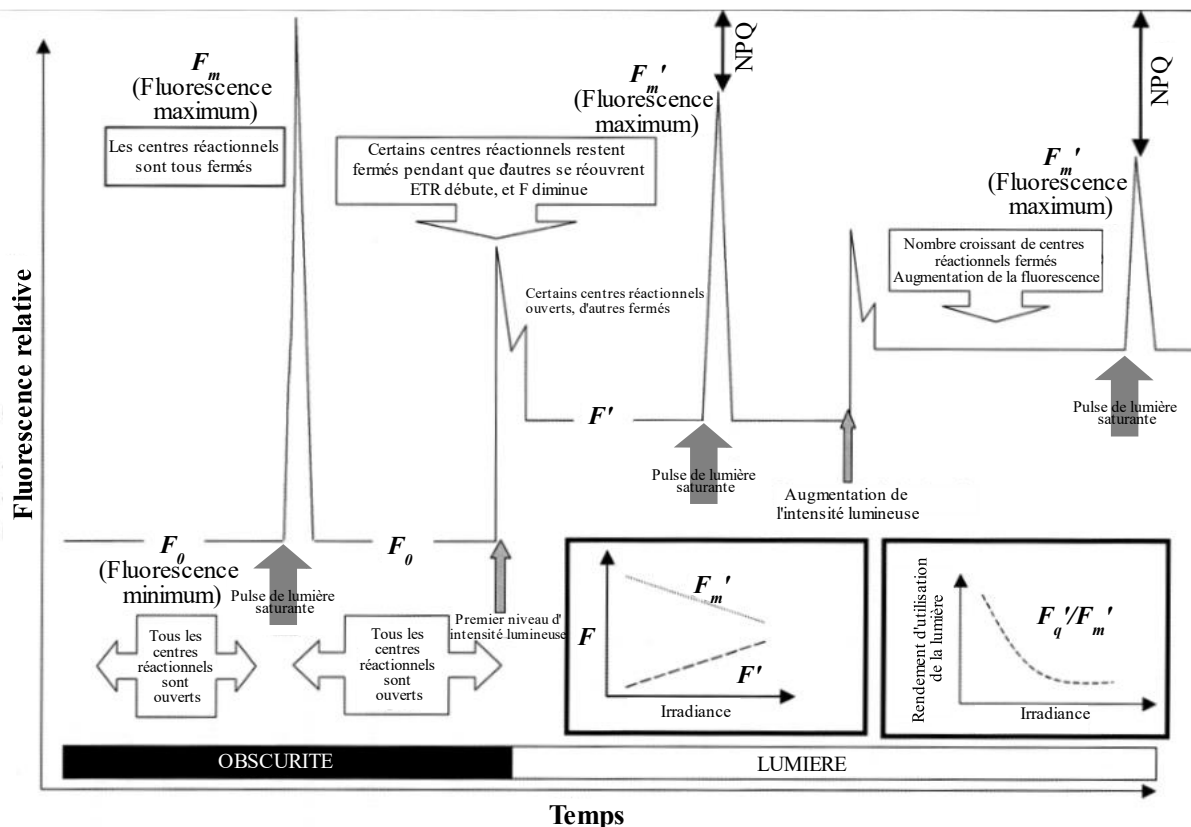


Figure 1.6 : Tracé théorique de la fluorescence émise par le photosystème II face au protocole d'irradiance du fluorimètre PAM (adapté de Consalvey *et al.*, 2005)

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un fluorimètre WaterPam (Walz, Allemagne) après ajout d'un échantillon de culture de *H. ostrearia* NCC 531 dans une cuve d'analyse en quartz. La fluorescence de départ (F_t) est fixée entre 150 et 250 (unité arbitraire) au début de l'analyse par dilution avec de l'eau de mer de salinité 28 ppt. Avant de démarrer l'analyse, les cellules sont maintenues dans l'obscurité pendant 15 minutes afin de désaturer les antennes collectrices de photons. Les échantillons ont ensuite été exposés à neuf étapes d'irradiation incrémentielle de 30 secondes (0, 75, 109, 165, 245, 346, 479, 773, 1127 $\mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) permettant de calculer à chaque niveau de lumière actinique, c'est-à-dire qui déclenche la réaction photochimique de la photosynthèse (PAR, *Photosynthetic Active Radiation* allant de 400 to 700 nm), le taux de transport d'électrons relatif (rETR) à travers le PSII :

$$rETR = \frac{F_q'}{F_m'} * \frac{PAR}{2} \quad (\text{Équation 9})$$

avec PAR, le niveau d'irradiance de la lumière actinique ($\mu\text{mol.photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), F_m' la fluorescence après saturation par un pulse de lumière saturante, et F_q' la fluorescence variable entre le stade saturé et le stade avant saturation à une intensité de PAR donnée, et 2 était un facteur de division basé sur l'hypothèse que la moitié des quanta absorbés étaient distribués au PSII, et le reste au PSI.

La mesure du rendement de fluorescence à l'obscurité (F_0) s'est effectuée après la période d'incubation à l'obscurité et correspond à la fluorescence de base de l'antenne collectrice PSII lorsque tous les électrons accepteurs sont oxydés. Un pulse de lumière saturante entraîne alors la saturation maximale de cette antenne, et permet de mesurer le rendement de fluorescence maximal de l'antenne collectrice fermée (F_m). Une fois ces deux valeurs mesurées, le rendement photosynthétique maximal des cellules en culture peut être calculé avec l'équation 10 :

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m} \quad (\text{Équation 10})$$

F_v correspond alors à la fluorescence variable, la fraction de l'énergie photonique absorbée convertible en énergie chimique.

Selon la même approche, ces deux mesures sont prises après exposition des cellules à une intensité lumineuse de 200 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. La mesure du rendement de fluorescence de l'antenne à intensité lumineuse choisie (F') se fait après cette période d'incubation et correspond à la fluorescence de l'antenne collectrice PSII dans cet environnement lumineux. Un pulse de lumière saturante entraîne alors la saturation maximale de cette antenne, et permet de mesurer le rendement de fluorescence de l'antenne collectrice, lorsque celle-ci est adaptée à l'intensité lumineuse choisie ($F_{m'}$). À partir de ces deux valeurs mesurées, le rendement d'utilisation de la lumière par le photosystème II des cellules dans les conditions de culture peut être calculé avec l'équation 11 :

$$\frac{F_{q'}}{F_{m'}} = \frac{F_{m'} - F'}{F_{m'}} \quad (\text{Équation 11})$$

1.3.1.5 Biométrie

Le biovolume des cellules ($B_v, \mu\text{m}^3$) est estimé au début et à la fin de chaque culture, selon l'approche proposée par Hillebrand *et al.* (1999). Un prisme à base elliptique est choisi pour simplifier la forme des cellules de *H. ostrearia*, et permettre le calcul du biovolume. La hauteur de la cellule (c sur la Figure 1.7) et la largeur transapicale (b sur la Figure 1.7) sont considérées comme équivalentes dans le cadre d'une estimation du biovolume. Lorsque les cellules présentent une déformation du frustule (NCC531), la largeur maximale a été retenue. La formule de biovolume résultant de cette standardisation est la suivante :

$$B_v = \frac{\pi}{4} * a * b^2 \quad (\text{Équation 12})$$

avec a la longueur de la cellule de *H. ostrearia* (μm) et b la largeur de la cellule (μm) en vue valvaire.

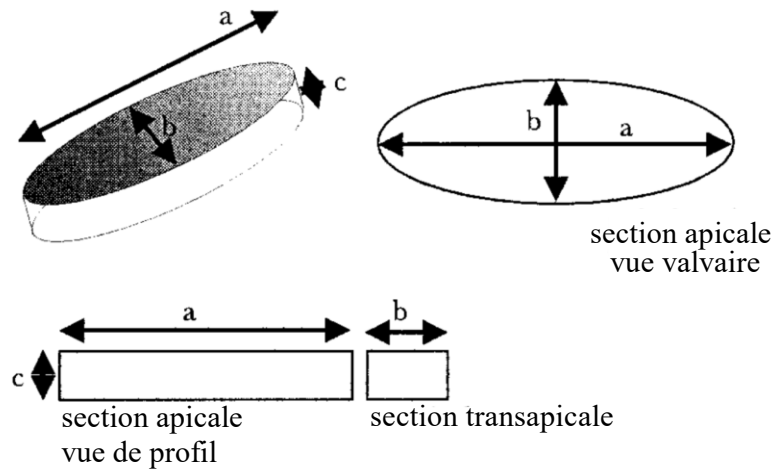


Figure 1.7 : Simplification de la structure des diatomées pennées permettant le calcul du biovolume des cellules (adaptée de Hillebrand *et al.*, 1999). a correspond à la longueur, b la largeur, c la hauteur des cellules.

Dans le cadre de l'étude menée dans le chapitre 2, la productivité volumétrique en marennine (P_v (Équation 15 équation 15) est normalisée en fonction de l'estimation du biovolume des cellules dans 1L de culture ($[B_v]$) pendant la phase stationnaire. La productivité biovolumique en EMn (P_b) ($\text{mg}_{\text{EMn}} \cdot \mu\text{m}^{-3} \cdot \text{j}^{-1}$) des différentes cultures est calculée selon la formule suivante :

$$P_b = \frac{P_v}{[B_v]} \quad (\text{Équation 13})$$

avec P_v , la productivité volumétrique en EMn du procédé de culture ($\text{mg}_{\text{EMn}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$), et $[B_v]$, le biovolume de cellules dans 1 L de culture ($\mu\text{m}^3 \text{L}^{-1}$)

1.3.1.6 Dosage de marennine

La concentration en marennine extracellulaire ($[\text{EMn}]$, $\text{mg}_{\text{EMn}} \cdot \text{L}^{-1}$) de la culture est estimée suivant la méthode spectrophotométrique proposée par Pouvreau *et al.* (2006a). À

partir de 1,5 mL de culture centrifugée, le surnageant est récupéré et son absorbance à 669 nm est mesurée (Gargouch *et al.*, 2022 ; Nghiem-Xuan, 2019). La concentration en EMn est alors estimée selon l'équation suivante (loi de Beer-Lambert) :

$$[EMn] = \frac{A_{669}}{\epsilon * l} * M \quad (\text{Équation 14})$$

avec A : mesure d'absorbance à 669 nm, pic d'absorbance de EMn au pH de la culture, ϵ : coefficient d'extinction molaire de l'EMn déterminée par Pouvreau en 2006a ($\epsilon = 12 \times 10^4$ L.mol⁻¹), l : longueur du trajet optique dans la cuve (cm), M : masse molaire de l'EMn déterminée par Pouvreau en 2006a ($M = 9893 \times 10^3$ mg.mol⁻¹). Chaque mesure d'absorbance est réalisée en triplicata.

À partir de cette mesure de concentration, les productivités volumétrique (P_v , mg_{EMn}.L⁻¹.j⁻¹) et spécifique (P_s , mg_{EMn}.cell⁻¹.j⁻¹) sont calculées d'après les formules proposées par Gargouch *et al.*, 2022, et à partir des données récoltées en phase stationnaire des cultures:

$$P_v = [EMn] * D \quad (\text{Équation 15})$$

$$P_s = \frac{P_v}{N} \quad (\text{Équation 16})$$

avec [EMn], la concentration moyenne en EMn retrouvée dans la culture en phase pseudo-stationnaire (mg.L⁻¹), D : taux de dilution appliquée à la culture (j⁻¹), N , la concentration cellulaire moyenne dans la culture en phase stationnaire (cell.L⁻¹)

1.3.1.7 Suivi de la composition du milieu

Un suivi de l'évolution de la composition du milieu nutritionnel le long d'une culture en fed-batch de *H. ostrearia* a été réalisé dans le cadre du chapitre 3. Ces analyses ont été réalisées au laboratoire GEPEA, et complétées par un organisme de sous-traitance (QARBONE, Groupe 6NAPSE).

Une analyse en chromatographie ionique a permis de doser les niveaux de nitrates (NO₃⁻) dans le surnageant de culture récolté pendant la phase de croissance exponentielle, celui de la phase stationnaire puis celui de la phase sénescence. La salinité du milieu

nutritionnel étant élevée (28 ppt), une dilution par 20 a dû être effectuée en amont de l'analyse pour ne pas saturer la colonne en ion chlorure. La chromatographie anionique ICS 900 (Dionex, USA) est équipée d'une pré-colonne AG9-HS (Dionex, USA) et d'une colonne AS9-HS (5x250 mm) (Dionex, USA) greffée avec des groupements alkyles possédant un ammonium quaternaire en fin de chaîne. Les éluants sont composés d'une solution de Na_2CO_3 à 6 mmol.L^{-1} ainsi que d'une solution de NaHCO_3 à 1 mmol.L^{-1} circulant à $0,9 \text{ mL.min}^{-1}$. A cela s'ajoute un passeur automatique d'échantillon AS40 (Dionex, USA) et un supprimeur à micro-membranes MMS 300 (Dionex, USA) alimenté par une solution de H_2SO_4 à 25 mmol.L^{-1} circulant à un débit de $1,8 \text{ mL.min}^{-1}$. Lors de l'élution, les anions et cations sont détectés par conductimétrie et les concentrations sont obtenues par étalonnage externe.

Du fait de la dilution effectuée pour éviter la saturation en ions chlorures de la colonne, les ions silicates et phosphates se sont avérés non quantifiables par chromatographie anionique. En complément, une analyse élémentaire a donc été menée par spectrométrie à émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES) (iCAP Pro Duo – Thermo Scientific). L'échantillon mis en solution est vaporisé au cœur d'un plasma induit d'argon, qui peut atteindre des températures de $8000 \text{ }^\circ\text{C}$. À une température aussi élevée, toute substance à analyser subit une atomisation, une ionisation et une excitation thermique. L'ICP-AES repose sur l'excitation thermique des ions dans le plasma et l'analyse de la lumière émise par ces ions excités lorsqu'ils retournent à leur état fondamental. Chaque élément émet des longueurs d'onde caractéristiques. Les longueurs d'onde sont alors séparées et envoyées vers un détecteur puis identifiées et leurs intensités mesurées par un spectromètre. La concentration élémentaire est ensuite déterminée par un étalonnage externe. De cette manière le silicium et le phosphore ont été quantifiés.

1.3.2 Mesure des bioactivités

L'analyse de la qualité des différents extraits de marennine a été réalisée suivant une approche se voulant appliquée, c'est-à-dire en passant par une étude des bioactivités de ces

derniers, pour inscrire ce travail au plus proche du contexte d'application de la marennine comme intrant en aquaculture. L'étude des activités biologiques des extraits de marennine a été combinée aux analyses chimiques menées pour la caractérisation des extraits (voir 1.3.3). L'ensemble devrait permettre d'apporter de nouveaux éléments pour l'élucidation des liens structure-activité portés par la marennine (chapitre 4).

1.3.2.1 Activité antioxydante

L'activité antioxydante des différents extraits de marennine obtenus au cours de cette étude a été évaluée à l'aide d'un kit de test DPPH (Dojindo Lab., Kumamoto, Japan). Ce test utilise le radical 1,1-Diphényl-2-(2,4,6-trinitrophényl)hydrazine (DPPH, $C_{18}H_{13}N_5O_6$) comme radical oxydant (Figure 1.8). L'évaluation des capacités antioxydantes d'un extrait se traduit alors par sa capacité à piéger le radical DPPH. Cette molécule présente un changement de son absorbance à 517 nm lors de sa réduction, permettant de quantifier par suivi spectrophotométrique le pourcentage de radical DPPH réduit suite à son exposition à l'extrait testé. Pour chaque extrait, une série de dilutions est effectuée afin d'obtenir une courbe de dose réponse du pourcentage de piégeage du radical DPPH en fonction de la concentration en antioxydant en solution. À partir de la courbe d'inhibition obtenue, peut

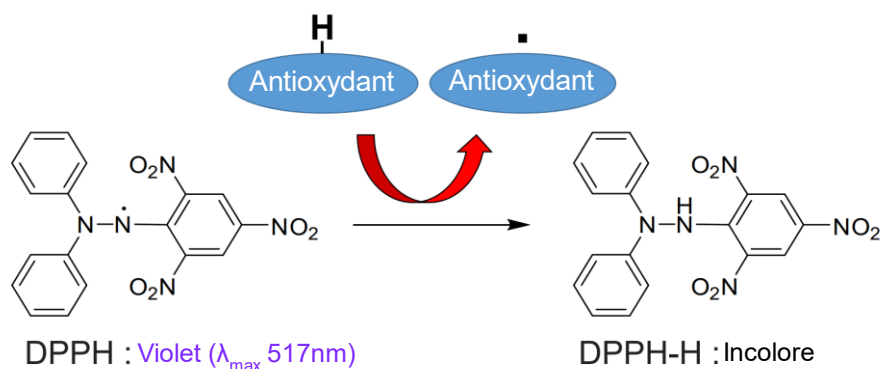


Figure 1.8 : Réaction de réduction du radical DPPH par un agent antioxydant. La réduction du radical 1,1-Diphényl-2-(2,4,6-trinitrophényl)hydrazine (DPPH) entraîne une décoloration de la solution, permettant d'évaluer les capacités de piégeage de radical oxydant d'une molécule antioxydante par suivi spectrophotométrique à la longueur d'onde 517 nm. (adaptée du manuel technique d'utilisation du kit DPPH, Dojindo)

alors être déduite la concentration de l'extrait antioxydant permettant de réduire 50% du radical DPPH (IC50), soit une baisse de 50 % de l'absorbance à 517 nm relativement au témoin ne contenant pas d'antioxydant.

Le protocole proposé par Dojindo (Shimamura *et al.*, 2014) a été adapté aux extraits de marennine, pour permettre l'évaluation des capacités antioxydantes des extraits de marennine à tous les niveaux de raffinage, de l'eau bleue à un extrait purifié. Premièrement, pour effectuer le test dans la gamme d'activité de la marennine et détecter une activité antioxydante, le ratio molaire entre le DPPH et la marennine purifiée devant permettre d'atteindre l'IC 50 de cet extrait a été calculé à partir des résultats de Pouvreau *et al.* (2008a). D'après cette étude, la marennine purifiée permet le piégeage de 50% des radicaux DPPH en solution lorsque la concentration de marennine équivaut à 3% de celle du radical DPPH. Au vu des productions de marennine atteignable au cours de cette étude, il a été décidé de diviser d'un facteur 5, la solution initiale de DPPH. Ensuite, comme suggéré par Gang *et al.*, (2021), l'éthanol 99% utilisé pour préparer la solution de DPPH a été changé pour une solution d'éthanol 70%, évitant la formation d'un trouble lors de la présence de sels dans l'extrait antioxydant testé. La présence de sels liés à la structure de la marennine étant suspectée malgré la dialyse effectuée, cette adaptation doit permettre de retirer ce biais potentiel. Finalement, la capacité de l'extrait testé à piéger les radicaux DPPH a été calculée comme étant le pourcentage de réduction de l'absorbance à 517 nm (I_{DPPH} , %), après 30 minutes d'incubation à 25°C selon l'équation suivante :

$$I_{DPPH} = \frac{(Abs_{DPPH-0} - Abs_{solvent}) - (Abs_{DPPH-X} - Abs_{échantillon})}{(Abs_{DPPH_0} - Abs_{solvent})} * 100 \quad (\text{Équation 17})$$

avec Abs_{DPPH-0} l'absorbance de la solution de DPPH combinée au solvant de l'extrait, $Abs_{solvent}$ absorbance de la solution d'éthanol 70% sans DPPH, combiné au solvant de l'extrait (eau nano pure pour les extraits de marennine dialysés, éthanol 70% pour les extraits de Trolox), Abs_{DPPH-X} l'absorbance du DPPH en solution avec l'extrait de concentration X, $Abs_{échantillon}$ l'absorbance de l'éthanol 70% sans DPPH en solution avec l'extrait de

concentration X (équivalent à $Abs_{solvent}$ si l'extrait testé n'absorbe pas dans le visible, comme le Trolox).

Pour chaque réplica, une régression de la courbe dose-réponse a alors été modélisée, traçant la relation mathématique entre les valeurs d' I_{DPPH} (%) obtenues et les concentrations d'extrait de marennine auxquelles le radical DPPH a été exposées. Cette modélisation est effectuée suivant l'approche de Pouvreau *et al.* (2008a) par l'intermédiaire d'une fonction logistique à 4 paramètres. L'équation utilisée a été proposée par Malyutina *et al.*, 2023 :

$$I_{DPPH} = \alpha + \frac{\delta}{(1+e^{-\mu*(X-\phi)}} \quad (\text{Équation 18})$$

où X est la concentration de l'extrait testé, α la valeur de I_{DPPH} quand X tend vers moins l'infini ($-\infty$), μ la pente de la courbe logistique, ϕ la constante de position de la courbe logistique, correspond à X quand I_{DPPH} vaut 50%, et δ la hauteur de la courbe. La valeur maximale théorique de I_{DPPH} , quand X tend vers plus l'infini ($+\infty$) vaut $(\alpha+\delta)$.

Ces modélisations ont été réalisées à l'aide du logiciel R (version R-4.3) et de l'ensemble de fonctions « drda » (Malyutina *et al.*, 2023). À partir de ces régressions, les valeurs de X pour lesquelles I_{DPPH} vaut 50% ont été extraites et correspondent à l'IC50. Lorsque les concentrations d'extraits disponibles ne permettaient pas d'atteindre expérimentalement l'IC50, c'est l'IC20 qui a été extrait du modèle, soit la valeur de X à laquelle I_{DPPH} vaut 20%. Pour chaque échantillon testé, la mesure de l'activité antioxydante a été réalisée en triplicata (n=3) et les résultats de chaque test ont été modélisés séparément, de manière à obtenir des valeurs moyennes d'IC50 et d'IC20.

Suivant le protocole du kit DPPH (Dojindo Laboratories), l'activité antioxydante d'une molécule standard fournie, le Trolox (acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique) analogue hydrophile de la vitamine E, est mesurée. La solution initiale de Trolox a été diluée par 5, comme l'a été la solution initiale de DPPH. De cette manière une régression linéaire a pu être réalisée pour modéliser la réponse du radical DPPH en fonction de la concentration de Trolox. De la même manière que pour les extraits de marennine testés, les valeurs d'IC50 ont pu être déduites de ces régressions. À partir de

ces données, le TEAC (Capacité antioxydante en équivalent Trolox, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) a été calculé :

$$TEAC = \frac{IC_{50}Trolox}{IC_{50}échantillon} \quad (\text{Équation 19})$$

Le TEAC a ainsi permis la comparaison des activités antioxydantes d'un extrait à celle d'un standard antioxydant, obtenues dans les mêmes conditions expérimentales comme proposé par Shimamura *et al.* (2014).

1.3.2.2 Activité antibactérienne

Cette partie expérimentale a été réalisée dans le laboratoire de Marylise Duperruy, au département de microbiologie, infectiologie, immunologie de l'Université de Montréal, Québec.

L'étude de l'activité antibactérienne des différents extraits de marennine est basée sur les résultats Falaise *et al.* (2019b). À partir de cette étude, quatre souches de *Vibrio splendidus* ont été retenues pour les réponses d'inhibition de croissance à l'exposition à un extrait de marennine : *V. splendidus* 4D1-8, 4G4-G, 4G1-8, 3T8-11. Elles ont été fournies par le Laboratoire de biologie intégrative des modèles marins (LBI2M) (Station biologique de Roscoff, France) où elles ont été isolées à partir de tissus d'huîtres, *V. splendidus* 4D1-8, 4G4-4, et 3T8-11 montrant une virulence modérée à leur rencontre (Oyanedel *et al.*, 2020).

Les souches de *Vibrio* ont été conservées à -80 °C dans 20% de glycérol. Les cultures en suspension ont été préparées avec un milieu de culture LB autoclavé, ajusté en sels, par l'ajout de 2% de NaCl (LB 2%NaCl), tout comme les milieux gélosés, préparés avec une gélose LB autoclavée à laquelle 2% de NaCl (LBA 2%NaCl) ont été ajoutés. Avant les essais antibactériens, chaque souche de *Vibrio* a été isolée sur une gélose LBA, les plaques contenant des colonies isolées ont été conservées à température ambiante pendant une semaine au maximum. Avant le test, trois colonies différentes par boîte de Petri (réplicas biologiques, n=3) ont été inoculées dans 5 ml de LB 2%NaCl et cultivées pendant une nuit à

température ambiante (20°C) et sous agitation modérée (130 rpm). Le lendemain, à partir de la culture de la veille, 100 µL de la suspension bactérienne ont été transférés dans 5 mL de LB 2%NaCl et incubés à 20°C sous agitation (130 rpm) jusqu'à atteindre une densité optique à 600 nm (OD600nm) de 2. Cet inoculum a été repiqué, 100 µL dans 5 ml de LB 2%NaCl, 2 heures avant le test de réponse antibactérienne, afin de s'assurer que l'inoculum soit en phase exponentielle de croissance au moment du test. Juste avant l'inoculation de la microplaque 96 puits, 1µL de l'inoculum a été ajouté à 14 mL de milieu de culture LB 2%NaCl concentré 3 fois, de sorte qu'un inoculum d'OD600 de 0,0001 soit utilisé. La souche de *Vibrio* a été exposée à une série de dilutions de l'extrait de marennine étudié (dilution effectuée avec 3xLB 2%NaCl). L'analyse de l'activité antibactérienne (Figure 1.9) a été effectuée sur une microplaque à 96 puits sur laquelle 25µL d'inoculum ont été ajoutés à 75 µL d'extrait de marennine. Chaque concentration a été testée 3 fois, et un blanc a été réalisé avec 25µL de LB 2%NaCl concentré et 75 µL de la dilution correspondante de l'extrait de marennine. La microplaque inoculée a été placée dans un incubateur de 24h, à 20°C, avec une agitation de 160 rpm. La concentration de la population bactérienne par puit a finalement été estimée par mesure de l'absorbance à 600 nm de ces puits (lecteur de plaque SpectraMax ID3). L'inhibition de la croissance (I_{Vibrio} , %) de la population de *Vibrio* en a été déduite à partir de l'équation suivante :

$$I_{Vibrio} = \frac{(Abs_t - Abs_{LB}) - (Abs_i - Abs_{\text{échantillon}})}{(Abs_t - Abs_{LB})} * 100 \quad (\text{Équation 20})$$

avec Abs_t l'absorbance à 600 nm du puit contenant 100 µL de culture de la souche de *Vibrio*, Abs_{LB} l'absorbance à 600 nm du puit contenant 100µL de milieu LB, Abs_i l'absorbance à 600 nm du puit contenant la souche *Vibrio* exposée à l'extrait de marennine, $Abs_{\text{échantillon}}$ l'absorbance à 600 nm du puit contenant le milieu de culture LB non inoculé et l'extrait de marennine à la concentration correspondante.

Pour chaque réplica biologique une régression de la courbe dose-réponse a alors été modélisée, traçant la relation mathématique entre les valeurs d' I_{Vibrio} (%) obtenues et les concentrations d'extrait de marennine auxquelles la souche a été exposée. Cette modélisation a été effectuée à l'aide de l'ensemble de fonctions « drda » du logiciel R (version R-4.3). La

fonction logistique à 4 paramètres (voir équation 18) s'est révélée être la plus à même à modéliser les courbes doses-réponses obtenues, après comparaison à une modélisation par fonction logistique à 2, 3 et 5 paramètres, d'après le Akaike Information Criterion (AIC) (Malyutina *et al.*, 2023).

À partir de ces régressions, les valeurs de X pour lesquelles I_{Vibrio} vaut 50% ont été extraites et correspondent à l'IC50. Lorsque les concentrations d'extraits disponibles ne permettaient pas d'atteindre expérimentalement l'IC50, c'est l'IC20 qui a été extrait du modèle, soit la valeur de X à laquelle I_{Vibrio} vaut 20%. Pour chaque extrait de marennine, l'inhibition de croissance a été mesurée en triplicata biologique (n=3) et les résultats de chaque test ont été modélisés séparément, de manière à obtenir des valeurs médianes d'IC50 et d'IC20. L'utilisation de la médiane a permis de comparer les extraits de marennine selon leur efficacité d'inhibition de croissance de *Vibrio*, en limitant le biais lié à la variabilité biologique observée d'un réplica à l'autre. Cette variabilité, lorsqu'observée, a été discutée.

Lorsque l'absence totale de croissance bactérienne a été observée, une remise en culture sur gélose, milieu dépourvu d'extrait de marennine, a été réalisée pour différencier une activité bactéricide (absence de développement après remise en culture), et une activité bactériostatique (reprise de la croissance bactérienne après remise en culture). La concentration d'extrait de marennine permettant cette absence de croissance peut alors être considérée comme concentration minimale bactéricide (MBC) ou bien concentration

minimale d'inhibition de la croissance bactérienne (MIC) respectivement, si cet évènement n'est pas isolé et se répète au cours des triplicata biologiques.

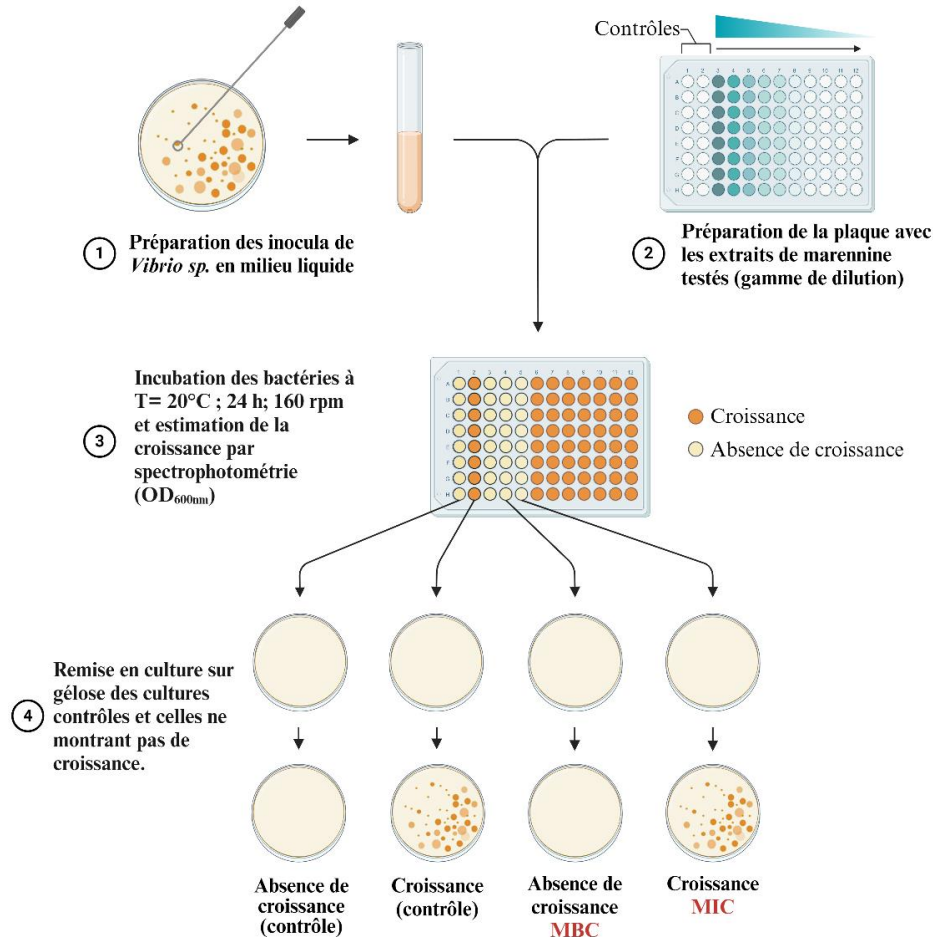


Figure 1.9 : Schéma illustrant le protocole suivi pour l'analyse de l'activité antibactérienne des extraits de marennine sur différents souches de *V. splendidus*. MIC: Concentration Minimum d'inhibition. Les bactéries ne se développent plus en présence du composé testé, mais leur croissance reprend après remise en culture sur gel d'agar. MBC: Concentration Bactéricide Minimum. Les bactéries ne se développent pas en présence de l'extrait testé, et leur croissance ne reprend pas une fois remises en culture sur gel d'agar (créé avec BioRender.com).

1.3.3 Caractérisation chimique des extraits de marennine

1.3.3.1 Coefficient d'absorptivité massique

Le coefficient d'absorptivité massique (ϵ_m) a été calculé de manière à quantifier la pureté du chromophore de la marennine dans l'extrait concerné. Pour l'obtenir, un extrait de marennine en solution de volume et d'absorbance à λ_{\max} (A_λ) connus a été lyophilisé, et sa concentration massique (C_m , g.L⁻¹) déterminée par pesée (Cubis 3.6P-2500-M, Sartorius, Goettingen, Germany). Le pic d'absorbance dans le visible λ_{\max} a été déterminé au préalable pour chaque extrait, par mesure du spectre d'absorbance, entre 400 et 800 nm, de l'extrait de marennine en solution à l'aide du spectrophotomètre (Cary 100, Agilent/Varian, Santa Clara, CA, USA). Cela a permis d'ajuster la valeur de A_λ au λ_{\max} pour chaque extrait de marennine. Ce pigment connu pour ses propriétés halochromiques, étudié à plusieurs étapes de son raffinage pourrait observer des changements au niveau de λ_{\max} qui, si non pris en compte, entraînerait une sur- ou sous-estimation de ϵ_m . Le coefficient d'absorptivité massique ϵ_m (L.cm⁻¹. g⁻¹) de l'extrait a été calculé selon la Loi de Beer Lambert :

$$\epsilon_m = \frac{A_\lambda}{C_m * l} \quad (\text{Équation 21})$$

avec A_λ l'absorbance maximale du chromophore en solution, à une longueur d'onde λ_{\max} , l la longueur du trajet optique dans la cuve (cm), C_m la concentration massique de l'extrait (g.L⁻¹).

1.3.3.2 Dosage de sucres totaux

La pureté des extraits de marennine a également été estimée par un dosage de sucres totaux, la structure polysaccharidique de la marennine ayant été démontrée Zebiri *et al.*, 2023. Ce dosage a été réalisé suivant la méthode de DuBois *et al.*, 1956. Ce dosage colorimétrique permet de quantifier dans un extrait les oses libérés après hydrolyse à l'acide sulfurique. Ces oses libres en présence de phénol se condensent, donnant à la solution une couleur jaune, dont l'absorbance à 483 nm est proportionnelle à la quantité d'oses en solution. La

concentration en sucres totaux d'une solution se fait alors à partir d'un étalonnage externe réalisé avec un standard de glucose, permettant d'obtenir des concentrations de sucres totaux en équivalent glucose.

A 53 μL d'extrait de marennine analysé a été ajouté 53 μL de solution de phénol (50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, Phenol, solid, A92-500, FisherScientific). Après l'ajout de 160 μL d'acide sulfurique (99%), la solution a été laissée 10 minutes à température ambiante pour l'hydrolyse. Le mélange a ensuite été homogénéisé 1 minute, puis incubé pendant 30 minutes à 35°C et l'absorbance de la solution mesurée à 483 nm. La concentration finale a été exprimée en équivalent glucose (D-(+)-Glucose, C8270-25KG, Sigma).

1.3.3.3 Analyses spectrales

L'évolution de l'environnement chimique des différents extraits de marennine a été étudiée par la biais d'analyses spectrales. Ces analyses viennent compléter les données obtenues sur les bioactivités des différents extraits pour aider à la compréhension des liens entre les structures et les activités de la marennine. Les analyses menées n'ont pas vocation d'élucider la composition précise de l'extrait, mais bien d'apporter des éléments d'explication quant aux éventuelles variations de bioactivité qui pourraient être observées.

Spectre UV-Vis

Les spectre UV-Vis des différents extraits étudiés sont obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre (Cary 100, Agilent/Varian, Santa Clara, CA, USA). Les différents échantillons en solution sont analysés dans des cuvettes en quartz et face à de l'eau nano pure. Les spectres UV-Vis sont traités grâce au logiciel Spectragryph 1.2.

Spectre FTIR-ATR

L'acquisition des spectres FTIR-ATR a été réalisée par un spectromètre FTIR Bruker tensor 27 équipé d'un module lecteur de plaque HTSXT, d'un détecteur de triglycine sulfate deutéré RT- DLaTGS et du logiciel OpusLab v 7.0.122 (Bruker Optics, Allemagne). Les

spectres infrarouges ont ensuite été enregistrés en mode transmission, à partir des extraits de marennine lyophilisés directement déposés sur l'objectif du spectromètre. La résolution spectrale a été fixée à 1 cm^{-1} , le nombre de balayages à 32. Les spectres d'absorbance ont tous été collectés entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} , et le diamètre d'ouverture du lecteur de microplaques a été fixée à 3 mm. Ainsi, le diamètre du faisceau IR était suffisant pour détecter tous les matériaux dans un diamètre de 3 mm. Les spectres de fond ont été collectés en utilisant les mêmes réglages de l'instrument que ceux utilisés pour les échantillons.

1.4 ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT.

Dans le chapitre 2, la densité cellulaire, la productivité volumétrique, spécifique et biovolumique de la marennine pendant la phase stationnaire de chaque culture ont été analysées par une ANOVA à un facteur pour déterminer les différences entre les souches de *H. ostrearia*. La normalité des distributions et l'homoscédasticité des variances ont été préalablement testées par un test de Shapiro-Wilk et de Levene. Lorsque des différences ont été détectées par l'ANOVA, des tests de comparaison multiple de Fisher LSD ont été utilisés pour déterminer quelles moyennes étaient significativement différentes. La significativité des différences a été définie à $p < 0,05$. Des analyses de régression linéaire ont été effectuées sur la productivité de l'EMn en fonction du biovolume cellulaire moyen. L'unité de réplication était la culture et le nombre de réplicas biologiques était de quatre pour chaque ANOVA et régression, à l'exception des mesures de pigments, pour lesquelles il était de 3, car aucune donnée n'était disponible pour la culture D (NCC529). Pour les activités antioxydantes, les courbes dose-réponse linéaires ont été comparées, par le biais d'une ANCOVA. Lorsque des différences ont été détectées, les pentes des régressions linéaires ont pu être deux à deux en utilisant le test de Student. La significativité des différences a été définie à $p < 0,05$. Pour les activités antibactériennes, les IC20 ont servi à estimer les différences entre les extraits de marennine. La normalité des distributions et l'homoscédasticité des variances ont été

préalablement testées par un test de Shapiro-Wilk et de Levene. Les différences ont été analysées par une ANOVA à un facteur.

Dans le chapitre 3, les productivités spécifique et volumétrique de la marennine, les concentrations spécifiques en pigments chloroplastiques et le rendement quantique effectif de du PSII au cours des 34 jours de culture ont été analysés à travers la moyenne de 5 jours consécutifs à l'aide d'une ANOVA à un facteur. La normalité des distributions et l'homoscédasticité des variances ont été testées au préalable par un test de Shapiro-Wilk et de Levene. Lorsque des différences ont été détectées, des tests de comparaison multiple LSD de Fisher ont été utilisés pour déterminer quelles moyennes étaient significativement différentes. La significativité des différences a été définie à $p < 0,05$. L'unité de réplication était le nombre de jours de chaque phase. Pour les activités antioxydantes, les courbes dose-réponse linéaires ont été comparées, par le biais d'une ANCOVA. Lorsque des différences ont été détectées, les pentes des régressions linéaires ont pu être deux à deux en utilisant le test de Student. La significativité des différences a été définie à $p < 0,05$. Pour les activités antibactériennes, les IC20 ont servi à estimer les différences entre les extraits de marennine. La normalité des distributions et l'homoscédasticité des variances ont été préalablement testées par un test de Shapiro-Wilk et de Levene. Les différences ont été analysées par une ANOVA à un facteur.

Dans le chapitre 4, pour les activités antioxydantes, les IC50 et les IC20 ont servi à estimer les différences entre les extraits de marennine. La normalité des distributions et l'homoscédasticité des variances ont été préalablement testées par un test de Shapiro-Wilk et de Levene. Les différences ont été analysées par une ANOVA à un facteur. Lorsque des différences ont été détectées, des tests de comparaison multiple de Fisher LSD ont été utilisés pour déterminer quelles moyennes étaient significativement différentes des autres. La significativité des différences a été définie à $p < 0,05$. Pour les activités antibactériennes, les IC50 et IC20 obtenus après le même temps d'incubation au cours du test d'activité antibactérienne ont été comparés à partir de leur valeur médiane en fonction de la nature de l'extrait ou de la souche de *V. splendidus* testée.

CHAPITRE 2

IMPACT DU CHANGEMENT DE SOUCHE DE *HASLEA OSTREARIA* SUR LA PRODUCTION DE MARENNINE EN PHOTOBIOREACTEUR A MEMBRANE IMMERGEE

Cette étude a été menée entre les laboratoires GEPEA (UMR CNRS 6144, Saint-Nazaire, France), ISMER-UQAR (Rimouski, QC, Canada) et le laboratoire de microbiologie du département microbiologie, infectiologie, immunologie de l'Université de Montréal (UdeM, Montréal, QC, Canada). Elle a été réalisée en deux parties. Les résultats concernant les cultures d'*H. ostrearia* et leurs productivités en eau bleue constituent la première, et font l'objet d'un article intitulé « *Hybrid photobioreactor operation for the intensified production of Haslea ostrearia and marennine in function of strain variability* », publié dans le journal *Algal Research* en septembre 2023. Au travers d'une deuxième partie, qui doit faire l'objet d'une communication brève, des analyses qualitatives des différentes eaux bleues ont été menées. Cet article et cette communication brève furent corédigés par moi-même et Réjean Tremblay, Jean-Sébastien Deschênes, Anthony Massé, et Olivier Gonçalves. Nesrine Gargouch, Jean-Luc Mouget, ont également participé à la rédaction de l'article, tandis que Marylise Duperthuy, Annabelle Mathieu-Denoncourt, et Céline Laroche, ont participé à la communication brève. En tant que première auteure, ma contribution à ces travaux fut l'essentiel de la recherche sur l'état de l'art, le développement de la méthode, l'exécution des expériences, les analyses en laboratoire et la rédaction de l'article. Réjean Tremblay, Jean-Sébastien Deschênes, Anthony Massé, et Olivier Gonçalves ont fourni l'idée originale. Ils ont aidé à l'élaboration et la problématique ainsi qu'au développement de la méthode. Nesrine Gargouch a contribué aux cultures de *H. ostrearia* et à participer de près à la réflexion sur les résultats associés tout comme Jean-Luc Mouget. Marylise Duperthuy et Annabelle Mathieu-Denoncourt ont contribué aux analyses microbiologiques et à l'étude de

leurs résultats. Céline Laroche a apporté son expertise concernant les analyses spectrales des polysaccharides. Tous les auteurs ont participé à la rédaction et à la révision des écrits.

Pedron, E., Gargouch, N., Mouget, J.-L., Tremblay, R., Deschênes, J.-S., Massé, A., Gonçalves, O., 2023. Hybrid photobioreactor operation for the intensified production of *Haslea ostrearia* and marennine in function of strain variability. *Algal Research* 75, 103285. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103285>

Pedron, E., Duperthuy, M., Mathieu-Denoncourt, A., Laroche, C., Gonçalves, O., Massé, A., Tremblay, R., Deschênes, J.-S. (en préparation pour soumission). Changes in blue pigment extract in a fed-batch culture of different *Haslea ostrearia* strains.

2.1 RESUME

La marennine est un composé d'intérêt produit par la diatomée benthique *Haslea ostrearia*, qui pourrait être utilisé comme alternative aux antibiotiques de synthèse en aquaculture. Si au cours des dernières années, ses faibles taux de production ont entravé son exploitation, les progrès récents sur les méthodes de culture d' *H. ostrearia* ont conduit à la conception de photobioréacteurs (PBR) adaptés à une production intensifiée de marennine, comme le photobioréacteur à membrane immergée (MPBR) proposé par Gargouch, *et al.* (2022). La stabilité des performances d'un système de culture face à la variabilité biologique inhérente d'une culture de diatomées n'a pas encore été étudiée pour *H. ostrearia*. Pourtant, une lignée cellulaire de diatomées est amenée à voir la taille des cellules de sa population diminuer à mesure de sa multiplication végétative, et le changement régulier de souche est pratique courante. Afin de promouvoir une stratégie de production de marennine, il est essentiel de s'assurer de la stabilité de ses performances en matière de productivité et de qualité des extraits obtenus. Ainsi, l'objectif principal de cette étude a été d'évaluer la fiabilité des performances face aux changements de souche d'une culture de *H. ostrearia* en MPBR. L'impact de la diminution de la taille des cellules dans le temps, comme observé par *H. ostrearia* tout au long de son cycle de vie, a été étudié au niveau de la productivité de la marennine, et considérant la variabilité inter- et intrasouche. En utilisant le MPBR de 1 L proposé par Gargouch *et al.* (2022), trois souches différentes de *H. ostrearia* ont été cultivées en mode fed-batch et la marennine a été collectée de manière semi-continue ($D = 0,1 \text{ j}^{-1}$) avec une membrane d'ultrafiltration immergée dans la culture. La biométrie des inocula a été mesurée, le développement de la biomasse et la production de marennine ont été suivis pendant 20 jours de culture. Les résultats ont confirmé l'avantage apporté par l'ajout d'une membrane à l'intérieur de la chambre de culture permettant de maintenir une productivité minimale de 2 mg d^{-1} de marennine, en utilisant seulement 3 L de milieu de culture frais sur une culture de 20 jours. Les résultats ont également montré que la réduction de la taille des cellules au cours du cycle de vie de *H. ostrearia* avait un impact sur la productivité de marennine des cellules, les cellules plus petites (c'est-à-dire les souches plus anciennes)

affichant une productivité de marennine biovolumique 4 à 15 fois supérieure en fonction de la souche. Enfin, les extraits de marennine obtenus à partir des eaux bleues produits par les 3 souches étudiées ont montré une stabilité des activités antibactériennes de la marennine. En revanche, l'efficacité antioxydante de ces mêmes extraits est variable d'une eau bleue à une autre, sans corrélation avec l'âge des souches cultivées. Les hypothèses expliquant cette augmentation de la production de marennine au cours du cycle de vie de *H. ostrearia* ainsi que les variabilités au niveau de la qualité des extraits obtenus sont discutées, en considérant notamment les changements dans le microbiome ou les variations épigénétiques pouvant être trouvées entre plusieurs souches d'une même espèce de diatomées.

2.2 HYBRID PHOTOBIOREACTOR OPERATION FOR THE INTENSIFIED PRODUCTION OF *HASLEA OSTREARIA* AND MARENNINE IN FUNCTION OF STRAIN VARIABILITY

Elodie Pedron^{1,2}, N. Gargouch¹, J-L Mouget³, R. Tremblay², J-S. Deschênes², A. Massé¹, O. Gonçalves^{1*}

¹GEPEA, CNRS UMR 6144, Nantes Université, Oniris, Saint-Nazaire, France

²Institut des sciences de la mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, Rimouski, Canada

³Mer-Molécules-Santé, MMS, FR CNRS 3473, IUML, Le Mans Université, Le Mans, France

***Corresponding author:** Olivier Gonçalves, olivier.goncalves@univ-nantes.fr

Keywords

Haslea ostrearia ; Blue pigment, Extracellular marennine; Submerged membrane; Hybrid process; Strain variability

Abbreviations

EMn: Extracellular marennine; MPBR: submerged-membrane photobioreactor.

Highlights

- Hybrid culture process as a reliable marennine production system regardless of *Haslea ostrearia* strain;
- Cell downsizing induces an increase in extracellular marennine production;
- Marennine shading strategy is used by *Haslea ostrearia* in a high intensity light environment to maintain homeostasis.

Abstract

Marennine is a high-value compound produced by the benthic diatom *Haslea ostrearia*, which could be used as an alternative to synthetic antibiotics in aquaculture. Over the last few years, however, low production rates have been impeding its exploitation. Recent progress on *H. ostrearia* culture devices led to the design of a particular photobioreactor (PBR) for high yield marennine production, which remained to be further studied: the objective of this study is thus to evaluate the advantages of using a submerged membrane photobioreactor (MPBR) for the culture of *H. ostrearia* by testing the reliability of its performances when changing strains. In addition, the impact of the decrease in cell size through time, as experienced by *H. ostrearia* along its life cycle, was studied in regard to marennine productivity, thus considering inter- and intra-strain variability. Using the 1 L MPBR proposed by Gargouch *et al.* 2022 three different strains of *H. ostrearia* were cultivated in a fed-batch mode and marennine was collected in a semicontinuous way ($D = 0,1 \text{ d}^{-1}$) with an ultrafiltration membrane immersed in the culture. Biometrics of the inocula were measured, and biomass development and marennine production were followed over 20 days of culture. Results confirmed the advantage brought by the addition of a membrane inside the culture chamber enabling to maintain a minimal productivity of 2 mg d^{-1} , using only 3 L of fresh culture medium over a 20-day culture. Results also showed that cell downsizing along *H. ostrearia* life cycle did impact marennine productivity per cell, with smaller cells (*i.e.* older strains), displaying a 4 to 15 times increase in biovolumetric marennine productivity depending on the strain. Hypotheses explaining this increase in marennine production along the life cycle of *H. ostrearia* are discussed, considering also changes in the microbiome or epigenetic variations along strain life cycle.

2.2.1 Introduction

Two centuries after the first investigations on the root cause of oyster greening (Gaillon, 1820), marennine, the blue pigment produced by the diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon) Simonsen, has been identified as the main source of this coloration, however, it still

presents several challenges to the research community. The mechanism and role of marennine externalisation in the water column by *H. ostrearia* are not yet completely understood, its structure is not entirely characterized, and ensuring a high productivity of this diatom remains a challenge. Yet, the last two decades have been encouraging with tremendous advances on the characterization of marennine bioactivities (Bergé *et al.*, 1999 ; Bouhlel *et al.*, 2021 ; Falaise *et al.*, 2019b ; Gastineau *et al.*, 2014 ; Méresse *et al.*, 2023 ; Pouvreau *et al.*, 2008a ; Prasetya *et al.*, 2016, 2021 ; Tardy-Laporte *et al.*, 2013), the complexity of its nature (Francezon *et al.*, 2021 ; Gastineau *et al.*, 2014 ; Zebiri *et al.*, 2023), and the diversity of *H. ostrearia* cultivation strategies to increase marennine production (Gargouch *et al.*, 2022 ; Lebeau *et al.*, 2000, 2002 ; Nghiem Xuan *et al.*, 2020 ; Prasetya *et al.*, 2022 ; Rossignol *et al.*, 2000a, 2000b ; Turpin *et al.*, 2001). New insights on its antibacterial activities against pathogenic strains of *Vibrio* rise interest for its use in aquaculture as an alternative to synthetic antibiotics (Falaise *et al.*, 2019b). Recently, Gargouch *et al.* (2022) updated the approach initially proposed by Rossignol *et al.* (2000b) regarding a submerged membrane photobioreactor (MPBR), a hybrid process combining a photobioreactor for the cultivation of *H. ostrearia* and an extraction device of extracellular marennine (EMn). Such a combination implemented a fed batch approach for *H. ostrearia* culture, allowing the marennine to reach unprecedented concentration in an Airlift process ($36.00 \pm 0.02 \text{ mg L}^{-1}$ as compared to 8.2 to 20 mg L^{-1} under the same conditions (Adjout *et al.*, 2022 ; Nghiem Xuan *et al.*, 2021), and the continuous recovery of EMn with increased specific productivity. Modulation of the dilution rate of the culture without harvesting biomass allowed the upregulation of cell primary metabolism by improving access to light and nutrients. Although this hybrid strategy seems promising, further studies are needed to support its reliability and promote its utilisation in aquaculture. One of the main challenges inherent to *H. ostrearia* study and exploitation is the periodic need of strain renewal. As for most pennate diatoms, cells are enclosed in a rigid silicate cell wall called frustule that reduces in size after each mitosis, following the Macdonald-Pfitzer rule (Chepurnov *et al.*, 2004 ; Hense et Beckmann, 2015), until a critical size threshold, which leads to clonal culture extinction (Chepurnov *et al.*, 2004 ; Davidovich *et al.*, 2009). At this stage, introducing a

new *H. ostrearia* strain to pursue EMn production might have unexpected repercussions on the MPBR productivity. To the best of our knowledge, very few studies on *H. ostrearia* considered this potential bias. Geider *et al.* (1986) established a relation between cell size and the metabolic rate of diatoms, explaining interspecies variability, and Sharpe *et al.* (2012) showed similar conclusions at the intraspecies level for the centric diatom *Ditylum brightwellii*, in relation with cell biovolume and DNA content. Regarding *H. ostrearia* and marennine production, although this non-photosynthetic pigment is linked to the central carbon metabolism and light growth (Gastineau *et al.*, 2014), no clear relation was ever observed. While Joux Arab *et al.* (2000) focused on how cell size significantly impacted cell detoxification metabolism, Mouget *et al.* (Mouget *et al.*, 2005) showed notable differences in the accumulation of marennine between different *H. ostrearia* strains with varying cell sizes. This work showed no linear relation but rather a shift in the amount of marennine accumulated by the cells, with lower content in cells shorter than 50 μm as compared to longer cells. Moreover, apparent cell size could also be linked to other genetic variability between different strains, arising from natural genetic drift (Ruggiero *et al.*, 2022). Yet, no study followed the evolution of the growth rate or the EMn productivities of a single *H. ostrearia* strains with cell downsizing. Prasetya *et al.* (2022) showed that species or strains of blue *Haslea* differed in marennine and marennine-like pigment productivity, but only for strains collected in Mexico showing lower productivity at 19°C compared to other strains collected in Europe and the USA.

Following the sensitivity study realized during (Gargouch *et al.*, 2022) one *H. ostrearia* strain cultivated in the MPBR, the robustness of the MPBR to strain changes remained to be tested to confirm its efficiency for marennine production. The aim of this study was thus to grow *H. ostrearia* using the hybrid MPBR and compare biomass production and EMn productivity, for different strains of the same species. To estimate possible changes in biomass production and EMn productivity with time during the diatom life cycle, a comparison of biomass production and EMn productivity was made for the same strain at different ages and cell sizes.

2.2.2 Material and methods

Microalgae and culture maintenance

The different strains of *H. ostrearia* used during this study were provided by the Nantes Culture Collection (NCC, Nantes University, France). *Haslea ostrearia* NCC 529 was isolated from Bourgneuf Bay (Loire-Atlantique, France), as was *H. ostrearia* NCC531. *Haslea ostrearia* NCC553 resulted from an auxosporulation between *H. ostrearia* NCC527 and *H. ostrearia* NCC532, both isolated from Bourgneuf Bay (Loire-Atlantique, France).

A modified Provasoli medium was used for strain maintenance, based on natural seawater filtered using a 0.2µm cut-off capsule (Sartobran® P). After adjusting the pH to 7.8 and salinity natural seawater to 28 ppt, the seawater was autoclaved and enriched according to Provasoli ES 1/3 (Provasoli *et al.*, 1957), then sterilised using a 0.2 µm cut-off filtration unit (Sartolab™ P20 Plus). The strains were maintained in 500 mL Erlenmeyers filled with 250 mL of culture, placed at 16°C, and illuminated by white LEDs at 100 µmol photons m⁻² sec⁻¹, following a 14/10h light/dark cycle, with subculturing every two weeks. At least one month before scale-up to MPBR, cultures were switched to an active subculturing mode and maintained in the exponential growth phase with subculturing every 4 days, at 18°C, and illuminated by white LEDs at 200 µmol photons m⁻² s⁻¹, following a 14/10h light/dark cycle. NCC 529 was maintained in active subculturing mode for one year without interruption, the other strains (NCC553, NCC531) were put under these conditions one month before the beginning of the cultures in MPBR.

Photobioreactor system

The submerged membrane photobioreactor (MPBR) proposed by Gargouch *et al.* (2022) was used in this study. It was composed of two main elements: a 1L Airlift type culture chamber and a submerged membrane. Culture chamber temperature was maintained at 18°C using the air conditioning of the room. Light was provided by a white LED panel, placed in front of the MPBR, at a distance allowing an irradiance of 200 µmol photons m⁻²

s⁻¹. pH was fixed at 7.8 and adjusted through CO₂ injection in the culture chamber. Setpoints were maintained using the LabView interface. The membrane was composed of 40 hollow PVDF (Polyvinylidene Fluoride) fibers (VMA Industries, France), one end of which was closed. The pore diameter was 0.05 μm with a total surface area of 0.0373 m² (Gargouch *et al.*, 2022). This membrane, connected to a peristaltic or piston pump, depending on the set-up, allowed a selected volume of culture medium containing EMn to be harvested by filtration, but also to be supplied with a new culture medium during backwashing. The dilution rate implemented at the different cultures was calculated as follows:

$$D \text{ (d}^{-1}\text{)} = \frac{Q}{V_r} \quad (1)$$

with Q the suction rate (mL d⁻¹), and V_r the total volume of the culture in the reactor (mL).

Residence time of the biomass tended towards infinity since it was entirely retained in the reactor by the membranes (excepted for sampling), and medium was added in fed-batch. The culture volume was maintained constant as semi-continuous filtration of the culture was done daily. Final dilution rate was $D = 0.1 \text{ d}^{-1}$. Culture medium was based on the Provasoli ES 1/3 recipe, although for MPBR cultures, medium was further enriched in nitrate, with a final concentration $[\text{NaNO}_3] = 0.15 \text{ g L}^{-1}$, and bicarbonate and silica solutions were directly added in the culture chamber every day to reach $[\text{NaHCO}_3] = 0.42 \text{ g L}^{-1}$, $[\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}] = 0.03 \text{ g L}^{-1}$, following the fed-batch strategy proposed by Nghiem-Xuan (2019) to avoid salt precipitation

Analytical methods

Each sample of the culture was taken after a complete daily homogenization of the culture with a magnet bar placed in the reactor.

Growth, cell size and EMn concentration measurements

The cell density (cell L⁻¹) of the culture was determined by Nageotte cell count (Marienfeld, AQRA, India) and calculated as follows:

$$N(\text{cell L}^{-1}) = \frac{n}{V} \quad (2)$$

with n the number of cells, V the volume corresponding to the number of lines used for counting, knowing that one strip corresponds to a volume of 1.25 µL. All counts were performed in triplicate of 300 +/- 50 cells, at 3 random locations in the counting chamber.

Gompertz model using XLSTAT was used to fit cell density daily data to obtain growth parameters of each culture.

$$Y = A * e^{(-e^{(-K*(X-X_c))})} \quad (3)$$

with Y, cell density ($\ln\left(\frac{\text{biomass}}{\text{Initial biomass}}\right)(10^6 \text{ cell L}^{-1})$), A, maximal cell concentration ($\ln\left(\frac{\text{biomass}}{\text{Initial biomass}}\right)(10^6 \text{ cell L}^{-1})$), K maximal growth rate μ_{\max} (d⁻¹), X_c, center of the exponential phase (d), considering [initial biomass] = 100.10⁶ cell L⁻¹.

Following Cointet (2019) approach, the A parameter is used for calculation of the late exponential day (LED, d), to locate the end of the exponential phase.

$$LED(d) = e^{(A+\ln(B_{\min}))} \quad (4)$$

with B_{min} the theoretical initial inoculum, 1.10⁶ cell L⁻¹.

Extracellular marennine (EMn) concentration present in culture supernatant was estimated using the spectrophotometric method proposed by Pouvreau (2006a). Supernatant of culture sample was recovered and its absorbance at 669 nm was measured using JASCO V-630 spectrophotometer, and the concentration of EMn determined according to the Beer-Lambert formula:

$$[EMn](mg L^{-1}) = \frac{A_{669}}{\varepsilon * l} * M \quad (5)$$

with A the absorbance measurement at 669 nm, ε the molar extinction coefficient of EMn determined by Pouvreau (2006) ($\varepsilon = 12 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$), l the length of the optical path in the cell (cm), EMn molar mass as provided by Pouvreau (2006) ($M = 9893 \text{ Da}$). Each absorbance measurement was performed in triplicate.

Volumetric (P_v) and specific (P_s) EMn productivity were calculated according to the formulas proposed by Gargouch *et al.* (2022) :

$$P_v (mg_{EMn} L^{-1} d^{-1}) = [EMn] * D \quad (6)$$

$$P_s (mg_{EMn} cell^{-1} d^{-1}) = \frac{P_v}{N} \quad (7)$$

with [EMn] the EMn concentration measured during the stationary growth phase of the culture ($mg L^{-1}$), D the dilution rate applied to the culture (d^{-1}), N average cell concentration in the culture in the stationary phase ($cell L^{-1}$)

Cell individual biovolume was estimated at the beginning and at the end of each culture, following Hillebrand *et al.* (1999) calculation. A prism with an elliptic base was chosen to standardize *H. ostrearia* cell shape, and the width of the cell from the griddle view and the valvar view were considered equivalent. When cells presented a frustule deformation (NCC531) the maximum width was taken. The biovolume formula resulting from this standardization was:

$$Bv (\mu m^3) = \frac{\pi}{4} * a * b^2 \quad (8)$$

with a the length of the cell (μm) and b the width of the cell (μm) from a valvar view.

EMn productivity was standardised according to the biovolume estimation of cells in the culture ($[Bv], \mu m^3 L^{-1}$) during stationary phase, thus considering cell size variability

between different cultures of *Haslea*. EMn biovolumetric productivity (P_b) of the different cultures was calculated according to the formula:

$$P_b (mg_{EMn} \mu m^{-3} d^{-1}) = \frac{P_v}{Bv} \quad (9)$$

Pigment analysis

Pigment analysis of cultivated cells was performed according to Ritchie's protocol (Ritchie, 2008). Briefly, 1.5 mL aliquots of culture were centrifuged at 12,000 g for 15 minutes. The resulting pellets were resuspended in 1.5 mL of a 90% acetone solution and homogenized using sonication. Extraction occurred in the dark for 3 h at 4°C, after which another 15 minutes centrifugation at 2400 g was done. The obtained supernatants were analysed by visible spectrophotometry (JASCO V-630 spectrophotometer). According to Caspers (1970) and Ritchie (2008), the absorbances at 480 nm, 630 nm, 645 nm, 665 nm, 750 nm were measured, and the concentrations of the pigments of interest were calculated according to the following formulas:

$$[Chl_a](\mu g. mL^{-1}) = (-0,3002 * (A_{630} - A_{750}) - 1,7538 * (A_{645} - A_{750}) + 11,9092 * (A_{665} - A_{750})) * \frac{V_{acetone}}{V_{sample}} * l \quad (10)$$

$$[Chl_c](\mu g. mL^{-1}) = (23,6723 * (A_{630} - A_{750}) - 7,9057 * (A_{645} - A_{750}) - 1,5467 * (A_{665} - A_{750})) * \frac{V_{acetone}}{V_{sample}} * l \quad (11)$$

$$[CarT](\mu g. mL^{-1}) = (4 * (A_{480} - A_{750})) * \frac{V_{acetone}}{V_{sample}} * l \quad (12)$$

$$P^T_{spe}(\mu g 10^6 cell^{-1}) = \frac{[Chl_a + Chl_b + Chl_c]}{N} * 10^3 \quad (13)$$

with A_λ : sample absorbance at the given wavelength (λ), $V_{acetone}$: volume of acetone used for pigment extraction (mL), V_{sample} : volume of initial sample (mL), l = length of the optical path (cm), Chl_a , Chl_c and $CarT$ respectively chlorophyll *a*, chlorophyll *c* and total carotenoids, and

P^T_{spe} the total specific pigment content. P^T_{spe} is presented in the Results section and a detailed composition is provided in the Supporting Information.

Statistical analysis

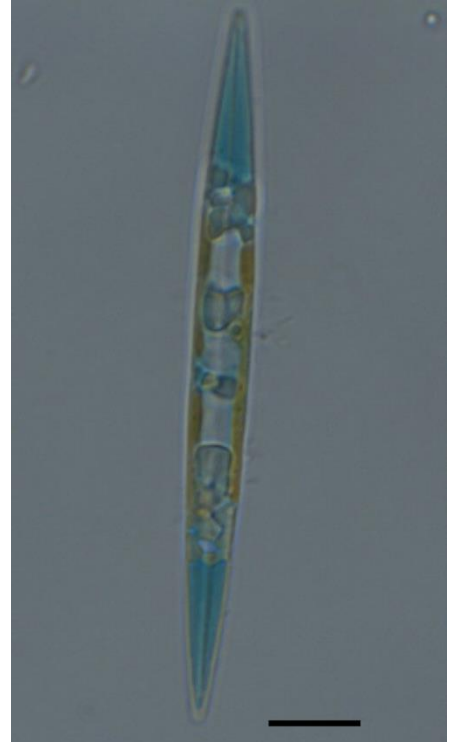
Statistical analysis was performed using XLSTAT software. The normality of the distributions and the homoscedasticity of the variances were tested beforehand by a Shapiro-Wilk and Levene test. Cell density, volumetric, specific and biovolumetric EMn productivity during the stationary phase of each culture were analysed with a one-way ANOVA to determine differences between strains or cell size. When differences were detected, Fisher LSD multiple comparison tests were used to determine which means were significantly different. Significance of differences was defined at $p < 0.05$. Linear regression analyses were performed on EMn productivity in relation to the mean cell biovolume. The unit of replication was the MPBR in which strains were cultured and the number of biological replicates was 4 for each ANOVA and regression, to the exception of pigment measurements, for which it was 3, as no data were available for culture D (NCC529). All ANOVA and linear regression parameters are presented in annex 1.

2.2.3 Results

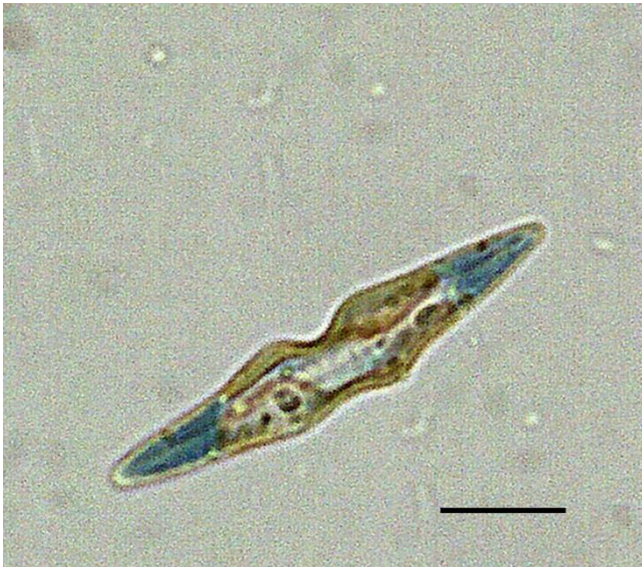
Biometric profiles of *H. ostrearia* strains cultivated in MPBR



Haslea ostrearia NCC553 (culture A)



Haslea ostrearia NCC553' (culture B)



Haslea ostrearia NCC531 (culture C)



Haslea ostrearia NCC529
(8 months before culture D)

Figure 2.1: Microscopic pictures of the four inocula of *H. ostrearia* strains used for culture A to D. Cells sampled at the beginning of each culture and observed using light microscopy or detailed otherwise. Scale bar corresponds to 10 μm .

Table 2.1 : Biometric profiles of *H. ostrearia* strains cultivated in MPBR. Strains are defined by cell length (μm), cellular biovolume B_V (μm^3), total pigment specific content $P^T_{\text{spe initial}}$ ($\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$), when cultivated in MPBR ($D=0.1 \text{ d}^{-1}$, ES 1/3+Si). The results are expressed as the mean \pm standard deviation of $n \geq 3$ values measured at the beginning of the culture. Different letters indicate significant group difference (ANOVA, LSD ; $p < 0.05$, $R^2_{\text{cell length}} = 0.99$, $R^2_{B_V} = 0.92$, $R^2_{P^T} = 0.91$, Annex 1, Table S 1). (*) marks the value for which only a prevision was available

| Parameters | NCC553 | | NCC531 | NCC529 |
|---|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------|
| Culture | A | B | C | D |
| Cell length (μm) | $106 \pm 0,2 \text{ a}$ | $85 \pm 3 \text{ b}$ | $40 \pm 0,7 \text{ c}$ | 39* |
| B_V (μm^3) | $6483 \pm 1805 \text{ a}$ | $4976 \pm 1590 \text{ b}$ | $2321 \pm 259 \text{ c}$ | 1103* |
| $P^T_{\text{spe initial}}$ (ng cell^{-1}) | $23 \pm 5 \text{ a}$ | $8.2 \pm 0.4 \text{ b}$ | $4.0 \pm 0.1 \text{ c}$ | N/A |

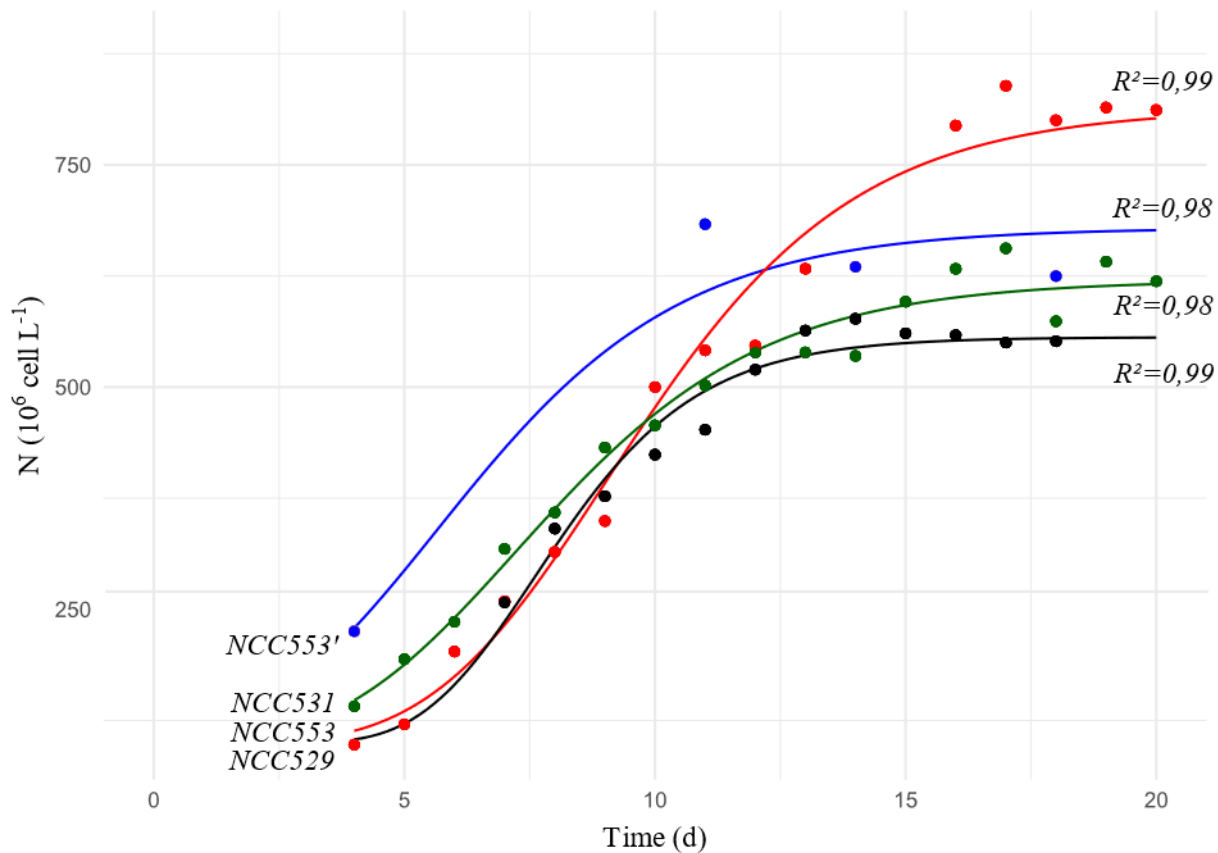


Figure 2.2: Growth curve measured for *H. ostrearia* using Gompertz model to fit cell concentration (Biomass, 10^6 cell L^{-1} , with initial biomass = $100 \text{ } 10^6 \text{ cell L}^{-1}$), estimated by cell count ($n=3$), as a function of time. Model done for each of the four cultures in MPBR. Values of R^2 of each model are indicated on the graph.

Three cultures (A to C) were carried out using two different *H. ostrearia* strains. Cell size, biovolume and chloroplast pigment composition were measured for each culture during stationary phase and results are presented in Table 2.1. Aspect of the different inocula is illustrated by Figure 2.1. Culture A corresponds to the first culture of *H. ostrearia* NCC553. A second culture of NCC553 was started one year after to study the changes in performance with time due to life cycle evolution and cell size reduction. Culture C corresponds to *H. ostrearia* NCC531, and culture D corresponds to *H. ostrearia* NCC529, cultivated by Gargouch *et al.* (2022) under the same conditions. Pictures of the cells at the beginning of culture D are not available, but for the purpose of this study an approximation of the mean cell size was obtained knowing the cell size of the inoculum 8 months before culture D, and using the downsizing rate observed by Joux-Arab *et al.* (2000).

The difference in mean cell size observed between the two cultures of NCC553 (A and B) reflects the downsizing of cell length throughout diatom vegetative life cycle. In 12 months, the mean cell length of NCC553 changed from $106 \pm 1 \mu\text{m}$ (culture A) to $85 \pm 2 \mu\text{m}$ (culture B), inducing a significant decrease of cellular biovolume. Despite cell downsizing, both initial inocula did not display frustule deformation and parietal chloroplasts appeared clearly separated by vacuoles. NCC531 inoculum (culture C) presented cells significantly shorter than both NCC553 inocula with a mean cell length of $40 \pm 1 \mu\text{m}$ and a biovolume of $2321 \pm 259 \mu\text{m}^3$. These cells presented frustule deformations (Figure 2.1), which can be associated with natural cell degeneration due to repeated vegetative replication. Initial inoculum presented cells of which parietal chloroplasts occupied most of the cell volume, and vacuoles appeared almost inexistent.

The total specific pigment content (P_{spe}^T) at the start of the culture appears to be positively correlated ($R^2=0.69$, Annex 1, Table S 2, Figure S. 1) with the cell size, with the longest cells (*i.e.*, NCC553 in culture A) showing a significantly higher specific pigment content. In contrast for culture C cells, a significantly lower specific pigment content was observed. Unfortunately, no data regarding the pigment content of cells in culture D were available.

Biomass growth and EMn production of *H. ostrearia* strains cultivated in

MPBR

Table 2.2 presents culture parameters during the three experiments (A to C), compared to data obtained by Gargouch *et al.* (2022) (culture D) using another strain and the same

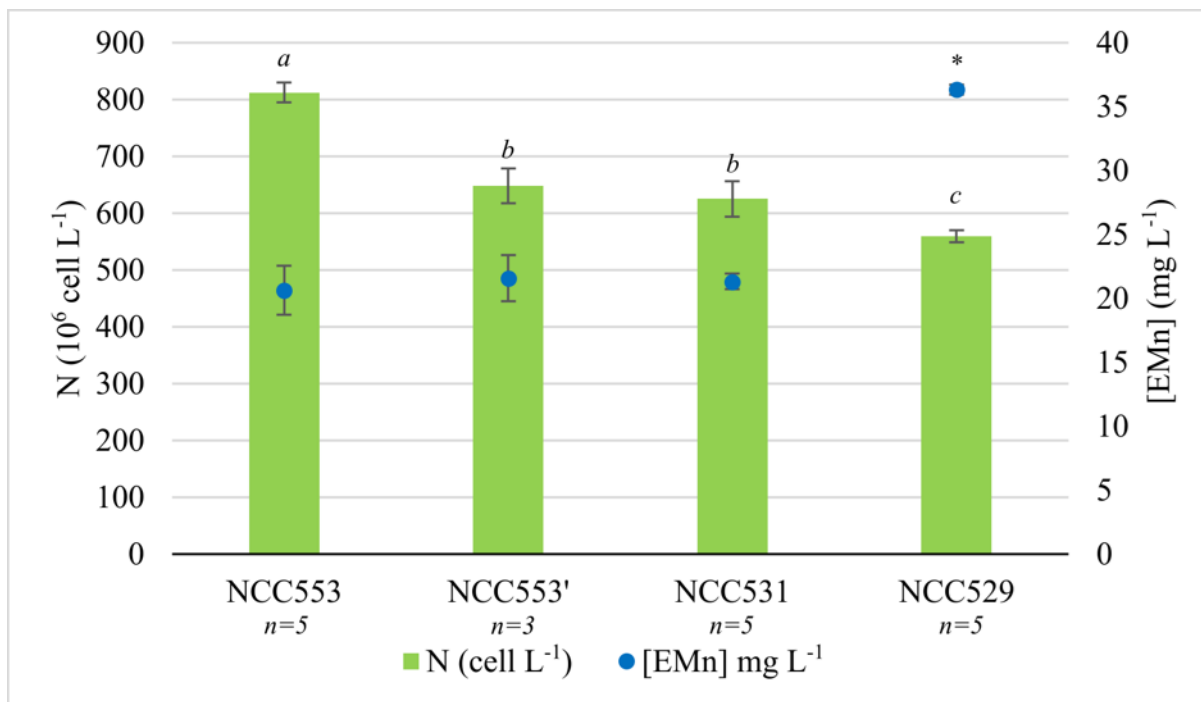


Figure 2.3: Cell density (N , 10^6 cell L^{-1}) reached during the stationary phase and mean EMn concentration ($mg L^{-1}$) measured in the culture medium in four different cultures in MPBR ($d=0,1 d^{-1}$, ES 1/3+Si) using three strains of *H. ostrearia* (NCC553, NCC531, NCC529). Results are expressed as the mean \pm standard deviation of $n \geq 3$ values measured during stationary phases of culture. Different letters indicate significant group difference (ANOVA, LSD; $p < 0.05$, $R^2_N=0,96$, $R^2_{[EMn]} = 0.97$, Annex 1, Table S 1)

protocol. Gompertz model initially designed for batch culture turned out suitable to visualize biomass growth in this steady volume fed-batch culture ($R^2 \geq 0,98$).

NCC 553 and NCC 531 displayed an equivalent μ_{max} when cultivated in MPBR, whereas NCC 529 reached a maximal growth rate of $0,57 \pm 0,04 d^{-1}$, 60% higher than the two other strains (Figure 2.2, Table 2.2). However, regarding maximal mean cell density observed during the stationary phase, NCC529 reached $559 \pm 11 10^6$ cell L^{-1} , the lowest

maximal biomass concentration observed in this MPBR. NCC531 reached a significantly higher density with $625 \pm 31 \cdot 10^6 \text{ cell L}^{-1}$, and NCC553' (B) displayed equivalent biomass concentration, with $645 \pm 31 \cdot 10^6 \text{ cell L}^{-1}$. Culture A of NCC553 showed the highest cell concentration during the stationary phase, with $812 \pm 17 \cdot 10^6 \text{ cell L}^{-1}$ (Figure 2.3). For all cultures this phase was reached before the 20th day of culture, as shown with Gompertz model, the late exponential phase (LED, d) arriving sooner for culture displaying a lower biomass accumulation. Thus NCC553 (A) reached late exponential phase around day 8 whereas NCC529 reached it more than two days before (Figure 2.2, Table 2.2).

Table 2.2: Calculated parameters of four cultures of *H. ostrearia* using three different strains (NCC553, NCC531, NCC529) in MPBR ($d=0.01 \text{ d}^{-1}$, ES 1/3+Si). Maximal growth rate (μ_{max} , d^{-1}), and late exponential day (LED, d) retrieved from the Gompertz model, biovolume of cells reached during the stationary phase ($10^{12} \mu\text{m}^3 \text{ L}^{-1}$), total pigment specific content $P_{\text{spe}}^{\text{T}}$ ($\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$), EMn volumetric productivity (P_{v} , $\text{mg}_{\text{EMn}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), EMn specific productivity (P_{s} , $\text{mg}_{\text{EMn}} 10^9 \text{ cell}^{-1} \text{ d}^{-1}$) and EMn biovolumetric productivity P_{b} ($\text{fg}_{\text{EMn}} \mu\text{m}^{-3} \text{ d}^{-1}$). The results are expressed as the mean \pm standard deviation of $n \geq 3$ values measured during the stationary phase of culture. Different letters indicate significant group difference (ANOVA, LSD; $p < 0.05$, $R^2_{[\text{Bv}]} = 0.99$, $R^2_{\text{Pt}} = 0.97$, $R^2_{\text{Pv}} = 0.97$, $R^2_{\text{Ps}} = 0.98$, $R^2_{\text{Pb}} = 0.99$, Annex 1, Table S 1)

| Parameters | NCC 553 (A) | NCC 553' (B) | NCC 531 (C) | NCC 529 (D) | p-value |
|--|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------|
| $\mu_{\text{max}} (\text{d}^{-1})$ | $0.38 \pm 0.04 \text{ a}$ | | $0.37 \pm 0.02 \text{ a}$ | $0.57 \pm 0.04 \text{ b}$ | 0.026 |
| LED (d) | $8.1 \pm 0.5 \text{ a}$ | $6.8 \pm 0.5 \text{ b}$ | $6.2 \pm 0.2 \text{ b}$ | $5.6 \pm 0.2 \text{ c}$ | 0.005 |
| [Bv] ($10^{12} \mu\text{m}^3 \text{ L}^{-1}$) | $5.3 \pm 0.1 \text{ a}$ | $3.2 \pm 0.2 \text{ b}$ | $1.4 \pm 0.1 \text{ c}$ | $0.62 \pm 0.01 \text{ d}$ | <0.0001 |
| $P_{\text{spe}}^{\text{T}} (\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1})$ | $12 \pm 1 \text{ a}$ | $5.5 \pm 1.2 \text{ b}$ | $3.0 \pm 0.1 \text{ c}$ | N/A | <0.0001 |
| P_{v} ($\text{mg}_{\text{EMn}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) | $2.1 \pm 0.2 \text{ a}$ | $2.2 \pm 0.2 \text{ a}$ | $2.1 \pm 0.1 \text{ a}$ | $3.6 \pm 0.03 \text{ b}$ | <0.0001 |
| P_{s} ($\text{mg}_{\text{EMn}} \cdot 10^9 \text{ cell}^{-1} \text{ d}^{-1}$) | $2.5 \pm 0.2 \text{ a}$ | $3.3 \pm 0.4 \text{ b}$ | $3.4 \pm 0.2 \text{ b}$ | $6.5 \pm 0.1 \text{ c}$ | <0.0001 |
| P_{b} ($\text{fg}_{\text{EMn}} \mu\text{m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) | $0.39 \pm 0.04 \text{ a}$ | $0.67 \pm 0.08 \text{ b}$ | $1.5 \pm 0.1 \text{ c}$ | $5.9 \pm 0.1 \text{ d}$ | <0.0001 |

The total pigment content of cells was significantly different from one culture to another (for detailed pigment composition refer to Annex 2, Table S 5). A positive correlation between cell size and specific pigment content was observed ($R^2=0.70$, Annex 1, Table S 3, Figure S. 2), yet compared to the initial inocula, all three cultures A, B, C displayed a drastic

decrease in P_{spe}^T (Table 2.1, Table 2.2). Regarding pigment composition no data were available for culture D.

Over a 20-day culture, all the four cultures of *H. ostrearia* produced marennine that accumulated in the culture medium, reaching concentrations up to $21 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$ for both NCC 553 (A and B), and $21.3 \pm 0.6 \text{ mg L}^{-1}$ for NCC531. The strain NCC529 showed a significantly higher accumulation of EMn in the culture medium, $36.3 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$ (Figure 2.3). This resulted directly from strains differences in EMn productivity. For instance, the strain NCC553 did not display an equivalent productivity in culture A and culture B, the latter being one year older and 20% smaller. Furthermore, P_s was significantly higher in culture B, reaching $3.3 \pm 0.4 \text{ mg}_{EMn} 10^9 \text{ cell}^{-1} \text{ d}^{-1}$, equivalent to NCC 531. Regarding NCC529, it displayed a P_s twice higher, $6.5 \pm 0.1 \text{ mg}_{EMn} 10^9 \text{ cell}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Table 2.2).

When using estimated cell biometrics to express the EMn productivity of each culture related to the mean cell biovolume of the biomass, the pattern is amplified. EMn biovolumetric productivity (P_b) of *H. ostrearia* was significantly different from one culture to another, the same being true when comparing a same strain cultivated at two different stages of its life cycle. The increase in P_b in culture B compared to culture A could be associated to the decrease in cell length between the two inocula of the same strain, inducing a decrease in the cell biovolume. Indeed, a linear correlation was observed between cell biovolume and P_b when all the four cultures and three strains were considered, reaching a negative correlation of 82 % ($R^2 = 0,66$, Annex 1, Table S 4, Figure S. 3). *A posteriori* estimation of the NCC529 cell biovolume confirmed its high performance, with a 4 to 15 times higher production per unit of cell.

2.2.4 Discussion

This study aimed at increasing our knowledge of *H. ostrearia* performances when cultured in a hybrid device (MPBR), an airlift photobioreactor equipped with a submerged membrane to collect EMn, with emphasis on possible variations due to strain diversity. Indeed, a device allowing dense cultures of *H. ostrearia* is yet to be developed, and ensuring

a reliable high productivity of marennine production is still a challenge. The promising performances observed by Gargouch *et al.* (2022) who cultivated *H. ostrearia* in a hybrid process, the MPBR, were encouraging, yet a validation of the repeatability of these performances was needed, using different *H. ostrearia* strains. As for all pennate diatoms, the mean cell size of a clonal culture of *H. ostrearia* decreases with time, which implies to regularly renew the inoculum with bigger strains of *H. ostrearia*. Thus, the impact of cell downsizing on MPBR productivity should be assessed to forestall eventual production fluctuations.

Three different strains of *H. ostrearia* were successfully cultivated in the hybrid MPBR on four separate experiments. Compared to performances observed in an equivalent semi-continuous system (Gargouch *et al.*, 2022), higher cellular density and EMn productivity were reached in each of the four cultures, confirming the advantage brought by the membrane, as previously observed (Gargouch *et al.*, 2022). Separation of biomass and EMn residence times due to the addition of a membrane is advantageous in the case of *H. ostrearia* (Gargouch *et al.*, 2022 ; Rossignol *et al.*, 2000b). It enables tuning the harvest of EMn, which production rate appears to be higher than biomass growth. Such separated management between biomass and EMn is even easier with the membrane directly immersed in the culture medium, which represents an intrinsic advantage of the MPBR system. This prevents the mechanical shear stress caused by eventual pumping or circulation (Rossignol *et al.*, 2000a) and enables them to keep a maximum of biomass inside the culture chamber while harvesting EMn, to circumvent one of the limits of the Airlift plan-PBR working in semi-continuous mode (Nghiem Xuan *et al.*, 2021). The shear stress caused by the airlift homogenisation system of the plan-PBR (Pruvost *et al.*, 2009) was previously reported to be supported by *H. ostrearia* (Nghiem Xuan *et al.*, 2021 ; Rossignol *et al.*, 2000b). Furthermore, the high biomass concentration reached when *H. ostrearia* was cultured in the MPBR was similar to those obtained using equivalent Airlift plan-PBR (Gargouch *et al.*, 2022 ; Nghiem Xuan *et al.*, 2021), thus confirming the advantage of such homogenisation approach. Indeed, gently maintaining cells in suspension seems to favour access to nutrients and light and prevents fluctuation of pH and saturation of O₂ of the culture medium. Although Nghiem Xuan (2019)

results confirmed the main disadvantage of homogenisation of *H. ostrearia* cultivation relied on limiting successful mitosis, observed sedimentation on the membrane after the daily filtration (Annex 2, Figure S. 4) let us hypothesize that the heterogeneity of the culture created by such a conformation could be beneficial, allowing both cell suspension and low shear stress zone, combining resource access and cell multiplication in one place.

This study confirmed the advantages of the MPBR, to reach high marennine productivity over one month culture and to limit water requirement for the culture by increasing cell density. Compared to the recent semi-continuous culture system that favoured the benthic behaviour of *H. ostrearia* (Prasetiya *et al.*, 2022), MPBR marennine production turned out to be a better system to use water more efficiently. Indeed, it took half the time (20 d of culture compared to 40 d), and ten times less culture medium (3 L compared to *ca.* 30 L used by the semi-continuous system) to produce at least the same amount of EMn, regardless of the strain of *Haslea*. It is important to note that the MPBR used a richer medium, in consequence of the constant homogenisation, pH regulation and daily supply of fresh medium and addition of nutrients. The resulting optimized access to nutrients could explain differences in EMn specific productivity between the two systems.

Although cultivated in the same conditions and using the same culture MPBR, differences between strains were observed regarding biomass production and EMn productivity, but also between two cultures of the same strain at a different stage. Identifying the causes of such variability could help prevent changes in MPBR performances. Cell size has been shown to affect the growth parameters of diatoms (Geider *et al.*, 1986 ; Sharpe *et al.*, 2012 ; Williams, 1964). For instance, Geider *et al.* (1986) observed a positive correlation between cell size and growth rate in different diatom species and concluded that smaller cells were favoured compared to larger cells, being able to assimilate dissolved nutrients faster but also having a lower sinking rate, enabling them a better access to nutrients and light. These results were in line with a previous work by Williams (1964) on salt marsh diatoms. On the other hand, working on cryptic species of *Ditylum brightwellii* with different cell size, Sharpe *et al.* (2012) did not notice any significant difference in growth rates between strains.

Regarding the species *H. ostrearia*, Joux-Arab *et al.* (2000) grew strains differing by their size and observed that the smaller the mean cell size, the higher the cell density, and Gaudin *et al.* (2006) confirmed that smaller cells displayed higher growth rates, although the relation was not linear. In contrast to these previous works conducted using batch or semi-continuous culture modes, the present study used a fed-batch mode, and no differences regarding the growth rate arose despite cell size variation between strains, to the possible exception of NCC529. Furthermore, larger cells did produce higher biomass and cell density when comparing two populations of the same strain NCC553.

These possible effects of strain size are in line with observation by Prasetya *et al.* (2022) on production of different *Haslea* species in a flat semi-continuous system. Sharpe *et al.* (2012) suggested that smaller cells could maintain their metabolic rate due to a greater functional absorption cross section, despite shorter chloroplasts. Nevertheless, if the fed-batch culture mode makes light the limiting growth factor, the addition of nutrients remains a forcing factor for maximal cell production, inducing a fluctuation of nutrient levels in the culture (Pruvost *et al.*, 2009). Turpin and Harrison (1980) suggested that larger cells were favoured in such condition, presenting a lower photorespiration rate and avoiding their growth to be slowed down by respiratory stress compared to smaller cells before daily nutrient supplementation. Thus, for a same light intensity, large cells might be able to assimilate more energy and optimize the available nutrient resources, eventually resulting in a higher cell concentration.

Previous studies focussed on the potential impact of cell size of a clonal culture on EMn productivity (Gaudin *et al.*, 2006 ; Mouget *et al.*, 1999, 2005), but no clear relationship was observed. For these studies, no comparison using the same strain was performed, thus genetic variability might have obscured the impact of cell biovolume on marennine productivity. For this reason, the two cultures of the same strain NCC553, differing by their mean cell size, were compared. Surprisingly, smaller cells NCC 553' (B) were less numerous in culture but they maintained the same EMn volumetric productivity P_v , as NCC 553 (A). This supports the hypothesis of light environment being the major driving force of marennine

production (Prasetiya *et al.*, 2016). Moreover, exopolysaccharide synthesis and excretion have been associated with excessive energy and excess carbon dissipation by microorganisms (Hessen et Anderson, 2008), usually in response to light in excess for microalgae (Antunes *et al.*, 2019 ; Roeselers *et al.*, 2007). As marennine is possibly a heteropolysaccharide (Gastineau *et al.*, 2014 ; Pouvreau, 2006 ; Zebiri *et al.*, 2023) with a self-shading role for *H. ostrearia* (Pouvreau *et al.*, 2007 ; Schubert *et al.*, 1995) and that it has already been associated with a response to high irradiance (Prasetiya *et al.*, 2016 ; Rech, 2004, 2008), it can be hypothesized that smaller cells would increase EPS externalization, thus marennine excretion, as a multilevel strategy to respond to excess light, counteracting the excess energy while setting a shading environment. This explanation is supported by Gargouch *et al.* (2022), who observed an increase in EMn externalization in response to an increase in blue water dilution rate in the MPBR. In the present work, specific productivity of EMn appears more to fluctuate according to the shading needed than to cell size, marennine externalization acting as a compensation system. This is a point in favour of the semi-continuous production of marennine against the batch strategy.

Another explanation to specific marennine productivity differing from one culture to the other has been proposed by Gargouch *et al.* (2022) and regards access to nutrients. The increase in marennine externalization with dilution rate could have been the consequence of an increase in marennine synthesis due to nutrient addition. This hypothesis fits with our observations, explaining variability between specific productivities of strains with different cell sizes. Smaller cells tend to be maintained longer in suspension, thus favouring access to nutrients and optimal light, enhancing marennine production along primary metabolism then externalization as EMn. The P_v consistency observed between both cultures, despite different cellular concentrations and cell sizes, could be a consequence of the greater ratio of productive cells in the MPBR population.

It is worth noting that all strains confounded, cell biovolume explained 66% of the EMn specific productivity variability (P_s) observed from one culture to another ($R^2= 0.66$), meaning that about 30% of the inter-strain variability remains unexplained. When

considering the change in specific productivity P_s with the decrease in size observed in NCC553 over one year of culture, NCC 529 specific productivity was higher and NCC531 lower than expected based on the cell size alone, implying the existence of other factors, possibly strain-related, which could influence EMn production. Another hypothesis could be the role of microalgae-bacteria interactions in *H. ostrearia* development and how it could end up influencing EMn productivity. Indeed, visual observation of the sedimentation pattern in MPBR of the different strains (Annex 2, Figure S. 4) clearly demonstrated two different behaviours between NCC553 and NCC531. The biofilm development of NCC 531, occurring during the 10h dark phase, was almost inexistent compared to NCC553, suggesting a different consortium in the phycosphere. Difference in biofilm formation could explain differences observed regarding EMn production. Bacteria-microalgae consortium has been proved to modulate metabolite production by microalgae (Tong *et al.*, 2023), and a recent study regarding *H. ostrearia* microbiome showed that bacterial consortium composition was very similar between different strains coming from the same sampling area (Lépinay *et al.*, 2016). In contrast, the strain NCC553 is the result of *in vitro* controlled auxosporulation, which could have affected its phycosphere, thus explaining a different behaviour from NCC 531. Presence of beneficial consortium has been proved to increase microalgal biomass although no measure was done regarding EMn productivities yet. (Lépinay *et al.*, 2018)

Another aspect potentially explaining variability from one strain to another would be the genetics. NCC 529 did reach higher EMn accumulation compared to the three other strains. This different response to a same light regime and culture system could be explained by an over-expression of marennine metabolic pathway in response to high light on a longer period. Epigenetic variability can also be expected to intervene among clones of a same species (Thessen *et al.*, 2009), in particular following different culture management regimes (Andersen, 2005 ; Gabed *et al.*, 2022). For example, different light regimes or subculturing frequencies can induce different light acclimation or acceleration of the cell cycle, inducing early ageing of a strain, both of which are being expected to induce epigenetic modulation in *H. ostrearia* (Gabed *et al.*, 2022). In plants, modulation of carotenogenesis by epigenetic process has been reported, tuning the biosynthesis of photoprotector pigment according to

plant development (Anwar *et al.*, 2021). Similar processes could explain how *H. ostrearia* acclimates in response to repetitive increase of light level in its environment. Over months of regular subculturing in laboratory, it could explain why NCC529 appeared to overexpress marennine metabolic pathways.

Marennine production has been shown to be under the control of several factors, making it a complex work to understand productivity fluctuations. This study confirms the role of light in EMn production and externalization, and it underlines the importance of light environment (shading, fluctuation rate, number of cells in suspension), supporting the hypothesis of marennine being a mean for *H. ostrearia* to respond to changes in light regime, thus preventing excess carbon accumulation. Other photoprotective strategies exist for diatoms, as non-photochemical quenching of excess excitation energy (dissipated as heat), *de novo* carotenogenesis or C4 metabolism, the latter having been already associated with blueing of cells in *H. ostrearia* (Rech, 2008). This auto-shading strategy could be triggered by developing peculiar culture devices to optimize marennine production, but it involves beforehand to better understand how to favour this peculiar metabolic pathway.

2.2.5 Conclusion and perspectives

This study is a first attempt to correlate the biological traits (biomass production and EMn productivity) of different strains of *H. ostrearia* to their behaviour and culture device. It confirms the reliability of the MPBR and, more generally, the hybrid process to achieve high EMn productivity, regardless of the strain of *H. ostrearia* and its age. This work also highlights the need to pursue efforts regarding the understanding and the control of the behaviour of *H. ostrearia* in culture with regard to marennine synthesis and externalization, as it remains a key factor to optimize its production. The possible exploitation of *H. ostrearia* auto-shading capacity could also be a key point to explain such variability. Finally, this study illustrates the interest to study the importance of bacteria-*H. ostrearia* interactions in marennine synthesis and externalization, as it might play a major role in the observed intra-strain variability, as it could also be for interspecies variability.

Acknowledgments

This research work is part of a project that has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement N° 734708/GHaNA/H2020-MSCA-RISE-2016 (J.-L.M.). This work also received funding from the Institut France-Québec pour la coopération scientifique en appui au secteur maritime (IFQM) and Nantes Université for E.P.'s PhD position.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this study.

2.3 CHANGES IN BLUE PIGMENT EXTRACT IN A FED-BATCH CULTURE OF DIFFERENT *HASLEA OSTREARIA* STRAINS.

Elodie Pedron^{1,2}, Marylise Duperthuy³, Annabelle Mathieu-Denoncourt³, Céline Laroche⁴, Olivier Gonçalves², Anthony Massé², Réjean Tremblay¹, Jean-Sébastien Deschênes¹

¹Institut des sciences de la mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, Rimouski, Canada

²GEPEA, CNRS UMR 6144, Nantes Université, Oniris, Saint-Nazaire, France

³ Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada

⁴ Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, Institut Pascal, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France CNRS, UMR 6602, IP, F-63178 Aubière, France

***Corresponding author:** Elodie Pedron, pedronelodie@gmail.com

Keywords

Haslea ostrearia ; Blue pigment, Extracellular marennine; antibacterial activity; antioxidant activity , Strain variability

Abbreviations

EMn: Extracellular marennine

EPS : Exopolymeric substance

MMW : medium molecular weight

UF : ultrafiltration

Abstract

Marennine is a water-soluble blue pigment produced by the benthic diatom *Haslea ostrearia*, which holds potential applications in various industries, including aquaculture, cosmetics, pharmaceuticals, and food engineering. Recent studies have questioned the impact of changing strains of *H. ostrearia* on marennine productivity during diatom cultivation. The objective of this work was to further study the quality of marennine production resulting from different strains. To assess inter-strain variability, three strains of *H. ostrearia* were cultivated under identical conditions, and blue water (culture supernatant) was collected. After preparation of the extract using double ultrafiltration at 30- and 3-kDa cutoffs, native marennine (intermediate fraction between 30 and 3 kDa) were compared on the basis of their bioactivities, complemented by spectral analysis. Despite following the same production process, significant differences in bioactivity efficiency were observed between the three native marennine extracts obtained. The ATR– FTIR spectra revealed localized changes correlated with bioactivities variability, suggested to result from the variability of the extract composition. Generally, marennine studies have been conducted by monitoring its chromophore; however, the observations reported here support the hypothesis that the polymer extract collected through double ultrafiltration influences their bioactivities. A focus on the variability of the polysaccharide backbones of marennine as well as the dynamics of the production of other EPS is needed to understand the origin of the variability observed. Rather than controlling the production of these EPS, understanding their nature would help in developing efficient preparation processes to separate them from the marennine extract, ensuring a reliable product for diverse valorization purposes.

2.3.1 Introduction

Marennine is a hydrosoluble blue pigment synthesized by the diatom *Haslea ostrearia*. This pigment exhibits bioactivities such as antibacterial, antiviral, and antioxidant properties, making it a biologically active organic molecule of interest for use in aquaculture, cosmetics, pharmaceuticals, and food engineering (Gastineau *et al.*, 2014). In the last two decades,

Pouvreau *et al.* (2006a), Gastineau *et al.* (2014), and more recently Zebiri *et al.* (2023) and Yusuf *et al.* (2023) have achieved the most significant advances regarding marennine structure. Their work concluded on the heteropolysaccharide nature of marennine, yet the structural origin of the blue color remains undetermined, with the most plausible hypothesis being a chromophore of polyphenolic nature.

To promote the use of marennine in aquaculture, a robust and accessible production process is required. However, if efforts have been made to improve the productivity of the blue pigment (Gargouch *et al.*, 2022 ; Gastineau *et al.*, 2014 ; Nghiem Xuan *et al.*, 2020, 2021 ; Prasetya *et al.*, 2022 ; Rossignol *et al.*, 2000b ; Turpin *et al.*, 2001), the impact of the culture systems on the quality of marennine extract has been overlooked. A recent study have shown that productivity can be affected by the need for strain renewal (Pedron *et al.*, 2023). Indeed, diatom cells are enclosed in a rigid silicate cell wall called a frustule that reduces in size after each mitosis, following the Macdonald-Pfitzer rule (Chepurnov *et al.*, 2004 ; Hense et Beckmann, 2015), until a critical size threshold, which leads to clonal culture extinction (Chepurnov *et al.*, 2004 ; Davidovich *et al.*, 2009).

The focus on improving the productivity of the culture system has neglected the study of the impact of the culture process on the quality of the produced marennine extract. The feasibility of exploiting marennine in aquaculture relies on the availability of a readily obtained and affordable extracts, which exclude the use of complete purification process. The most commonly accepted method to obtain such an extract is the approach proposed by Pouvreau *et al.* (2006b) consisting of a double ultrafiltration with a cutoff of 30 and 3 kDa to concentrate the blue compound retained in between. However, diatoms are known to produce various and numerous exopolymers (EPS), the quality and quantity of which vary depending on their physiological state. EPS production by *H. ostrearia* has not yet been characterised and the composition of the culture supernatant remains uncertain. The preparation of a double ultrafiltered solution of marennine could likely co-extract other compounds present inside the culture supernatant, and the variability of this solution could negatively impact its quality,

with adverse effects on its bioactivity. This aspect has never been taken into account before, although it is essential for the use of marennine extracts in bivalve's farming.

The present study aims at estimating the extent to which marennine quality could fluctuate with *H. ostrearia* strain renewal. To this end, blue water production of three different strains of *H. ostrearia* cultivated under identical conditions, were investigated. Changes in marennine quality with strains were assessed by comparing its chemical characteristics and its antibacterial and antioxidant activities. The collected data should initiate subsequent exploration into marennine extracts' dependable production, tracing back the source of their quality discrepancies.

2.3.2 Materials and methods

Microalgae and culture maintenance

Microalgae and culture maintenance

The different strains of *H. ostrearia* used during this study were provided by the Nantes Culture Collection (NCC, Nantes University, France). *Haslea ostrearia* NCC 529 was isolated from Bourgneuf Bay (Loire-Atlantique, France), as was *H. ostrearia* NCC531. *Haslea ostrearia* NCC553 resulted from an auxosporulation between *H. ostrearia* NCC527 and *H. ostrearia* NCC532, both isolated from Bourgneuf Bay (Loire-Atlantique, France). The strains were cultivated as described in Pedron *et al.* (2023) in a submerged membrane photobioreactor (MPBR), and the culture supernatant was harvested by daily filtration of the culture.

Marennine extract refining

The culture supernatants were filtered using a 0.2 µm cut-off filtration unit (Sartolab™ P20 Plus) before being stored at 4°C and in the dark. They were then pre-concentrated *via* ultrafiltration at a cutoff of 3 kDa (P = 22 psi), until the volume reduction factor (VRF) outreached 10X. The resulting extracts (retentate) were stored at -20°C in the dark. The three

MMW-UF extracts were then obtained from the three blue water (BW) lots harvested during the cultivation of *H. ostrearia* NCC553, NCC531 and NCC 529, respectively. The BWs were refined according to Pouvreau *et al.* (2006b) cascade diafiltration to collect marennine with average molecular weights between 30 and 3 kDa, using 30 and 3 kDa cutoff membranes. Diafiltration at 1 kDa (50 psi) was performed until the permeate salinity reached 0 ppt. All ultrafiltration steps were performed using AMICON® 400 mL stirred cells and Ultracel® membranes, at 20°C.

Bioactivity study

Antibacterial activity

Vibrio splendidus 4D1-8 was selected for its growth inhibition response to marennine extract (Falaise *et al.*, 2019b). Strains were supplied by the Laboratoire de biologie intégrative des modèles marins (LBI2M) (Station biologique de Roscoff, France) and was isolated from oyster tissues, *Crassostrea gigas*. *Vibrio splendidus* 4D1-8 showed moderate virulence on oysters (Oyanedel *et al.*, 2020). *Vibrio* strain was maintained at -80 °C in 20% glycerol. Broth cultures were prepared with autoclaved, cation-adjusted, LB broth media by the addition of 2% NaCl (LB 2%NaCl) (10 mg mL⁻¹ tryptone (Thermo Fisher™), 5mg mL⁻¹ yeast extract (Thermo Fisher™), 20 mg mL⁻¹ NaCl) and strains were isolated on LB-2% NaCl-1.2% agar media (LBA 2% NaCl) from the -80°C. Plates containing the isolated colonies were kept at room temperature for no more than a week. Before the test, three different colonies per Petri dish (biological replicates, n=3) were inoculated in 5 mL LB 2% NaCl and grown overnight at room temperature (20°C) under moderate agitation (130 rpm). The next day, 100 µL of the bacterial suspension was transferred into 5 mL of LB 2% NaCl and incubated at 20°C with agitation until the bacterial suspension reached an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 2. This inoculum was subcultured 2 h before the antibacterial response test to ensure that the inoculum was growing exponentially. Right before inoculation of the 96-wells microplate, 1 µL of the inoculum was subculture in 14 mL of 3 times concentrated LB 2% NaCl (3xLB 2% NaCl) culture medium, so that an inoculum of OD₆₀₀ of 0.0001 was

used. *Vibrio splendidus* was exposed to a series of the tested extracts (dilution carried with 3xLB 2% NaCl). Antibacterial activity was evaluated in a 96-well microplate in which 25 μ L of inoculum was added to 75 μ L of tested marennine extract. Each concentration was tested in technical triplicates, and a blank was prepared with 25 μ L of 3xLB 2% NaCl and 75 μ L of the corresponding dilution of BW. Bacteria were incubated at 20°C with 160 rpm agitation for 24 h, after which the level of growth was assessed by measuring the absorbance at 600 nm (SpectraMax ID3 plate reader). The growth inhibition (%) of *V. splendidus* is estimated from the following equation:

$$\text{Growth inhibition} = \frac{(Abs_t - Abs_{LB}) - (Abs_i - Abs_{EMn})}{(Abs_t - Abs_{LB})} * 100 \quad (1)$$

with Abs_t the absorbance at 600 nm of the well containing 100 μ L the *V. splendidus* strain culture, Abs_{LB} the absorbance at 600 nm of well containing 100 μ L LB medium, Abs_i the absorbance at 600 nm of the well containing the *V. splendidus* exposed to a concentration of marennine extract, Abs_{EMn} the absorbance at 600 nm of the well containing non-inoculated LB culture medium and corresponding solution of BW.

The extract concentration inducing 20% growth inhibition, IC20, was obtained, as IC50 was not attainable under these experimental conditions.

Antioxidant activity

The DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) scavenging assay was performed using the Dojindo DPPH assay kit, according to a method from Shimamura *et al.* (2014) adapted to marennine extract of all levels of purification, to ease future comparison. The initial DPPH solution (0.2 mM) was diluted 5-fold (0.04 mM) so that the activity would be detectable within low concentration range of extracts (dilution carried with nanopure water). As proposed by Gang *et al.*, (2021), the 99% ethanol used to prepare the DPPH solution was replaced by a 70% ethanol solution, which is more suitable for the saline extracts. For each microplate, the antioxidant capacity of a positive control, the antioxidant Trolox ([Trolox]

maximal concentration reaching $8.0 \mu\text{mol L}^{-1}$), was also tested to ensure the reliability of the DPPH solution used.

After 20 μL of the tested sample, BW or Trolox solution, and 80 μL of 0.1 M Tris–HCl buffer (pH 7.4) were added into the microplate’s wells, 100 μL of the DPPH solution (0.04 mM) was added. After completing the microplate, the plate was shaken for 30 s and left at room temperature in the dark for 30 minutes, after which the absorbance of the solution at 517 nm was measured (SpectraMax ® 190 microplate reader). On each microplate, a mixed solution of 120 μL of ethanol and 80 μL of Tris–HCl buffer was used as the blank for Trolox, 100 μL of ethanol and 20 μL of NW and 80 μL of Tris–HCl buffer as the blank in the absence of marennine. As marennine absorbed near 517 nm, 100 μL of ethanol and 20 μL of extract solution at each tested concentration, and 80 μL of Tris–HCl buffer were used as blanks for extract solution. The absorbance at the addition of the tested sample was expressed as A_s , the absorbance at the addition of the corresponding blank as A_c , and the DPPH inhibition (%) was obtained from the following equation:

$$DPPH \text{ inhibition} = \frac{A_c - A_s}{A_c} * 100 \quad (2)$$

The extract concentration inducing 20% DPPH scavenging, IC₂₀, was obtained, as IC₅₀ was not attainable under these experimental conditions.

Physicochemical analysis

ATR-FTIR

For the ATR-FTIR spectra acquisition, a Bruker tensor 27 FTIR spectrometer equipped with an HTSXT plate reader module, a deuterated triglycine sulfate detector RT- DLaTGS, and the OpusLab v 7.0.122 software (Bruker Optics, Germany) was used. Infrared spectra were then recorded directly in transmission mode, and dry extracts were deposited directly on the Bruker tensor 27 FTIR spectrometer lens. The following parameters were set up: spectral resolution was fixed to 1 cm^{-1} , number of scans to 32, selected spectral range between

4,000 and 400 cm^{-1} , and microplate reader pinhole aperture set to 3 mm. Therefore, the diameter of the IR beam was sufficient for detecting all the material within a spot diameter of approximately 3 mm. Background spectra were collected using the same instrument settings as those employed for the samples.

UV-Visible

For UV–Visible (UV–Vis) spectral acquisition, a Cary 100 spectrophotometer (Agilent/Varian, Santa Clara, CA, USA), combined with Varian WinUV software (version 3.00) was used. The UV–Vis samples were analyzed at 24°C in quartz cuvettes of 1-cm path length. The selected spectral range was between 200 and 800 nm. The absorbance of the chromophore was measured at the observed λ_{max} in the visible range (between 400 and 800 nm).

Mass absorptivity

Dry weight was measured using the freeze-dried extract using the microbalance Cubis 3.6P-2500-M (Sartorius, Goettingen, Germany) and mass concentration was adjusted by solubilization in NW. The absorbance of the solubilized extracts was measured by collecting of their visible spectra (acquisition range 400-800 nm) using the same Cary 100 spectrophotometer (Agilent/Varian, Santa Clara, CA, USA). Taking into account the λ_{vis} shift in the visible region (between 400 and 800 nm), the maximum absorbance was collected and its ratio to its corresponding mass concentration was calculated to obtain the mass absorptivity of each extract, ϵ_{m} .

Statistical analysis

Bacterial growth inhibition results were modeled as a dose-response curve following a 4-parameter logarithmic function using the "drda" package and R software R-4.3. Experiments were conducted in triplicate (technical replicates) and repeated 3 times (biological replicates) each biological replicate was modeled separately. Interpolation of each model enabled the acquisition of IC₂₀ values. Statistical analysis was performed using

XLSTAT software. The normality of the distributions and the homoscedasticity of the variances were tested beforehand by the Shapiro-Wilk and Levene test. *Vibrio splendidus* IC20 were analyzed with one-way ANOVA to determine differences between extract antibacterial bioactivities. When differences were detected, Fisher's LSD multiple comparison tests were used to determine which means were significantly different. Significance of differences was defined at $p < 0.05$.

The DPPH inhibition results obtained from each BW lots are modeled as a linear dose-response curve and are compared using a one-way analysis of co-variance (ANCOVA) performed by XLSTAT software. When a difference was detected, the slope of each dose-response regression was compared using a student t-test to determine which means were significantly different. Significance of differences was defined at $p < 0.05$.

All statistical tests results are detailed in supplementary materials.

2.3.3 Results

On the one hand the three extracts of marennine exhibited equivalent growth inhibition activity (Figure 2.4a), enabling to reduce *V. splendidus* 4D1-8 growth by 20% with $10.5 \pm 1.3 \text{ mg}_{\text{EMn}} \text{ L}^{-1}$ regardless of the strains of *H. ostrearia* behind marennine production (ANOVA, $F = 0.261$, $p = 0.779$, Table S 7) (Figure 2.4c). On the other hand, DPPH radical scavenging efficiency differed from one marennine extracts to the next (ANCOVA, $F = 18.947$, $p = 0.004$, Table S 8, Table S 9) (Figure 2.4b, Figure 2.4c). *Haslea ostrearia* NCC 529 production displayed the highest antioxidant efficiency, enabling 20% DPPH radical scavenging at a [EMn] of $5 \pm 1 \text{ mg}_{\text{EMn}} \text{ L}^{-1}$. *Haslea ostrearia* NCC553 extract exhibited the same level of activity when [EMn] reached $7 \pm 1 \text{ mg}_{\text{EMn}} \text{ L}^{-1}$. *Haslea ostrearia* NCC531 extract was the less efficient one, with a DPPH scavenging efficiency two to four-times less efficient than the two other extracts, with an IC20 of $18 \pm 2 \text{ mg}_{\text{EMn}} \text{ L}^{-1}$.

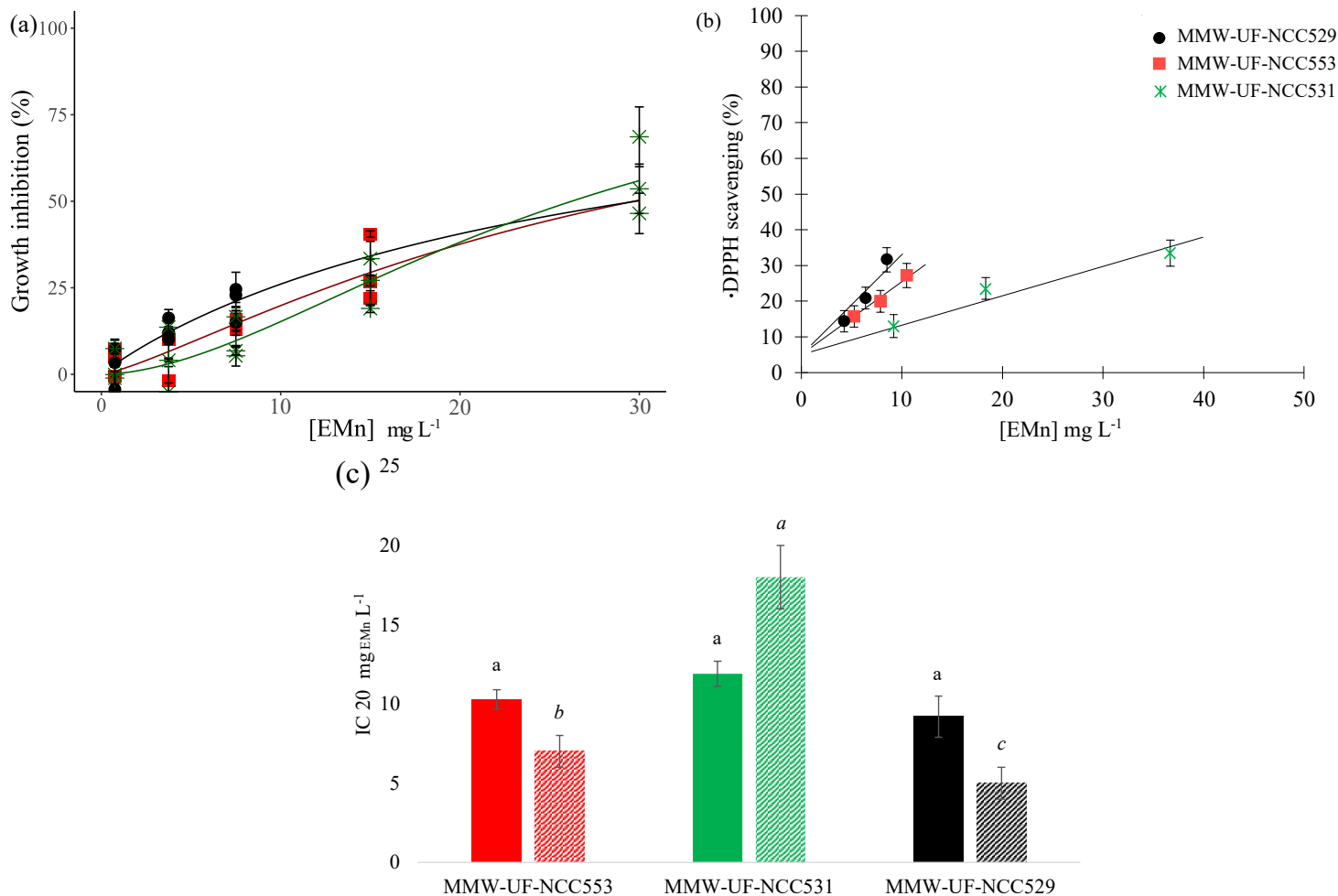


Figure 2.4 : Antioxidant and antibacterial activities of marennine extracts produced by three *H. ostrearia* strains. (a) Dose-response curves of *V. splendidus* 4D1-8 exposed to a concentration range (mg L⁻¹) of marennine extract [EMn] over 24h exposition. Each value represents the mean \pm standard deviation of (n=3), and three clones of the *Vibrio* strain were exposed to each extract. $R^2_{NCC529} = 0.78$, $R^2_{NCC531} = 0.90$, $R^2_{NCC553} = 0.78$. (b) Dose-response linear regression of DPPH radicals exposed to a concentration range (mg L⁻¹) of marennine extract [EMn]. $R^2_{\text{globalmodel}} = 0.92$. Each value represents the mean \pm standard deviation of (n=3). Values are reported in Table S 6. For both a and b figure, marennine extracts obtained from *H. ostrearia* NCC529 in black (circle), NCC531 in green (cross or diamond), and NCC553 in red (square). (c) EMn concentration inducing 20% (IC₂₀ mg_{EMn} L⁻¹) of *V. splendidus* growth inhibition (solid histogram) or DPPH radical scavenging (lined histogram). Results are expressed as mean \pm sd (n=3). Different letters indicate significant group difference, comparisons were made separately for antibacterial (ANOVA, F = 0.261, p = 0.779) and antioxidant (ANCOVA, F = 18.947, p = 0.004) bioactivities.

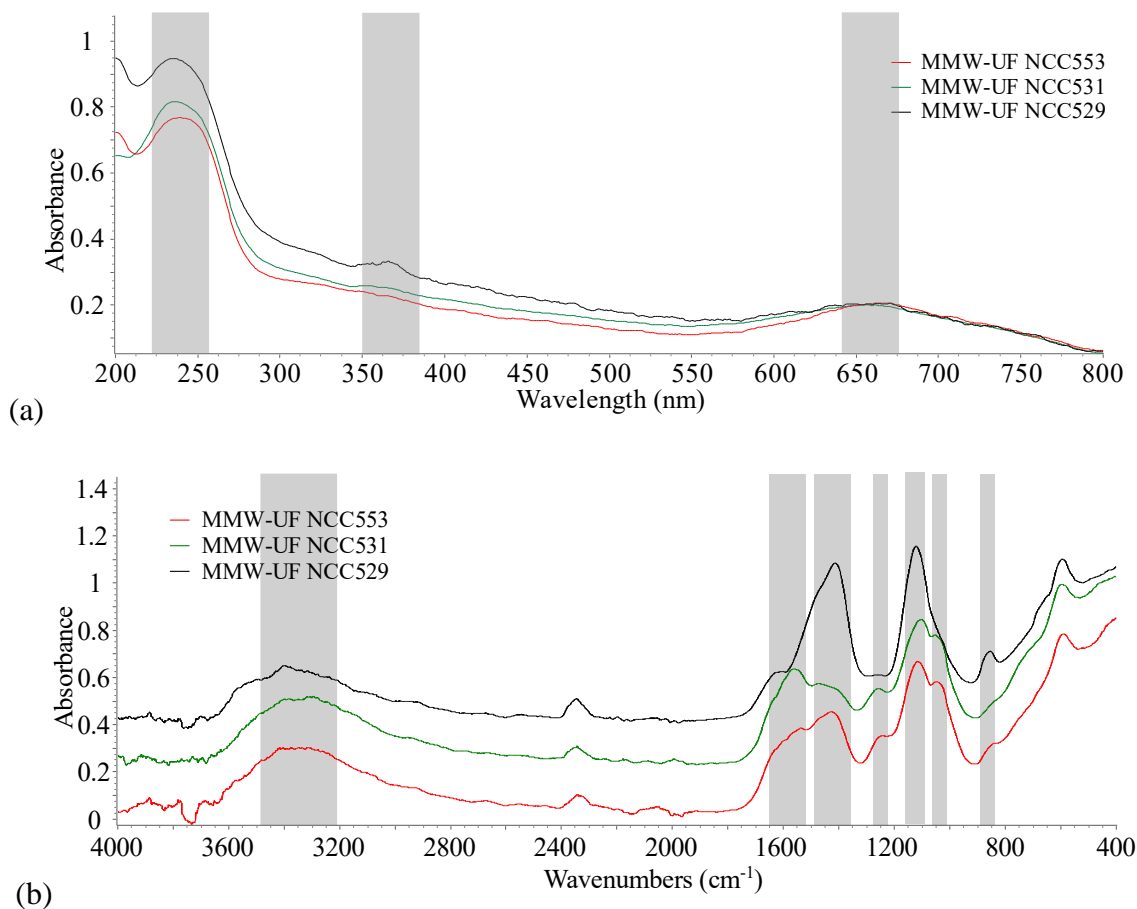


Figure 2.5: Absorption spectra of the marennine extracts produced by the three strains of *H. ostrearia* NCC553, NCC531 and NCC 529. (a) UV-Vis spectra of the extracts in nanopure water at pH 7. (b) ATR-FTIR spectra of the freeze-dried marennine extracts. Bands assignments are described in Table S 10 and Table S 11, respectively.

The UV-Vis spectra of the three extracts appeared to be very similar (Figure 2.5a), having a maximal absorbance at 660 ± 6 nm in visible range and exhibiting an absorbance band at 236 ± 2 nm in the UV range. Nevertheless, one could underline the more important relative absorbance of NCC529 extract in the UV range as well as a more distinctive absorbance in the 360 nm region. Looking at their ATR-FTIR profiles (Figure 2.5b), the three extracts can be differentiated from one another. The band at 1414 cm^{-1} is prominent for NCC529 profile, when the band around 1570 cm^{-1} is relatively more important for NCC531 profile. Meanwhile, NCC553 presents an intermediate profile, yet closer to NCC531 profile.

NCC529 spectrum distinguished itself also from the other extracts with a relatively more important absorbance band around 1100 cm^{-1} and between 800 and 900 cm^{-1} .

2.3.4 Discussion

The results of this study indicate that from one strain of *H. ostrearia* to another, there were some changes in the efficiency of marennine extract bioactivities. For instance, DPPH radical scavenging activity appeared to be affected when *V. splendidus* growth inhibition activity was not. Marennine is a hydrosoluble blue pigment whose polysaccharide structure has recently been described (Yusuf *et al.*, 2023 ; Zebiri *et al.*, 2023). The blue color of marennine is suspected to result from the presence of an aromatic structure, such as a phenolic aglycone (Gastineau *et al.*, 2014 ; Pouvreau *et al.*, 2006a ; Yusuf *et al.*, 2023 ; Zebiri *et al.*, 2023) linked to a heteropolysaccharide moiety. The latter comprises galactose, xylose, mannose, rhamnose, and fucose units, some of which are suspected to contain sulfate groups (Zebiri *et al.*, 2023, Bélanger, *et al. submitted*). Yusuf *et al.* (2023) also suggested the presence of 1,3- β -glucan units, possibly found under triple helical conformation. If marennine bioactivity efficiencies have been studied, only hypotheses regarding their structural and chemical origins have been developed, and the underlying mechanisms could be explained by either phenolic compounds or functional groups of polysaccharides. Marennine bioactivity and, notably, its antibacterial and antioxidant activities are of interest, for example, in postbiotics development for sustainable bivalve aquaculture. To encourage its promotion, the quality of the extracts must be ensured. Currently, the most ecological and economical approach to producing native marennine extracts usable in aquaculture remains the double ultrafiltration (intermediate fraction 30–3 kDa) proposed by Pouvreau *et al.* (2006b) to obtain a 90% purified marennine extract. The use of such an extract implies that the remaining co-products could affect the expected properties of marennine, which remains an important factor to study.

Quality variability was observed between the three BW lots produced, yet as available production did not permit the testing of higher concentrations, further research is required to

understand the extent of marennine extract variability. However, the spectral analysis of the marennine extract enabled us to investigate the possible origin of this variability. Indeed, no difference was observed between UV-Vis spectra of the different marennine extracts, suggesting a consistent chromophore environment despite the change of *H. ostrearia* strain. Conversely, marennine extracts obtained from the production of *H. ostrearia* NCC529 (MMW-UF-NCC529), which exhibited the highest antioxidant activity, presented distinctive ATR-FTIR spectra, with a prominent absorbance band at 1418 cm^{-1} which could be associated with O-C-O stretching vibration (Table S 11). This absorbance band could result from the presence of carboxyl functional groups on the polysaccharide backbones, on galacturonic or glucuronic acid units. Presence of such uronic acids in marennine composition would be consistent with composition of EPS found in surface sediments of a diatom-dominated intertidal mudflat of Marennes-Oléron, where *H. ostrearia* is originally found (Pierre *et al.*, 2014). Further structural analyses are needed to study the potential presence of uronic acid in marennine, since until now the lack of uronic acid detection during marennine structural studies could result from the harsh hydrolysis conditions used (Zebiri *et al.*, 2023). Compared to MMW-UF-NCC529, marennine extract MMW-UF-NCC531, which exhibits the lowest antioxidant efficiency, presented a relatively important absorbance band at 1554 cm^{-1} on its ATR-FTIR spectra, which is often associated with the presence of amide groups (Bélanger *et al.*, 2020 ; Borjas Esqueda *et al.*, 2022) (Table S 11). Such a structural feature has not been observed in marennine (Gastineau *et al.*, 2014 ; Pouvreau *et al.*, 2006a ; Zebiri *et al.*, 2023), which implies that this absorbance band could result from the presence of co-products, of which vibration signals would hinder those resulting from marennine structure. Eventually, marennine extract MMW-UF-NCC553, which exhibited an intermediate antioxidant efficiency, presented an intermediate profile compared with the two other extracts, with a relatively important band at 1418 cm^{-1} but also a distinctive shoulder at 1554 cm^{-1} .

ATR-FTIR spectra are used for routine analysis of the EPS structure (Ren *et al.*, 2019) to determine the functional groups of these polymers. Here, the ATR-FTIR spectra implied a variability in the composition of EPS present in each extract, which could be explained by

the change in the *H. ostrearia* strain used for its production. *Haslea ostrearia*, as a diatom, is expected to produce exopolymer substances (EPS) other than marennine, as confirmed by Bélanger *et al.* (2020). EPS production by microorganisms changes according to their physiological states (Fogg, 1983 ; Gügi *et al.*, 2015 ; Laroche, 2022 ; Martinho De Brito *et al.*, 2023 ; Shnyukova et Zolotariova, 2015 ; Underwood *et al.*, 2004). As Pedron *et al.* (2023) demonstrated, *H. ostrearia* from one strain to another exhibits variability in marennine productivities when cultivated under identical conditions, which implies variation at the physiological level of biomass, and thus potential global variations in EPS production. Such variations would have a repercussion on the composition of the culture supernatant, which is harvested to collect extracellular marennine. Because UV-Visible spectra did not show significant changes from one extract to the other, marennine was apparently left unchanged despite the change in production strain, encouraging the focus on potential variations of the co-product of the different culture supernatant. *Haslea ostrearia* NCC529 displayed the highest marennine productivity (Pedron *et al.*, 2023) and the resulting extract presented the highest antioxidant efficiency. Taken together, these results suggest that EPS production by *H. ostrearia* NCC 529 was dominated by marennine, which reduced the relative amount of co-products in the final extract, compared with the two other *H. ostrearia* strains. Here, the ATR-FTIR profile implied a modification in the prominence of carboxyl groups. Their relative amount could result from the relative amount of marennine and might explain the DPPH radical scavenging efficiency of the molecule. Indeed, the hindrance of such functional groups due to co-product aggregation to marennine could explain the reduction of DPPH radical scavenging bioactivity (Apak *et al.*, 2013), all the more so since polysaccharide antioxidant bioactivities efficiency have been related to the increasing accessibility of carboxyl groups from galacturonic acids (Hosseini Abari *et al.*, 2021).

Further work should focus on the genetic or epigenetic origin of such inter-strain variability, as the present study advocates that the final marennine extract quality results from fluctuations in EPS production. These variations may result from differential modulation of EPS metabolic pathways from one strain to another, as proposed by Pedron *et al.* (2023). Combined comparative transcriptomic and genomic analyses of *H. ostrearia* strains could

help elucidate whether these variations result from evolution of the genome or adaptation of its expression. Because marennine extracts quality variability might result from the presence of EPS co-extracted, further efforts should be made to develop an economically and ecologically sustainable additional step to reduce the amount of those co-products in the final marennine extract. Preliminary work based on the use of ionotropic gelation proposed by Bélanger *et al.* (2020) can enable the removal of the EPS fraction co-extracted from the culture supernatant. The impact of this refining pathway on the bioactivity of marennine extract could help understand the influence of co-extracted EPS on bioactive efficacy. Finally, our results highlight the differential impact of these co-extracts on the antioxidant and antibacterial properties of marennine extracts. The DPPH radical scavenging efficiency is more readily affected by the hindering of the active site (Apak *et al.*, 2013), which could justify the presence of co-extracts that affect this bioactivity by interfering with the reduction reaction. Regarding antibacterial activity, the variability of co-extracts did not appear to affect bacterial growth inhibition response. Then the interaction between marennine and the bacterial membrane (Bouhleb *et al.*, 2021 ; Tardy-Laporte *et al.*, 2013) were not affected by the presence of co-extracts of marennine. Studying separately the antioxidant and antibacterial properties of the EPS and marennine fraction of *H. ostrearia* culture supernatant is encouraged to facilitate an understanding of these results and, notably, the structural origins of these bioactivities.

Acknowledgments

This research work is part of a project that has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement N° 734708/GHaNA/H2020-MSCA-RISE-2016 (J.-L.M.) and was supported by the Ressources Aquatiques Québec (RAQ) Research Network supported by the Fonds de Recherche du Québec-Nature et Technologies N° 2014-RS-171172. This work also received funding from the Institut France-Québec pour la coopération scientifique en appui au secteur maritime (IFQM) and Nantes Université for E.P.'s PhD position.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this study.

2.4 SUPPLEMENTARY MATERIALS

2.4.1 Hybrid photobioreactor operation for the intensified production of *Haslea ostrearia* and marennine in function of strain variability

E. Pedron^{1,2}, N. Gargouch¹, J-L Mouget³, R. Tremblay², J-S. Deschênes², A. Massé¹, O. Gonçalves^{1*}. Hybrid photobioreactor operation for the intensified production of *Haslea ostrearia* and marennine in function of strain variability

¹GEPEA, CNRS UMR 6144, Nantes Université, Oniris, Saint-Nazaire, France

²Institut des sciences de la mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, Rimouski, Canada

³Mer-Molécules-Santé, MMS, FR CNRS 3473, IUML, Le Mans Université, Le Mans, France

*Corresponding author: Olivier Gonçalves, olivier.goncalves@univ-nantes.fr

Annex 1 : Statistical analysis

Table S 1: Results of the one-way analysis of variance (ANOVA) on the effect of “culture” on the initial biometric profiles of the inoculum, illustrated by the parameters: cell length (μm), biovolume of the cells (μm^3), total pigment specific content $P_{\text{spe}}^{\text{T initial}}$ ($\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$). Results of the ANOVA on the effect of “culture” on parameters obtained during stationary phase of cultures : cell density (N , 10^6 cell L^{-1}), EMn concentration (mg L^{-1}), maximal growth rate (μ_{max} , d^{-1}), late exponential day (LED, d), biovolume of cell ($10^{12} \mu\text{m}^3 \text{ L}^{-1}$), total pigment specific content $P_{\text{spe}}^{\text{T}}$ ($\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$), EMn volumetric productivities (P_v , $\text{mg}_{\text{EMn}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), EMn specific productivities (P_s , $\text{mg}_{\text{EMn}} 10^9 \text{ cell}^{-1} \text{ d}^{-1}$) and EMn biovolumetric productivities P_b ($\text{fg}_{\text{EMn}} \mu\text{m}^{-3} \text{ d}^{-1}$). Significant differences at $p < 0.05$ are in bold and indicated by *. DF = degrees of freedom, SS = Sum-of-squares, MS = Mean squares, F = Fratio, P = p-values. Model : $Y = \text{moyenne}(Y)$

| Effect | DF | SS | MS | F | P |
|--|----|--------------|--------------|----------|--------------------|
| Cell length (μm) | | | | | |
| Culture | 2 | 6807.209 | 3403.604 | 1020.401 | <0.0001* |
| Residual | 6 | 20.013 | 3.336 | | |
| Bv (μm^3) | | | | | |
| Culture | 2 | 50205945.495 | 25102972.747 | 39.319 | <0.001* |
| Residual | 6 | 3830699.090 | 638449.848 | | |
| $P_{\text{spe}}^{\text{T}}$ initial ($\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$) | | | | | |
| Culture | 2 | 631.860 | 315.930 | 31.405 | 0.001* |
| Residual | 6 | 60.359 | 10.060 | | |
| N (10^6 cell L^{-1}) | | | | | |
| Culture | 3 | 181599.428 | 60533.143 | 120.847 | <0.0001* |
| Residual | 15 | 7513.630 | 500.909 | | |
| [EMn] (mg L^{-1}) | | | | | |
| Culture | 3 | 928.981 | 309.660 | 190.519 | <0.0001* |
| Residual | 15 | 24.380 | 1.625 | | |
| μ_{max} (d^{-1}) | | | | | |
| Culture | 3 | 0.090 | 0.030 | 5.364 | 0.026* |
| Residual | 8 | 0.045 | 0.006 | | |
| LED (d) | | | | | |
| Culture | 3 | 11.068 | 3.689 | 9.637 | 0.005* |
| Residual | 8 | 3.063 | 0.383 | | |
| [Bv] ($10^{12} \mu\text{m}^3 \text{ L}^{-1}$) | | | | | |
| Culture | 3 | 62.884 | 20.961 | 2453.531 | <0.0001* |
| Residual | 14 | 0.120 | 0.009 | | |
| $P_{\text{spe}}^{\text{T}}$ ($\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$) | | | | | |
| Culture | 2 | 195.025 | 97.513 | 141.015 | <0.0001* |
| Residual | 10 | 6.915 | 0.692 | | |
| P_{v} ($\text{mg}_{\text{EMn}} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) | | | | | |
| Culture | 3 | 8.401 | 2.800 | 169.778 | <0.0001* |
| Residual | 14 | 0.231 | 0.016 | | |
| P_{s} ($\text{mg}_{\text{EMn}} 10^9 \text{ cell}^{-1} \text{ d}^{-1}$) | | | | | |
| Culture | 3 | 44.830 | 14.943 | 283.079 | <0.0001* |
| Residual | 14 | 0.739 | 0.053 | | |
| P_{b} ($\text{fg}_{\text{EMn}} \mu\text{m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) | | | | | |
| Culture | 3 | 94.092 | 31.364 | 3985.187 | <0.0001* |
| Residual | 14 | 0.110 | 0.008 | | |

Table S 2: Results of the linear regression between pigment specific content of cells at the beginning of the culture (P_{spe}^T initial ($\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$)) and cell length (μm). Significant differences at $p < 0.05$ are in bold and indicated by *. T = t-value, P = p-values.

| Model parameters | $R^2=0.69$ | | | |
|--|--------------|-------|--------------|---------------|
| | Coefficients | SD | T | P |
| Constant | -8.532 | 5.526 | -1.544 | 0.166 |
| $(P_{spe}^T \text{ initial } (\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}))$ | 0.264 | 0.067 | 3.923 | 0.006* |

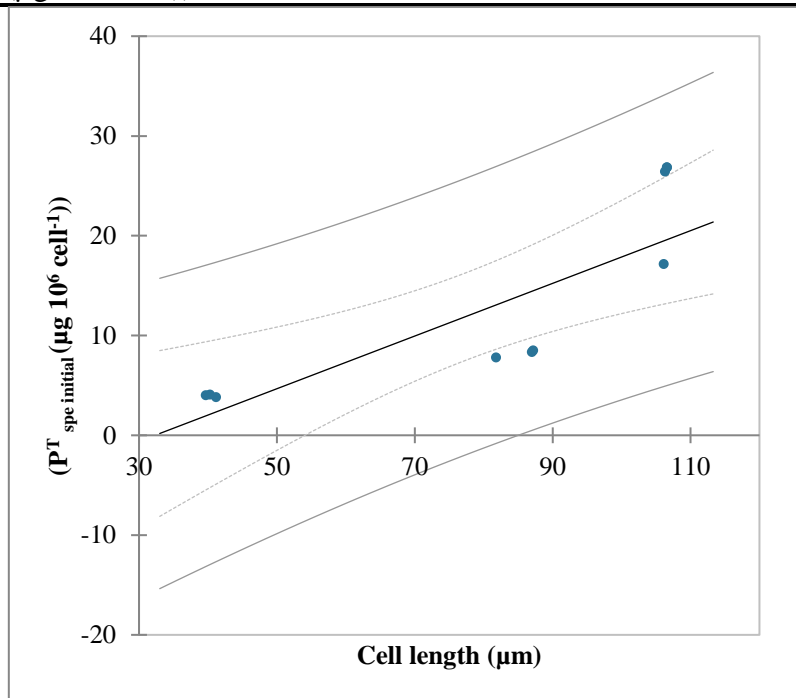


Figure S. 1 :Linear regression between pigment specific content of cells at the beginning of the culture (P_{spe}^T initial ($\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$)) and cell length (μm). Linear model corresponds to the black line, the dotted grey curves correspond to the prediction interval at a confidence level of 95% of the prediction model, the continuous grey lines correspond to the punctual prediction interval at a confidence level of 95%. $R^2=0.69$

Table S 3: Results of the linear regression between pigment specific content of cells during the stationary phase of the culture (P_{spe}^T ($\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$)) and cell length (μm). Significant differences at $p < 0.05$ are in bold and indicated by *. SE = standard error, T = t-value, P = p-value.

| Model parameters | $R^2=0.70$ | | | |
|---|--------------|-------|--------------|---------------|
| | Coefficients | SD | T | P |
| Constant | -2.497 | 2.441 | -1.023 | 0.340 |
| $(P_{spe}^T (\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}))$ | 0.119 | 0.030 | 4.000 | 0.005* |

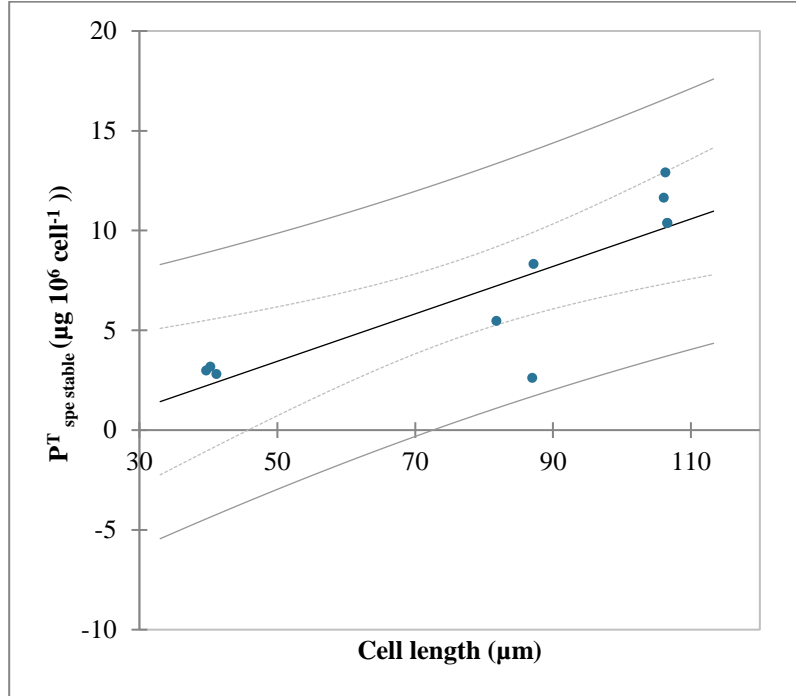


Figure S. 2: Linear regression between pigment specific content of cells during the stationary phase of the culture ($P^T_{spe} (\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1})$) and cell length (μm). Linear model corresponds to the black line, the dotted grey curves correspond to the prediction interval at a confidence level of 95% of the prediction model, the continuous grey lines correspond to the punctual prediction interval at a confidence level of 95%. $R^2=0.70$

Table S 4: Results of the linear regression between cell biovolume ($Bv (\mu\text{m}^3)$) and specific EMn productivities ($P_s (\text{mg}_{EMn} 10^9 \text{ cell}^{-1} \text{ d}^{-1})$) observed during stationary phase of the culture. Significant differences at $p < 0.05$ are in bold and indicated by *. SE = standard error, T = t-value, P = p-value.

| Model parameters | $R^2=0.66$ | | | |
|----------------------|--------------|-----------|--------|----------|
| | Coefficients | SE | T | P |
| Constant | 6.135 | 0.716 | 8.063 | <0.0001* |
| $Bv (\mu\text{m}^3)$ | -5.92.10-4 | 1.05.10-4 | -5.636 | <0.0001* |

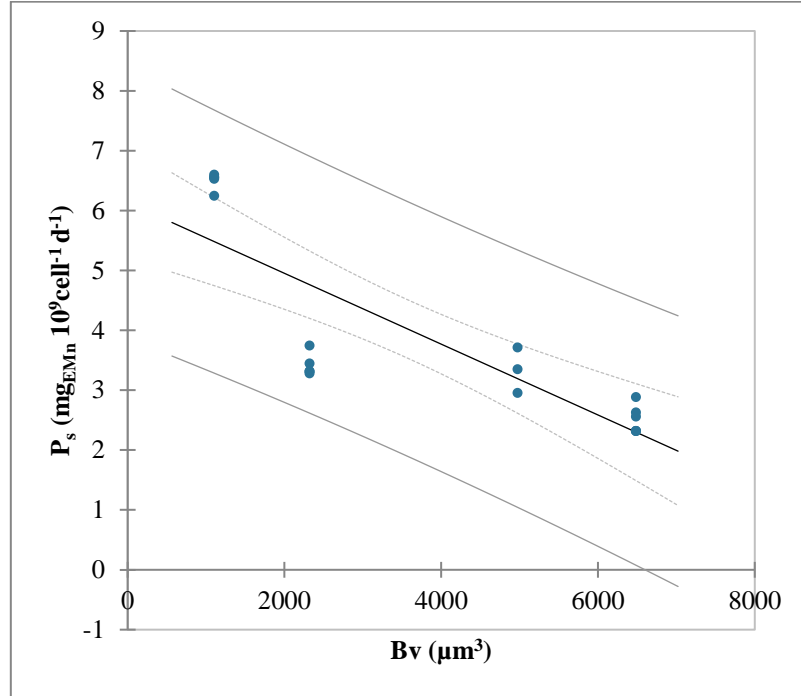


Figure S. 3: Linear regression between cell biovolume (Bv (μm^3)) and specific EMn productivities (P_s ($\text{mg}_{\text{EMn}} 10^9 \text{cell}^{-1} \text{d}^{-1}$)) observed during stationary phase of the culture. Linear model corresponds to the black line, the dotted grey curves correspond to the prediction interval at a confidence level of 95% of the prediction model, the continuous grey lines correspond to the punctual prediction interval at a confidence level of 95%. $R^2=0.66$

Annex 2 : Supplementary material



Culture A (NCC553) before homogenisation



Culture A (NCC553) after homogenisation



Culture B (NCC553') before homogenisation



Culture B (NCC553') after homogenisation

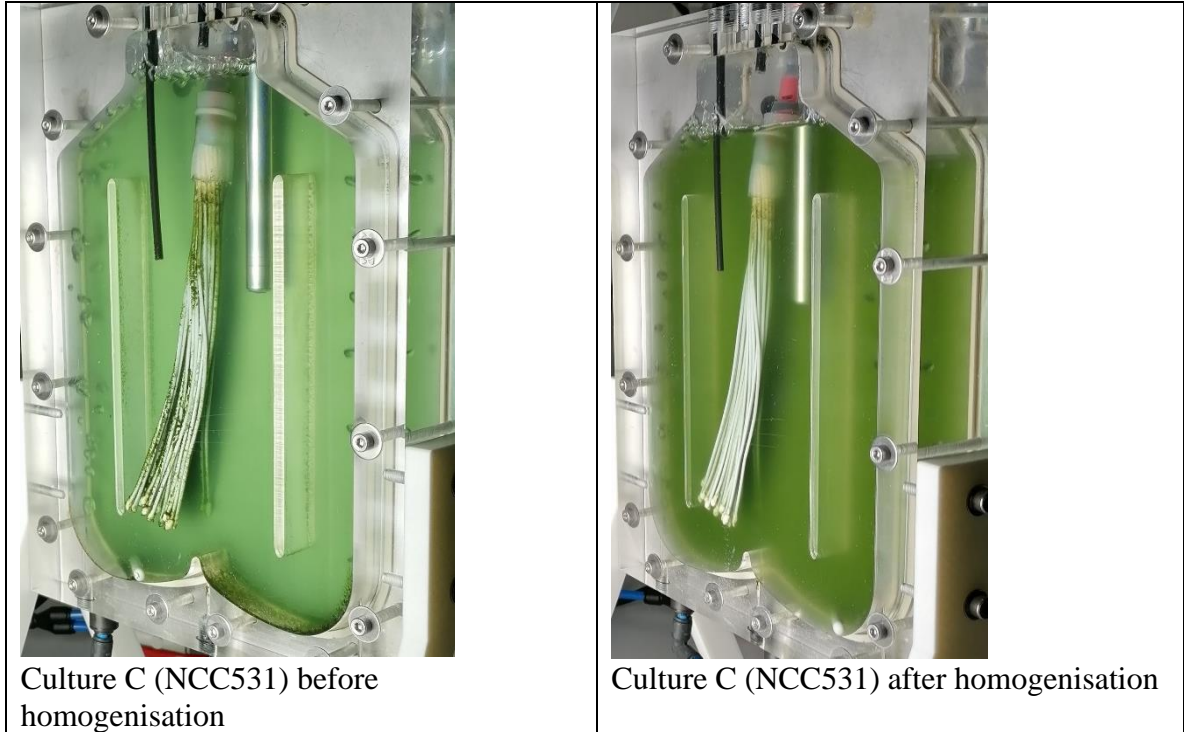


Figure S. 4 : MPBR pictures taken before and after daily complete homogenisation of the culture of *H. ostrearia* with a magnet bar placed in the reactor.

Table S 5: Specific pigment composition (P_{spe}^T , $\mu\text{g } 10^6\text{cell}^{-1}$) measured during the three cultures of *H. ostrearia* using two different strains (NCC553, NCC531) in MPBR ($d=0.01 \text{ d}^{-1}$, ES 1/3+Si). The results are expressed as the mean \pm standard deviation of $n \geq 3$ values measured during the stationary phase of culture.

| Parameters | NCC 553 (A) | NCC 553' (B) | NCC 531 (C) |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|
| $[\text{Chl}_a]_{spe}$ ($\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$) | 7.39 ± 0.63 | 3.37 ± 0.64 | 1.77 ± 0.09 |
| $[\text{Chl}_c]_{spe}$ ($\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$) | 0.71 ± 0.07 | 0.55 ± 0.16 | 0.24 ± 0.02 |
| $[\text{CarT}]_{spe}$ ($\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$) | 3.54 ± 0.34 | 1.55 ± 0.35 | 0.98 ± 0.05 |

2.4.2 Changes in blue pigment extract quality in a fed-batch culture of different *Haslea ostrearia* strains.

Elodie Pedron^{1,2}, Marylise Dupertuy³, Annabelle Mathieu-Denoncourt³, Céline Laroche⁴, Olivier Gonçalves², Anthony Massé², Réjean Tremblay¹, Jean-Sébastien Deschênes¹

¹Institut des sciences de la mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, Rimouski, Canada

²GEPEA, CNRS UMR 6144, Nantes Université, Oniris, Saint-Nazaire, France

³ Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada

⁴ Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, Institut Pascal, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France CNRS, UMR 6602, IP, F-63178 Aubière, France

***Corresponding author:** Elodie Pedron, pedronelodie@gmail.com

Table S 6 : Marennine extracts concentration inducing 20% (IC₂₀) of *V. splendidus* 4D1-8 growth inhibition. IC₂₀ are expressed in EM_n concentration (mg_{EM_n} L⁻¹) according to the chromophore absorbance of each extract. Results are expressed as mean ± sd (n=3). Different letters indicate significant group difference. (IC₂₀_{4D1-8} mg_{EM_n} L⁻¹, ANOVA, p =0,783 ; IC₂₀_{DPPH} mg_{EM_n}L⁻¹ ANCOVA , P = 0,004)

| Marennine extract | IC ₂₀ _{4D1-8} mg _{EM_n} L ⁻¹ | IC 20 _{DPPH} mg _{EM_n} L ⁻¹ |
|-------------------|--|--|
| MMW-UF-NCC553 | 10.3 ± 0.6 | 7 ± 1 <i>b</i> |
| MMW-UF-NCC531 | 11.9 ± 0.8 | 18 ± 2 <i>c</i> |
| MMW-UF-NCC529 | 9.2 ± 1.3 | 5 ± 1 <i>a</i> |

Table S 7 : Results of the one-way analysis of variance (ANOVA) on the effect of *H. ostrearia* strains on the EM_n concentration enabling a 20% growth inhibition of *V. splendidus* 4D1-8 (IC₂₀ mg_{EM_n} L⁻¹)

| Effect | DF | SS | MS | F | P-value |
|--------------------------------------|----|-------|-------|-------|---------|
| Log ₂ (IC ₂₀) | | | | | |
| <i>H. ostrearia</i> strain | 2 | 0,220 | 0,110 | 0,261 | 0,779 |
| Residual | 6 | 2,534 | 0,422 | | |

Table S 8 : Results of the one-way analysis of co-variance (ANCOVA) on the effect of *H. ostrearia* strains on DPPH radical scavenging (I_{DPPH} , %) taking into account the effect of the concentration of EMn ($[EMn]$, $mg_{EMn} L^{-1}$) on the scavenging response.

| Effect | DF | SS | MS | F | P-value |
|----------------------------|----|---------|---------|--------|--------------|
| [EMn]* I_{DPPH} | | | | | |
| <i>H. ostrearia</i> strain | 3 | 401,292 | 133,764 | 18,947 | 0,004 |
| Residual | 5 | 35,299 | 7,060 | | |

Table S 9 : Results of the post-hoc analysis, comparing, with a confident interval of 95%, the slope of the different linear dose-response of the DPPH radical scavenging test.

| Comparison | Difference | t | p-value |
|-----------------------------|------------|--------|--------------|
| [EMn]*NCC531vs [EMn]*NCC553 | -1216,232 | -7,222 | 0,001 |
| [EMn]*NCC531vs [EMn]*NCC529 | -1982,962 | -6,443 | 0,001 |
| [EMn]*NCC553vs [EMn]*NCC529 | -766,729 | -3,226 | 0,023 |

Table S 10 : UV-Visible bands and their absorbance as observed on Figure 2.5a

| Marennine extract | λ (nm) | Abs | ratio |
|-------------------|----------------|-------|-------|
| MMW-UF NCC553 | 239 | 0.767 | 3.7 |
| | 665 | 0.206 | |
| MMW-UF NCC531 | 236 | 0.817 | 4.1 |
| | 653 | 0.201 | |
| MMW-UF NCC529 | 234 | 0.947 | 4.6 |
| | 663 | 0.205 | |

Table S 11 : ATR-FTIR characteristic bands and assignments describing spectra on Figure 2.5b.

| Experimental wavenumber (cm ⁻¹) | Characteristic equivalent wavenumber (cm ⁻¹) | Assignment | Reference |
|---|--|---------------------|--|
| 3316 | 3200-3400 | -OH | (Bélanger <i>et al.</i> , 2020 ; Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022 ; Sanniyasi <i>et al.</i> , 2022) |
| 2934 | 2920-2930 | CH ₂ | (Bélanger <i>et al.</i> , 2020 ; Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022 ; Sanniyasi <i>et al.</i> , 2022) |
| 1633 | 1630-1640 | C=O | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022) |
| | | C=C | (Sanniyasi <i>et al.</i> , 2022) |
| 1540 | 1585-1605 | COO- | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022) |
| | 1525-1540 | Amide II (proteins) | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022) |
| 1407 | 1400-1420 | COO ⁻ | (Bélanger <i>et al.</i> , 2020 ; Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022) |
| 1258 | 1245-1255 | S=O | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022) |
| 1100 | 1075-1165 | C-O | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022 ; Sanniyasi <i>et al.</i> , 2022) |
| 1040 | 1020-1030 | C-C (ring) | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022 ; Sanniyasi <i>et al.</i> , 2022) |
| 859 | 840-850 | α linkage | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022 ; Sanniyasi <i>et al.</i> , 2022) |
| | 845 | S=O | (Bélanger <i>et al.</i> , 2020) |

CHAPITRE 3
ÉVOLUTION TEMPORELLE DE LA PRODUCTION ET DE LA QUALITE
D'EXTRAIT DE PIGMENT BLEU D'UNE CULTURE FED-BATCH DE
HASLEA OSTREARIA

Cette étude a été menée entre les laboratoires GEPEA (UMR CNRS 6144, Saint-Nazaire, France), ISMER-UQAR (Rimouski, QC, Canada) et le laboratoire de microbiologie du département microbiologie, infectiologie, immunologie de l'Université de Montréal (UdeM, Montréal, QC, Canada). Elle fait l'objet d'un article intitulé « *Temporal variation of blue pigment extract production and quality in a fed-batch culture of Haslea ostrearia.* » dont la version présentée ici sera soumise au journal *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. Cet article fut corédigé par moi-même ainsi que Marylise Duperthuy, Annabelle Mathieu-Denoncourt, Jean-Luc Mouget, Céline Laroche, Réjean Tremblay, Jean-Sébastien Deschênes, Anthony Massé, et Olivier Gonçalves. En tant que première auteure, ma contribution à ces travaux fut l'essentiel de la recherche sur l'état de l'art, le développement de la méthode, l'exécution des expériences, les analyses en laboratoire et la rédaction de l'article. Réjean Tremblay, Jean-Sébastien Deschênes, Anthony Massé, et Olivier Gonçalves ont fournis l'idée originale. Ils ont aidé à l'élaboration et la problématique ainsi qu'au développement de la méthode. Jean-Luc Mouget a apporté son expertise concernant la biologie de *H. ostrearia*. Marylise Duperthuy et Annabelle Mathieu-Denoncourt ont contribué aux analyses microbiologiques et à l'étude de leurs résultats. Céline Laroche a apporté son expertise concernant les analyses spectrales des polysaccharides. Tous les auteurs ont participé à la rédaction et à la révision des écrits.

Pedron, E., Mouget, J.-L., Duperthuy M., Mathieu-Denoncourt, A., Laroche, C., Tremblay, R., Deschênes, J.-S., Gonçalves, O., Massé, A. (en préparation pour soumission). *Temporal variation of blue pigment extract production and quality in a fed-batch culture of Haslea ostrearia.*

3.1 RESUME

La marennine est un pigment bleu excrété par la diatomée pennée *Haslea ostrearia*. Elle présente de nombreuses bioactivités, telles que des propriétés antioxydantes et antibactériennes, qui suscitent l'intérêt de la recherche. La méthode la plus courante pour obtenir un extrait abordable de marennine native consiste à cultiver *H. ostrearia* en système de culture « batch », récolter l'eau bleue produite, puis l'ultrafiltrer. La qualité de cet extrait est susceptible de varier en fonction de la culture de la diatomée, la composition de l'eau bleue évoluant au fil du temps dans un système fed-batch. De tels changements pourraient affecter la qualité de l'extrait de marennine, impact qui n'a pour le moment pas encore été étudié pour ce pigment. Cette étude vise à évaluer dans quelle mesure la qualité de la marennine fluctue au cours de la culture de *H. ostrearia*. Pour ce faire, un processus de culture hybride a été utilisé pour étudier l'évolution de la qualité de la production au cours des stades exponentiel, stationnaire et de sénescence de *H. ostrearia*. Une étude approfondie, ayant recouru à des tests biologiques (DPPH, test d'inhibition de croissance bactérienne) combinés à des analyses physicochimiques (UV-Visible, FTIR-ATR), a été réalisée pour investiguer l'évolution de la qualité de la marennine. Les résultats ont été mis en parallèle des productivités du système de culture, ainsi qu'à l'état physiologique de *H. ostrearia* au cours de celle-ci. Les résultats ont montré que pendant la phase exponentielle, les cellules atteignaient leur productivité maximale en marennine, et que l'eau bleue alors récoltée, présentait les bioactivités globales les plus efficaces. L'étude physicochimique a suggéré que la dégradation des bioactivités, survenant au cours de l'accumulation de marennine dans un système de culture fed-batch, pourrait résulter de l'accumulation de substances polymériques extracellulaires ainsi que de lysat cellulaire, ce qui nuirait à la composition finale de l'extrait de marennine raffiné. Cette étude fournit un point de départ pour la mise en place d'une production de marennine simple et abordable. Les résultats suggèrent que la MPBR est une approche adaptée si la biomasse est maintenue à une croissance exponentielle. Ils soutiennent également qu'une étape de raffinage supplémentaire réduisant de manière efficace la quantité

de co-extraits pourrait permettre d'assurer la constance de la qualité de l'extrait de marennine produit.

3.2 TEMPORAL VARIATION OF BLUE PIGMENT EXTRACT PRODUCTION AND QUALITY IN A FED-BATCH CULTURE OF *HASLEA OSTREARIA*.

Elodie Pedron^{1,2}, J-L Mouget³, Marylise Duperthuy⁴, Annabelle Mathieu-Denoncourt⁴, Céline Laroche⁵, R. Tremblay², J-S. Deschênes², O. Gonçalves¹, A. Massé^{1*}

¹GEPEA, CNRS UMR 6144, Nantes Université, Oniris, Saint-Nazaire, France

²Institut des sciences de la mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, Rimouski, Canada

³Mer-Molécules-Santé, MMS, FR CNRS 3473, IUML, Le Mans Université, Le Mans, France

⁴Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada

⁵ Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, Institut Pascal, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France CNRS, UMR 6602, IP, F-63178 Aubière, France

***Corresponding author:** Elodie Pedron, pedronelodie@gmail.com

Keywords

Haslea ostrearia; Blue pigment, Extracellular marennine; bioactivity; EPS;

Abbreviations

EMn: Extracellular marennine

MPBR: Submerged membrane photobioreactor

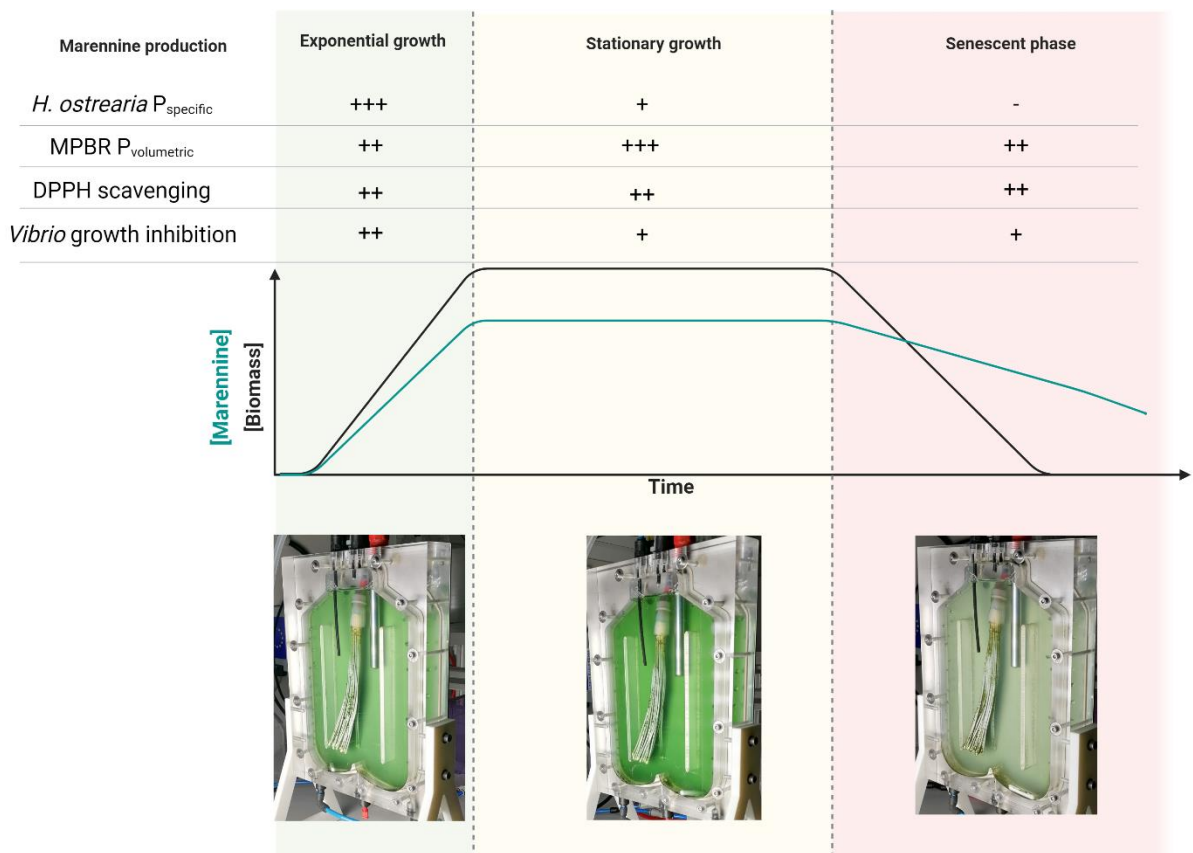
BW : Blue water

EPS : Exopolymeric substances

Highlights

- Accumulation of other metabolites in BW affects bioactivities of the final EMn extract.
- EMn extract quality is optimal when harvested during exponential growth of *Haslea ostrearia*.
- EMn productivity is optimal when reaching the late exponential growth of *Haslea ostrearia*.

Graphical Abstract



Abstract

Marennine is a blue pigment excreted by the pennate diatom *Haslea ostrearia*. It exhibits numerous bioactivities, such as antioxidant and antibacterial properties, which raise research interest. The most common method to obtain an affordable extract of native marennine is a fed-batch culture of *H. ostrearia*, followed by the culture supernatant (blue water containing marennine) harvesting and ultrafiltration. The quality of this extract is likely to vary with *H. ostrearia* cultivation because the composition of blue water changes over time in a fed-batch system. Such evolution could affect the resulting quality of marennine, an impact that has not studied yet. This study aimed to evaluate the extent to which marennine quality fluctuates during the fed-batch culture of *H. ostrearia*. To this end, a laboratory-scale hybrid culture process was used to study the evolution of production quality during the exponential, stationary, and senescence stages of *H. ostrearia*. A comprehensive study using bioassay (DPPH, bacterial growth inhibition) combined with physicochemical analyses (UV-Visible, ATR-FTIR) was conducted to investigate the evolution of marennine quality. The results were analyzed in conjunction with the productivity of the cultivation system and the physiological state of *H. ostrearia* during cultivation. They showed that during the exponential phase, cells reached their maximum specific marennine productivities and that blue water harvested during this culture stage exhibited the most efficient overall bioactivities. The physicochemical study implied that the degradation of bioactivities, occurring during marennine accumulation in a fed-batch culture system, could result from the accumulation of extracellular polymeric substances as well as cell lysate, adversely affecting the final composition of the refined marennine extract. This study provides a starting point for easy-to-manage and affordable marennine production process development. These results imply that MPBR is a suitable approach if biomass is maintained at exponential growth. They also argued that an additional refining step that effectively reduces co-extracts could help ensure consistent quality of the marennine extract produced.

3.2.1 Introduction

Marennine is a water soluble blue pigment synthesized by the pennate diatom *Haslea ostrearia*, and its characterization remained a challenge for more than one century (Gastineau *et al.*, 2014). In the last two decades, Pouvreau *et al.* (2006a), Gastineau *et al.* (2014), and more recently Zebiri *et al.* (2023) and Yusuf *et al.* (2023) have achieved the most significant advances regarding marennine structure. According to these studies, marennine exists in two distinct but very similar forms, intracellular and extracellular. They both present a polydisperse nature, with a mean molecular weight around 10 kDa. Recent studies described marennine as a heteropolysaccharide with a skeleton composed of galactose, xylose, mannose, rhamnose, and fructose (Zebiri *et al.*, 2023), and sulfate group substitutes are also present (Bélanger, *et al. submitted*). The structural origin of the blue color is still undetermined, the most plausible hypothesis regarding the chromophore being a polyphenolic nature (Gastineau *et al.*, 2014 ; Pouvreau *et al.*, 2006a). Despite difficulties encountered in characterising marennine, its numerous bioactivities (antioxidant, antibacterial, antifungal, antiviral, antiproliferative, anticoagulant, and prophylactic effect) (Bergé *et al.*, 1999 ; Bouhlel *et al.*, 2021 ; Falaise *et al.*, 2019a, 2019b ; Gastineau *et al.*, 2014 ; Pouvreau *et al.*, 2008a ; Prasetya *et al.*, 2021 ; Tardy-Laporte *et al.*, 2013 ; Turcotte *et al.*, 2016) continue to raise the interest of researchers, especially in aquaculture, where such a natural compound could be used in bivalve hatcheries and farms. Indeed, in the search for alternative to synthetic antibiotics (Bondad-Reantaso *et al.*, 2023), marennine released in seawater or accumulated on bivalve gills and digestive tube could help reducing locally oxidative stress and bacterial virulence, reducing the yield loss observed in hatcheries (Falaise *et al.*, 2019a ; Latour *et al.*, 2023 ; Turcotte *et al.*, 2016).

To promote the use of marennine, it is necessary to establish a robust and readily accessible production process. To date, research efforts have mainly focused on improving culture systems to increase marennine productivity. Different strategies have been used, open batch and fed-batch systems to produce high volume of culture supernatant (blue water containing marennine) (Turpin *et al.*, 2001), or closed PBR where temperature, pH and light

can be optimised to increase marennine specific productivity of the biomass (Adjout *et al.*, 2022 ; Gastineau *et al.*, 2014 ; Nghiem Xuan *et al.*, 2021). Biofilm and suspended biomass cultivation were also compared regarding marennine productivity improvement (Lebeau *et al.*, 2000 ; Nghiem Xuan *et al.*, 2021 ; Rossignol *et al.*, 2000b), as well as semi-continuous system and hybrid PBR (Gargouch *et al.*, 2022 ; Pedron *et al.*, 2023 ; Prasetya *et al.*, 2022 ; Rossignol *et al.*, 2000a). Semi-continuous harvest of blue water (BW) proved its relevance for *H. ostrearia* cultivation, for which a distinct residence time for BW and biomass allows increasing marennine productivity, by limiting the screening effect. Indeed, self-shading decreases growth irradiance experienced by *H. ostrearia* cells and marennine synthesis (Prasetya *et al.*, 2016). Besides, the feasibility of fed batch culture of *H. ostrearia* over a long period of time (150 days) recently demonstrated by Prasetya *et al.* (2022) combined with the simplification of the harvest of marennine due to the addition of a membrane (Gargouch *et al.*, 2022 ; Pedron *et al.*, 2023 ; Rossignol *et al.*, 2000b) generates a new interest for the possible use of this bioactive pigment in aquaculture, by allowing a simple and robust marennine production.

Furthermore, the focus on improving the productivity of the culture system has neglected the study of the impact of the culture process on the quality of the produced marennine extract. The feasibility of exploiting marennine relies on the availability of readily obtained and affordable extracts, which excludes the use of complete purification process. The most commonly used method to obtain such an extract has been the approach proposed by Pouvreau *et al.* (2006b) consisting of a double ultrafiltration with a cutoff of 30 and 3 kDa to concentrate the blue compound retained in between. However, diatoms are known to produce various and numerous exopolymers (EPS), the quality and quantity of which vary depending on their physiological state. EPS production by *H. ostrearia* has not yet been characterised and the composition of the culture supernatant remains uncertain. The preparation of a double ultrafiltered solution of marennine could likely co-extract other compounds present inside the culture supernatant, and the variability of this solution could negatively impact its quality, with adverse effects on its bioactivity. This aspect has never

been taken into account before, although it is essential for the use of marennine extracts in bivalve's farming.

The present study aims at estimating the extent to which marennine quality could fluctuate along with *H. ostrearia* fed-batch cultivation. To this end, a laboratory-scale hybrid culture process was designed to compare marennine quality between the exponential growth, the stationary growth, and the senescence phase of *H. ostrearia*. The physiological state of cells was monitored using *in vivo* fluorescence of chlorophyll *a* (Chl *a*), and changes in marennine quality with culture time were assessed by comparing its chemical characteristics and antibacterial and antioxidant activity. Data collected will help define the optimal harvest strategy to optimize both productivity and quality of marennine extract.

3.2.2 Materials and methods

Microalgae and culture maintenance

The strain *H. ostrearia* NCC531 was provided by the Nantes Culture Collection (NCC, Nantes University, France). This strain was isolated from Bourgneuf Bay (Loire-Atlantique, France).

A modified Provasoli medium based on natural seawater filtered through a 0.2 μm cut-off capsule (Sartobran® P) was used for strain maintenance. After adjusting the pH to 7.8 using 5 M HCl and dilution of natural seawater to 28 ppt with nanopure water, the seawater was autoclaved and enriched according to Provasoli ES 1/3 (Provasoli *et al.*, 1957) and then sterilized using a 0.2 μm cut-off filtration unit (Sartolab™ P20 Plus). The strains were maintained in 500 mL Erlenmeyer filled with 250 mL of culture, placed at 16°C, and illuminated by white LEDs at 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, following a 14/10 h light/dark cycle, with subculturing every 2 weeks. A month before transfer to MPBR, cells were subcultured every 4 days, to maintain the exponential growth phase at 18°C and illuminated using white LEDs at 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, following a 14/10 h light/dark cycle.

Photobioreactor system

The submerged membrane photobioreactor (MPBR) proposed by Gargouch *et al.* (2022) was used in this study. It is composed of two main elements: a 1L airlift-type culture chamber (vertical flat panel) and a submerged membrane. The algal culture temperature was maintained at 18°C using air conditioning. Light was provided by a white LED panel placed in front of the MPBR, at a distance providing an irradiance of 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and a 14/10h light/dark cycle was applied. The pH was fixed at 7.8 and was adjusted *via* CO₂ injection into the culture chamber, which was regulated by an automated valve. Setpoints were maintained using the LabView interface. The membrane was composed of 40 hollow polyvinylidene fluoride (PVDF) fibers (VMA Industries, France), one end of which was closed. The pore diameter was 0.05 μm with a total surface area of 0.04 m² (Gargouch *et al.*, 2022). Using a peristaltic pump, 100 mL of culture supernatant was harvested daily via filtration and replaced with 100 mL of fresh culture medium. The dilution rate (D , d⁻¹) was calculated as follows:

$$D = \frac{Q}{V_r} \quad (1)$$

with Q the suction rate (mL d⁻¹), and V_r the total volume of culture in the reactor (mL).

Culture supernatant final dilution rate was equal to 0.1 d⁻¹. The residence time of biomass tended toward infinity as it was entirely retained in the reactor by the membranes (excepted for sampling), and the culture volume was maintained constant as semi-continuous filtration of the culture was compensated by the addition of fresh nutritional medium. The culture medium was based on the Provasoli ES 1/3 recipe, although for MPBR cultures, medium was further enriched in nitrate, with a final concentration of $[\text{NaNO}_3] = 0.15 \text{ g L}^{-1}$, and bicarbonate and silica solutions were directly added in the culture chamber every day to reach $[\text{NaHCO}_3] = 0.42 \text{ g L}^{-1}$, $[\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}] = 0.03 \text{ g L}^{-1}$, following a fed-batch strategy as proposed by Nghiem-Xuan (2019) to avoid salt precipitation. Briefly, after adding 100 mL of culture medium enriched in $\text{NaNO}_3 = 0.15 \text{ g L}^{-1}$, 2mL of $[\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}] = 15 \text{ g L}^{-1}$, and 5 mL of $[\text{NaHCO}_3] = 0.84 \text{ g L}^{-1}$ were added daily and directly to the culture.

Extracellular marennine monitoring

Production monitoring

The extracellular marennine (EMn) concentration present in the culture supernatant was determined using the spectrophotometric method proposed by Pouvreau (2006). The culture supernatant was sampled, its absorbance at 669 nm was measured using a JASCO V-630 spectrophotometer, and the concentration of EMn ($\text{mg}_{\text{EMn}} \text{L}^{-1}$) determined according to the Beer-Lambert formula:

$$[\text{EMn}] = \frac{A}{\varepsilon * l} * M \quad (2)$$

with A the absorbance measurement at 669 nm, ε the molar extinction coefficient of EMn determined by Pouvreau (2006) ($\varepsilon = 12 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$), l the length of the optical path in the cell (cm), and EMn molar mass as provided by Pouvreau (2006) ($M = 9893 \text{ g mol}^{-1}$). Each absorbance measurement was performed in triplicate.

Volumetric (P_v) and EMn productivity were calculated according to the formulas proposed by Gargouch *et al.* (2022) :

$$P_v = [\text{EMn}] * D \quad (3)$$

with $[\text{EMn}]$ the EMn concentration inside the culture chamber (mg L^{-1}), D the dilution rate applied to the culture (d^{-1}).

The production rate of EMn within the culture (R_{EMn} , $\text{mg}_{\text{EMn}}\text{d}^{-1}$) was calculated to estimate the daily quantity of marennine *de novo* accumulated inside the supernatant and used to estimate the daily EMn specific production rate of the biomass (R_{cell} , $\text{mg}_{\text{EMn}} 10^6 \text{cell}^{-1} \text{d}^{-1}$):

$$R_{\text{EMn}} = ([\text{EMn}]_{n-1} - [\text{EMn}]_n) * V + [\text{EMn}]_{n-1} * V * D \quad (4)$$

$$R_{\text{cell}} = \frac{R_{\text{EMn}}}{N * V} \quad (5)$$

Refining of culture supernatants

The culture supernatants collected through daily filtration during MPBR cultures were filtered using a 0.2 µm cut-off filtration unit (Sartolab™ P20 Plus) before being stored at 4°C and in the dark. They were then pre-concentrated *via* ultrafiltration at a cutoff of 3 kDa (P = 22 psi), until the volume reduction factor outreached 10X. The resulting extracts (retentate) were stored at -20°C in the dark.

Further refining was performed according to the double ultrafiltration approach proposed by Pouvreau *et al.* (2006b), as it remains to date the most cost efficient way to obtain marennine extracts in the form of a « bue water » supernatant (BW) recoverable as antimicrobials in aquaculture (Falaise *et al.*, 2019b). Diafiltration and further concentration were realized on a 1-kDa cutoff membrane using nanopure water (P = 50 psi) until salinity reached 0 ppt. The desalted retentates were ultrafiltered on a 30-kDa cutoff membrane (P = 50 psi). Approximately 50 mL of each BW were obtained, corresponding to the intermediate fraction of the initial culture supernatant (30-3 kDa), and the samples were stored at 4°C in the dark until further analysis. For the antioxidant activity bioassay, 15 mL of BW was freeze-dried and solubilized in 1 mL of nanopure water to increase the concentration of the tested samples.

All ultrafiltration and diafiltration steps were performed, at 20°C, in AMICON® 400-mL stirred cells connected to a nitrogen flow and using Ultracel® membranes.

Biomass monitoring

Daily, an hour after the beginning of the light cycle, two samples of the culture were collected. First, 7 mL of culture were collected, and a complete mechanical homogenization was conducted using a magnet bar in the reactor to ensure the uniformity of the culture and to resuspend any settled biomass. Then, a second 7-mL sample was collected. The sample obtained before homogenization corresponds to the fraction of cells in suspension and is referred to as the pelagic sample, whereas the sample obtained after complete homogenisation of the culture corresponds to the total biomass sample.

Growth modelling

Two indicators were used to monitor biomass. The cell density (cell L⁻¹) of the culture was determined by the Nageotte cell count (Marienfeld, AQRA, India) as follows:

$$N = \frac{n}{V} \quad (6)$$

with n the number of cells, V is the volume corresponding to the number of lines used for counting, knowing that one strip corresponds to a volume of 1.25 µL. All counts were performed in triplicate with 300 +/- 50 cells, at three random locations in the counting chamber.

Chlorophyll *a* concentration ([Chl_a] (µg mL⁻¹)) was used as a second biomass indicator and obtained following pigment extraction from both pelagic and total biomass sampling (detailed extraction method below)

The Gompertz model was used to fit daily cell density data to obtain growth parameters of each culture phase using R software R-4.3.

$$Y = A * e^{(-e^{(-\mu_{\max} * (X - X_c)})} \quad (7)$$

with Y, biomass concentration depending on the biomass indicator used (N 10⁶ cell L⁻¹ or [Chl_a] µg mL⁻¹), A, maximum biomass concentration reached (N_{max} 10⁶ cell L⁻¹ or [Chl_a]_{max} µg mL⁻¹), µ_{max} maximal growth rate (d⁻¹), X_c, midpoint of the exponential phase (d), and X, day of culture (d). Data were transformed using natural logarithms, and the initial biomass was calculated as X = 1 d, N = 100 10⁶ cell L⁻¹, and [Chl_a] = 244 µg mL⁻¹.

Pigment analysis

Pigment composition and quantification of sampled biomass were performed according to Ritchie (2008) for both pelagic and total biomass sampling. Briefly, 1.5-mL aliquots of sample were centrifuged at 12,000 g for 15 minutes. The resulting pellets were resuspended in 1.5 mL of a 90% acetone solution and homogenized by sonication. Extraction occurred in the dark for 3 h at 4°C, followed by another 15 minutes of centrifugation at 2400 g. The

resulting supernatants were analyzed by visible-light spectrophotometry (JASCO V-630 spectrophotometer). Absorbances at 480, 630, 645, 665, and 750 nm were measured, and pigments concentrations were calculated according to the following formulas (Caspers, 1970 ; Ritchie, 2008):

$$[\text{Chl}_a] = (-0,3002 * (A_{630} - A_{750}) - 1,7538 * (A_{645} - A_{750}) + 11,9092 * (A_{665} - A_{750})) * \frac{V_{\text{acetone}}}{V_{\text{sample}}} * l \quad (8)$$

$$[\text{CarT}] = (4 * (A_{480} - A_{750})) * \frac{V_{\text{acetone}}}{V_{\text{sample}}} * l \quad (9)$$

$$P_{\text{spe}}^T = \frac{[\text{Chl}_a] + [\text{CarT}] * 10^3}{N} \quad (10)$$

with A_λ : sample absorbance at the given wavelength (λ), V_{acetone} : volume of acetone used for pigment extraction (mL), V_{sample} : volume of initial sample (mL), l = length of the optical path (cm), $[\text{Chl}_a]$ and $[\text{CarT}]$ respectively, chlorophyll a ($\mu\text{g mL}^{-1}$), total carotenoids concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$), and P_{spe}^T the total specific pigment content ($\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$).

Photosynthetic parameters

From the pelagic daily sample, 2 mL of culture were used for photosynthetic parameter estimation using a Water-PAM fluorometer (cuvette version, Walz GmbH, Effeltrich, Germany). The sample was first dark-adapted for 15 minutes and then introduced into a 10-mm quartz glass cuvette of the PAM fluorometer, which was controlled using WinControl-3 software. The maximum PSII quantum efficiency (F_v/F_m) was measured using a 600-ms saturating pulse ($2500 \mu\text{mol photons.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$):

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m} \quad (11)$$

with F_0 , the minimum fluorescence yield of dark-adapted cells, F_m , the maximum fluorescence yield of dark-adapted cells during the saturating flash, and F_v ($= F_m - F_0$), the variable fluorescence.

To provide detailed information on the overall photosynthetic performance of microalgae, photosynthesis/light (P/E) curves were constructed using nine 30-s incremental

irradiance steps (0, 75, 109, 165, 245, 346, 479, 773, 1127 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and calculating the relative electron transport rate (rETR, Eq 9) through PSII for each level of actinic irradiance:

$$\frac{F_q'}{F_m'} = \frac{F_m' - F'}{F_m'} \quad (12)$$

$$\text{rETR} = \frac{F_q'}{F_m'} * \frac{\text{PAR}}{2} \quad (13)$$

where PAR is the actinic irradiance level (= Photosynthetic Active Radiation from 400 to 700 nm), F_q'/F_m' , F_q' , F' , F_m' , are the effective quantum yield of PSII, the variable fluorescence, the fluorescence, and the maximum fluorescence intensity in the light at a given PAR intensity, respectively, and 2 is a division factor based on the assumption that half of the absorbed quanta are equally distributed between PSI and PSII.

The Michaelis-Menten equation was used to model the P/E curve rETR as a function of PAR, using R software R-4.3:

$$\text{rETR} = \frac{\text{rETR}_{\text{max}} * \text{PAR}}{E_m + \text{PAR}} \quad (14)$$

The P/E curve enabled the estimation of the effective quantum efficiency of the culture at growth irradiance, $F_q'/F_m'_{200}$, used as a proxy for the photosynthetic state inside the culture chamber.

Bioactivity analysis

Antibacterial activity

Vibrio splendidus 4D1-8 was selected for its growth inhibition response to marennine extract (Falaise *et al.*, 2019b). Strains were supplied by the Laboratoire de biologie intégrative des modèles marins (LBI2M) (Station biologique de Roscoff, France) and was isolated from oyster tissues, *V. splendidus* 4D1-8 showing moderate virulence against them (Oyanedel *et al.*, 2020).

Vibrio strain was maintained at -80°C in 20% glycerol. Broth cultures were prepared with autoclaved, cation-adjusted, LB broth media by the addition of 2% NaCl (LB 2%NaCl) (10 mg mL^{-1} tryptone (Termo FisherTM), 5 mg mL^{-1} yeast extract (Thermo FisherTM), 20 mg mL^{-1} NaCl) and strains were isolated on LB-2% NaCl-1.2% agar media (LBA 2% NaCl) from the -80°C . Plates containing the isolated colonies were kept at room temperature for no more than a week. Before the test, three different colonies per Petri dish (biological replicates, $n=3$) were inoculated in 5 mL LB 2% NaCl and grown overnight at room temperature (20°C) under moderate agitation (130 rpm). The next day, $100\ \mu\text{L}$ of the bacterial suspension was transferred into 5 mL of LB 2% NaCl and incubated at 20°C with agitation until the bacterial suspension reached an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 2. This inoculum was subcultured 2 h before the antibacterial response test to ensure that the inoculum was growing exponentially. Right before inoculation of the 96-wells microplate, $1\ \mu\text{L}$ of the inoculum was subculture in 14 mL of three times concentrated LB 2% NaCl (3xLB 2% NaCl) culture medium, to obtain an inoculum of OD_{600} of 0.0001. *Vibrio splendidus* was exposed to a series of the tested extracts (dilution carried with 3xLB 2% NaCl). Antibacterial activity was evaluated in a 96-wells microplate in which $25\ \mu\text{L}$ of inoculum were added to $75\ \mu\text{L}$ of tested marennine extract. Each concentration was tested in technical triplicates, and a blank was prepared with $25\ \mu\text{L}$ of 3xLB 2% NaCl and $75\ \mu\text{L}$ of the corresponding dilution of BW. Bacteria were incubated at 20°C with 160 rpm agitation for 24 h, after which the level of growth was assessed by measuring the absorbance at 600 nm (SpectraMax ID3 plate reader). The growth inhibition (%) of *V. splendidus* is estimated from the following equation:

$$\text{Growth inhibition} = \frac{(\text{Abs}_t - \text{Abs}_{\text{LB}}) - (\text{Abs}_i - \text{Abs}_{\text{EMn}})}{(\text{Abs}_t - \text{Abs}_{\text{LB}})} \quad (15)$$

with Abs_t the absorbance at 600 nm of the well containing $100\ \mu\text{L}$ the *V. splendidus* strain culture, Abs_{LB} the absorbance at 600 nm of well containing $100\ \mu\text{L}$ LB medium, Abs_i the absorbance at 600 nm of the well containing the *V. splendidus* exposed to a concentration of marennine extract, Abs_{EMn} the absorbance at 600 nm of the well containing non-inoculated LB culture medium and the corresponding solution of BW.

Bacterial growth inhibition results were modeled as a dose-response curve following a four-parameter logarithmic function using the "drda" package and R software R-4.3. Each extract was tested three times with three different clones (n=3) and the results of each test were modeled separately.

Antioxidant activity

The DPPH· (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) scavenging assay of EMn was performed using a Dojindo DPPH assay kit, according to the method reported of Shimamura *et al.* (2014) adapted to marennine extract at all purification levels, to facilitate future comparisons. The initial DPPH solution (0.2 mM) was diluted 5-fold (0.04 mM) to make the activity detectable within our low concentration range of BW ([EMn] maximum concentration reaching 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, dilution carried with nanopure water). As proposed by Gang *et al.* (2021), the 99% ethanol used to prepare the DPPH solution was replaced by a 70% ethanol solution, which is more suitable for saline extracts. For each microplate, the antioxidant capacity of a positive control, the antioxidant Trolox ([Trolox] maximal concentration reaching 8.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), was also tested to ensure the reliability of the DPPH solution used.

After 20 μL of the tested sample, BW or Trolox solution, 80 μL of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.4), and 100 μL of the DPPH solution (0.04 mM) were added to the microplate wells. After completing the microplate, the plate was shaken for 30 s and left at room temperature in the dark for 30 minutes, after which the absorbance of the solution at 517 nm was measured (SpectraMax® 190 microplate reader). On each microplate, a mixed solution of 120 μL of ethanol and 80 μL of Tris-HCl buffer was used as the blank for the Trolox, 100 μL of ethanol and 20 μL of nanopure water, and 80 μL of Tris-HCl buffer were used as the blank for the absence of marennine, and as the marennine absorbed near 517 nm, 100 μL of ethanol and 20 μL of BW solution at each tested concentration, and 80 μL of Tris-HCl buffer were used as the blank for BW. The absorbance at the addition of the tested sample was expressed as A_s , the absorbance at the addition of the corresponding blank as A_c , and the inhibition ratio (%) was obtained using the following equation:

$$\text{DPPH inhibition} = \frac{A_c - A_s}{A_c} * 100 \quad (16)$$

Spectral analysis

A Bruker Tensor 27 spectrometer equipped with a HTSXT plate reader module, an RT-DLaTGS deuterated triglycine sulphate detector and OpusLab v 7.0.122 software (Bruker Optics, Germany) was used for the Attenuated total reflectance - Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) spectra acquisition. Infrared spectra were recorded in transmission mode, using freeze-dried extracts deposited directly on the spectrometer objective. Spectral resolution was set at 1 cm^{-1} , with 32 scans. Absorbance spectra were collected between 4000 cm^{-1} and 400 cm^{-1} , and the aperture diameter of the microplate reader was set at 3 mm. Background spectra were collected using the same instrument settings as those used for the samples.

For UV-Visible (UV-Vis) spectral acquisition, a Cary 100 spectrophotometer (Agilent/Varian, Santa Clara, CA, USA) combined with Varian WinUV software (version 3.00) was used. UV-Vis samples were analyzed at 24°C in quartz cuvettes.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the XLSTAT software. EMn specific and volumetric productivities, specific chloroplast pigment concentrations, and effective quantum yield of PSII evolution over 34 days of culture were analyzed through the mean of 5 consecutive days using one-way ANOVA. The normality of distributions and homoscedasticity of variances were tested beforehand using the Shapiro-Wilk and Levene tests. When differences were detected, Fisher's LSD multiple-comparison test were used to deduce which values were significantly different. Significance of differences was defined at $p < 0.05$. The replication unit was the number of days in each phase.

For the antibacterial bioactivity assay, the concentration of sample needed to inhibit 20% of bacterial growth (IC20) was computed by modeling growth inhibition (%) versus sample concentration for each clone tested ($n=3$). Comparison was made based on IC20 instead of IC50 because the amount of marennine extracts available did not permit

experimentally reaching 50% bacterial growth inhibition for all the three lots tested. Statistical analyses were conducted using XLSTAT. One-way ANOVA was used to analyze differences in IC20 according to the BW lot tested. Significant differences at $P < 0.05$ between mean IC20 were determined using Fisher LSD's multiple comparison test.

For the antioxidant assay, the difference in bioactivity efficiency of the three BWs tested was analyzed by a two-way ANCOVA to determine the significance of the qualitative factor BW batch considering the linear dose-response relation between antioxidant activity and EMn concentration at the tested concentrations.

All statistical results are presented in supplementary materials.

3.2.3 Results

Culture monitoring in MPBR

Monitoring of marennine production

Over 34 days of culture in MPBR EMn productivities were not consistent (Figure 3.1). During the first 14 days of culture, the EMn cellular production rate, R_{cell} , was the highest, with a mean of $7.3 \pm 2.6 \text{ mg}_{\text{EMn}} 10^6 \text{ cell}^{-1} \text{ d}^{-1}$ and a maximum of $12.4 \pm 1.7 \text{ mg}_{\text{EMn}} 10^6 \text{ cell}^{-1} \text{ d}^{-1}$. The first 14 days were characterized by the accumulation of marennine in the culture, *H. ostrearia* cells producing more EMn than harvested with a filtration rate at 0.1 d^{-1} . This resulted in a net accumulation, which increased the EMn volumetric productivities of the MPBR. Consequently, P_v continuously increased, leveling off at $2.1 \pm 0.1 \text{ mg}_{\text{EMn}} \text{ d}^{-1}$ for few days, from day 15 to day 21, when R_{cell} also stabilized at $3.1 \pm 0.8 \text{ mg}_{\text{EMn}} 10^6 \text{ cell}^{-1} \text{ d}^{-1}$. The EMn concentration in the culture was then maximized at $21.2 \pm 0.7 \text{ mg}_{\text{EMn}} \text{ L}^{-1}$. A change in the pattern was then observed, starting on day 22 to day 34, when R_{cell} showed virtually no *de novo* EMn production. Resulting from the cessation of marennine production, P_v decreased constantly as early as day 25 and P_c ceased to significantly increase at a maximum of $46.1 \pm 0.4 \text{ mg}$ of EMn harvested (Figure S. 5)

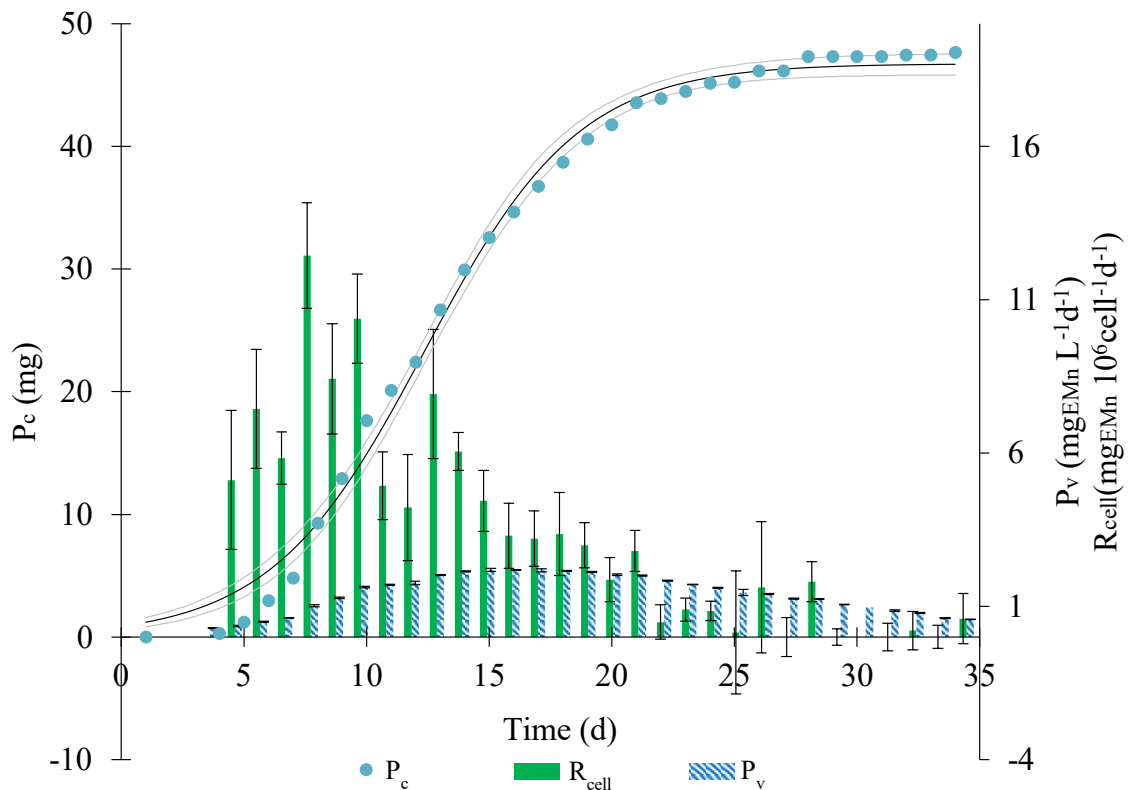


Figure 3.1: Evolution of marennine production in *H. ostrearia* NCC 531 MPBR culture ($D=0.1d^{-1}$). EMn volumetric productivity of MPBR P_v ($mg_{EMn}L^{-1}d^{-1}$) in lined green bars, represented as mean \pm standard error ($n=3$), specific EMn gross production inside the culture, R_{EMn} ($mg_{EMn}10^6cell^{-1}L^{-1}d^{-1}$) in plain blue bars represented as calculated value \pm 95% uncertainty, cumulative EMn production (P_c) (mg) in blue dots represented as calculated value \pm 95% uncertainty ($R^2=0.99$).

Population evolution in MPBR

Following the evolution of *H. ostrearia* population in the MPBR through the evolution of both biomass indicators, the three main stages of a fed-batch culture were observed: the exponential stage, followed by the stationary stage, and then the senescent stage. According to both biomass indicators, N and [Chl_a] (Figure 3.2, Table S 12), *H. ostrearia* population reached half of its exponential growth phase on day 5 and started its stationary phase on the 15th day. The stationary phase appears more consistent following changing in [Chl_a] as compared in the change in N, which show a pseudo-stationary phase with a higher day-to-

day variability. Starting on day 25, a regular decrease in [Chl_a] was observed until the end of the culture, followed by a decrease in cell concentration, with a lag of almost 10 days, which marked the entrance into the senescent stage of the culture (Figure 3.2).

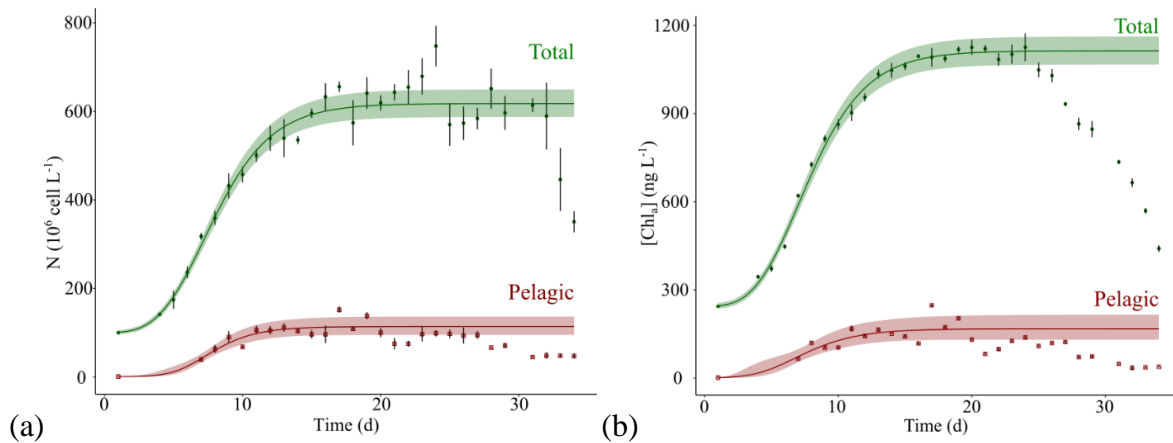


Figure 3.2 : Growth curves measured for *H. ostrearia* NCC 531 using a Gompertz model to fit two biomass indicators evolutions along time. The biomass indicators used were (a) cell concentration (N , 10^6 cell L^{-1} , with initial $N = 100 \cdot 10^6$ cell L^{-1}), estimated by cell count ($n=3$), as function of time (d) and (b) chlorophyll a concentration ($[Chl_a]$, $ng L^{-1}$, with initial $[Chl_a]=244$ $ng L^{-1}$), as function of time. All measurements were performed daily in triplicate ($n=3$) before and after culture homogenization, to sample the pelagic phase (pelagic) and total biomass (total). Dots represent experimental points \pm SD, and lines correspond to Gompertz modeling done on the 20 first days of culture \pm 95% uncertainty ($R^2_{N\ total}=0.99$; $R^2_{N\ pelagic}=0.98$; $R^2_{[Chl_a]\ total}=0.99$; $R^2_{[Chl_a]\ pelagic}=0.97$)

Regarding the pelagic compartment of the culture, its monitoring revealed a biomass leveling off around the 12th day of culture, which represented approximately 1/6th of the total biomass (Figure 3.2). Although it did not display a true stationary phase, but rather an oscillation pattern that was noticeable with either of the two biomass indicators. By the end of the stationary phase, observed with the total biomass, a change of pattern was noticed at the pelagic level too, illustrated by a decrease of $[Chl_a]$ and N as early as day 20, implying a lower ratio of living cells resuspended in the water column.

Physiological state monitoring

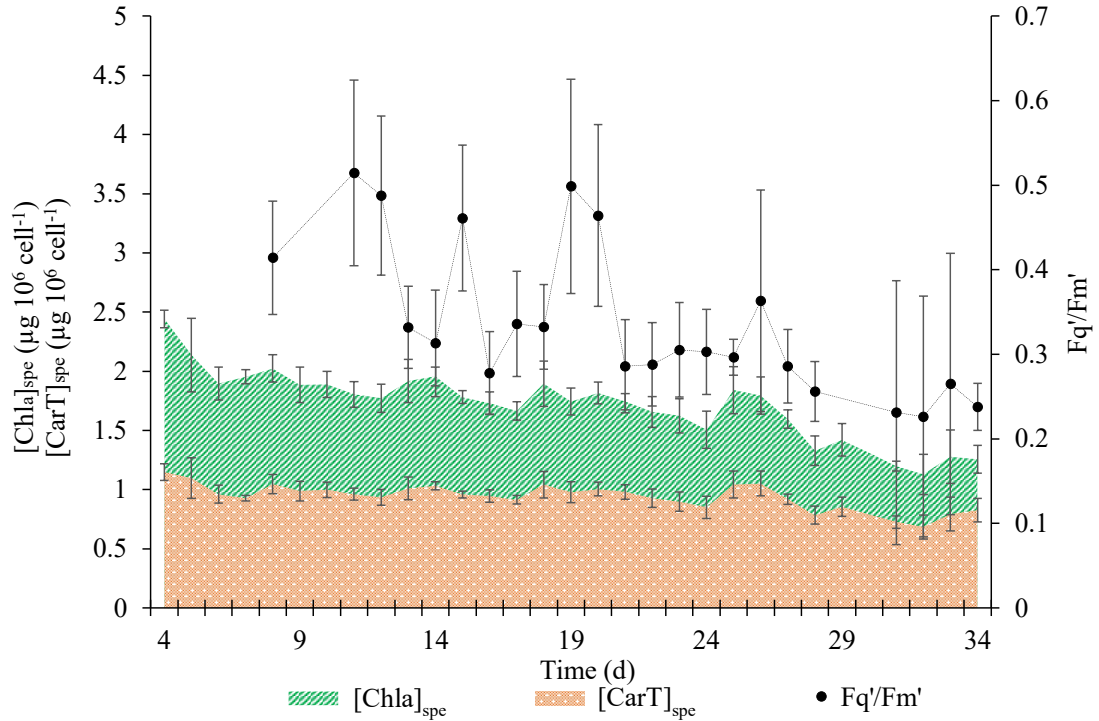


Figure 3.3 : Physiological profile of *H. ostrearia* cells along its cultivation in MPBR. Physiological parameters are [Chl_a]_{spe}, the specific Chl_a concentration of cells of the total biomass (lined green area, $\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$), [CarT]_{spe}, the specific total carotenoid content of cells in the total biomass (dotted orange area, $\mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$). All values are presented as mean \pm SD of $n=3$. The last physiological parameter is F_q'/F_m' , effective quantum yield of PSII at growth irradiance measured for pelagic biomass (for PAR = $200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) (plain black dots, arbitrary units). Values were estimated from the daily measured P/E curve \pm SE.

The physiological state of *H. ostrearia* cells was monitored daily *via* analysis of pigment composition (Figure 3.3, Table S 13). To better visualize changes in the physiological profiles, five successive days of each stage were statistically analyzed, after verification of normality. From the total biomass sample, the cell pigment content appeared to be stable during the exponential phase and the early stationary phase, with cells displaying a pigment contents of $2.9 \pm 0.1 \cdot 10^{-9}$ and $2.7 \pm 0.2 \cdot 10^{-9} \mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$, respectively. The pigment content of the total cell population started to decrease in the late stationary phase, reaching a mean pigment content of $2.6 \pm 0.1 \cdot 10^{-9} \mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$, and then finally drop to $2.0 \pm 0.1 \cdot 10^{-9} \mu\text{g } 10^6 \text{ cell}^{-1}$ at the end of the culture. This progressive decrease was observed for both Chl_a

and CarT specific content (Table S 13), with $[\text{Chl}_a]_{\text{spe}}$ decreasing more rapidly as a significant increase in CarT/Chl_a was observed from $0.53 \pm 0.00 \cdot 10^{-9}$ in the exponential growth phase to $0.63 \pm 0.02 \cdot 10^{-9} \mu\text{g} \cdot 10^6 \text{cell}^{-1}$ at the end of the culture.

The pelagic phase showed a similar evolution of the total cell pigment content (Table S 13), but qualitatively, differences were sharpened, with a decrease in specific Chl_a content clearly visible at the late stationary phase. In parallel, the balance between $[\text{CarT}]_{\text{spe}}$ and $[\text{Chl}_a]_{\text{spe}}$ significantly changed during the second half of the stationary phase, with $[\text{CarT}]_{\text{spe}}$ increasing and $[\text{Chl}_a]_{\text{spe}}$ decreasing. The cellular pigment content was significantly lower in pelagic cells than the mean cellular content measured with the total biomass sample. Complementing the pigment content monitoring, the evolution of the effective photosynthetic capacity F_q'/F_m' of cells in suspension in MPBR culture was monitored. A great variability between two consecutive days was observed, yet two distinct patterns were identified, one before and one after day 20. Before day 20, the effective photosynthetic yield F_q'/F_m' at growth irradiance, measured at $200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, appeared to be highly variable from one day to the next, with a mean value of 0.40 ± 0.09 (a.u.). After day 20, a small and regular decrease in F_q'/F_m' was observed, reaching 0.28 ± 0.04 (a.u.), implying a progressive degradation of the algal photosynthetic apparatus of the resuspended biomass.

Blue water quality

Polydispersity distribution

During 34 days, the BW of culture was harvested daily by filtration at a rate of 100 mL d^{-1} and the samples were separated in three lots corresponding to the three growth stages of the population described above, exponential, stationary, and senescent stage. The first lot corresponded to the harvest from day 4 to day 14 (BW1). The second lot was harvested from day 15 to day 26 (BW2). Finally, the last lot corresponded to the culture supernatant harvested from day 27 until the end of the culture on day 34 (BW3). Before the further refining step, the three BW lots were concentrated on a 3-kDa ultrafiltration membrane (see Material and Methods section). During this preconcentration step, the retention yield was

calculated from the chromophore absorptivity in the initial BW and the concentrated BW. Interestingly, when 75% and 74% of EMn were recovered in the concentrated BW2 and BW3, respectively, only 33% was retained by the 3-kDa membrane for BW1, implying that the apparent mean EMn molecular weight tended to increase with its production in MPBR. These differences in retention behavior prevented the recovery of the same EMn quantities for BW1, as illustrated by the concentration factor (Table 3.1).

Table 3.1 : Preconcentration ultrafiltration of the culture supernatant (Blue Water; BW), over a 3-kDa membrane, using an AMICON cell (P = 1.5bar, stirring = 250 rpm). VRF volumetric reduction factor during ultrafiltration of BW on a 3-kDa cutoff membrane, CF_{EMn} , concentration factor of EMn according to the maximum absorbance in the visible spectra of the solution.

| Lots | Harvesting stage | VRF | CF_{EMn} | Initial BW | | Concentrated BW | |
|------|------------------|------|------------|------------|----------------|-----------------|----------------|
| | | | | pH | Salinity (ppt) | pH | Salinity (ppt) |
| BW1 | Exponential | 13 X | 4 X | 7.4 | 29 | 7.7 | 29 |
| BW2 | Stationary | 11 X | 9 X | 7.6 | 30 | 7.7 | 30 |
| BW3 | Senescent | 11 X | 8 X | 7.5 | 30 | 7.5 | 31 |

Spectral analysis

To study further possible changes in BW quality with culture time, a sample of each BW lot, after double ultrafiltration (see Material and Methods), was freeze-dried and analyzed by ATR-FTIR (Figure 3.4a). The level of purification of BW prevented complete characterization but several polysaccharide characteristic bounds (Table S 14) observed in microalgae exopolysaccharides (Bélangier *et al.*, 2020 ; Borjas Esqueda *et al.*, 2022 ; Sanniyasi *et al.*, 2022) were identified, allowing us to differentiate the three lots. All three extracts displayed characteristic polysaccharide bands, with the broad band around 3300 cm^{-1} corresponding to O-H stretching, associated with the band observed around 1100 cm^{-1} and 1040 cm^{-1} assigned to C-O-C and C-C liaisons of the pyranose stretching, respectively. BW1 displayed some dissimilarities, with some peaks standing out compared to BW2 and BW3 spectra, particularly one around 2924 cm^{-1} , associated with the CH_2 stretching, and another at 858 cm^{-1} associated to a glycosidic linkage in the polymer. The band at 1424 cm^{-1} ,

previously associated to COO-, also discriminated BW1, providing information on the nature of polymer substituents found in the mixture and their relative amounts. Eventually, the relative absorbance of the band around 1543 cm⁻¹ compared to the one at 1100 cm⁻¹ band appeared to differentiate most BW1 from both BW2 and BW3, and this could have resulted from the relatively more important presence of secondary amide groups in the two last lots.

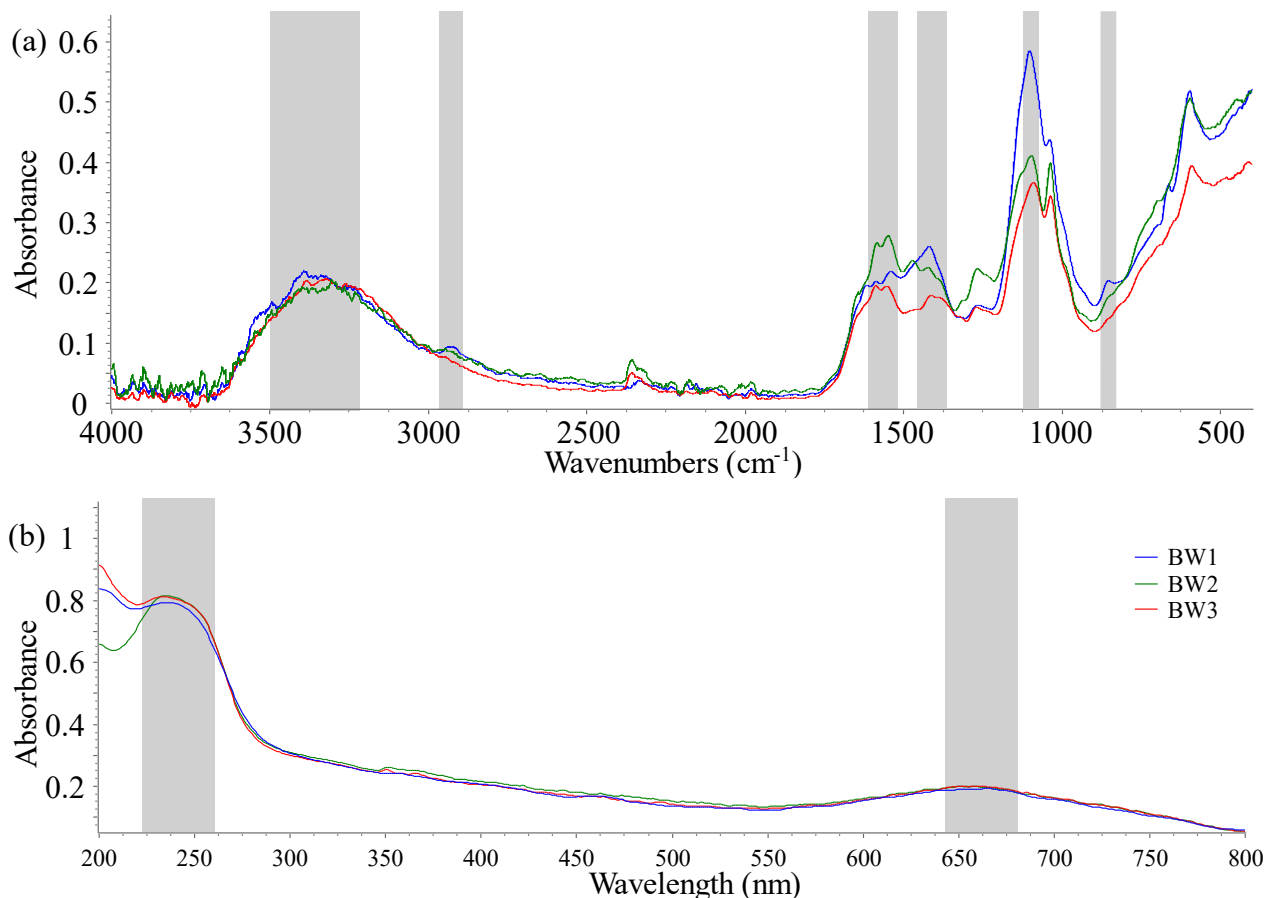


Figure 3.4 : Absorption spectra of the marennine extracts produced by *H. ostrearia*, harvested during exponential, stationary and senescent phase of its culture in fed-batch, in MPBR ($D=0.1 \text{ d}^{-1}$). (a)ATR-FTIR and (b)UV-Visible spectrum of marennine extracts harvested at three distinct stages of *H. ostrearia* NCC531 MPBR culture. The extracts correspond to the blue water intermediate fraction obtained by double ultrafiltration and diafiltration at 30- and 3-kDa cutoffs, respectively, as proposed by Pouvreau *et al.* (2006b).

In the UV-Visible spectrum (Figure 3.4b), no significant difference was observed. All three lots had a maximal absorbance in the 660 nm region, corresponding to the absorbance

of the chromophore. The characteristic band around 230 nm was observed, and no difference in 230/660 absorbance ratio was noticed from one BW lot and another. The absence of a distinct absorbance band around 322 nm, characteristic of the purified EMn (Pouvreau *et al.*, 2006a), is not surprising considering the low selectivity enabled by double ultrafiltration, which results in incomplete purification.

Blue Water bioactivities

BW1 displayed a significantly higher potency to inhibit the development of *V. splendidus* 4D1-8, and 20% growth inhibition was achieved at 5.5 ± 0.3 mg EMn L⁻¹ (Figure 3.5a). BW2 and BW3 displayed a halved efficiency, reaching 20% bacterial growth inhibition at 11.9 ± 0.6 and 15.5 ± 0.4 mg EMn L⁻¹ respectively (ANOVA, $p=0.003$, Table S 15).

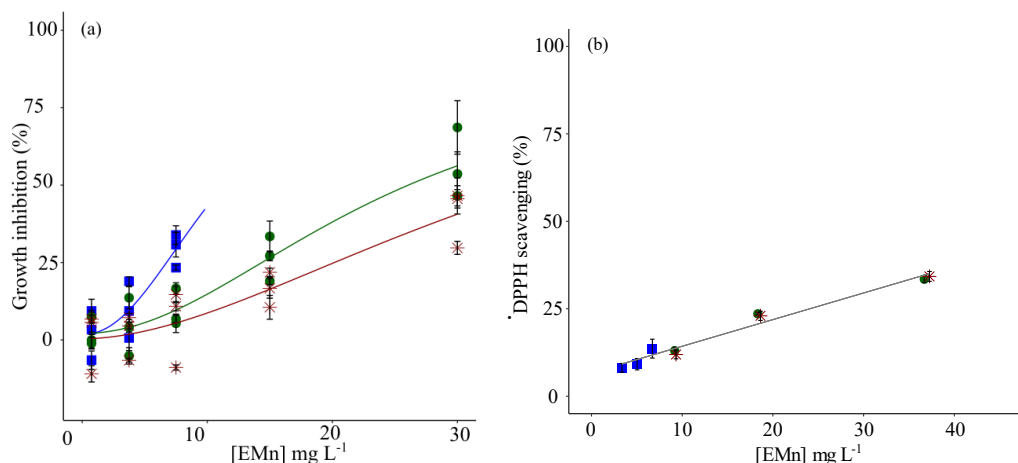


Figure 3.5 : Bioactivity of marennine extracts harvested at three distinct stages of *H. ostrearia* NCC531 MPBR culture. (a) Dose-response curves of *V. splendidus* 4D1-8 exposed to a concentration range (mg L⁻¹) of marennine extract [EMn] over 24h exposition. Each value represents the mean \pm standard deviation of ($n=3$), and three clones of the *Vibrio* strain were exposed to each extract. $R^2_{\text{exponential}} = 0.77$, $R^2_{\text{stationary}} = 0.90$, $R^2_{\text{end}} = 0.79$. (b) Dose-response linear regression of DPPH radicals exposed to a concentration range (mg L⁻¹) of marennine extract [EMn]. $R^2=0.97$. Each value represents the mean \pm standard deviation of ($n=3$). For both A and B figure, marennine extracts obtained from BW1 in blue (square), BW2 in green (circle), and BW3 in red (cross). The extracts correspond to the blue water intermediate fraction obtained by double ultrafiltration and diafiltration at 30- and 3-kDa cutoffs, respectively, as proposed by Pouvreau *et al.* (2006b).

Regarding DPPH scavenging ability, no difference was observed between the three BW lots. As observed in Figure 3.5b, the harvest time of the lots did not induce significant differences to the linear dose-response curve and the EMn concentration was the only significant factor of the scavenging response (ANCOVA, $R^2 = 0.97$, $p = 0.009$, Table S 16). As illustrated in Figure 3.5b, 20% of the DPPH radicals were scavenged by BW produced when the EMn concentration reached 19 mg L^{-1} , regardless of the harvesting period.

3.2.4 Discussion

When cultivated in batch mode, and to a lesser extent in fed-batch mode, microorganism physiology changes with time, which, in turn, induces changes in medium or supernatant composition (Martinho De Brito *et al.*, 2023 ; Myklestad *et al.*, 1989 ; Myklestad et Haug, 1972). Growth of microorganisms in batch culture can be extensively differentiated in seven phases, from the initial stationary phase and lag phase to the logarithmic growth and deceleration growth phase, then reaching a maximum stationary phase and finally the stage of accelerated senescent to the exponential senescent phase (Wanner et Egli, 1990). These growth phases can be simplified to three main stages: exponential growth, stationary growth, and senescent stage, all observed in *H. ostrearia* cultures maintained under volume-steady fed-batch conditions. The entrance into the stationary phase, *ca.* day 15, was marked by a stabilisation of the biomass concentration. Light and nutrient limitation did not change the total pigment content of cells but it affected its composition with a significant increase in the CarT/Chl_a ratio, a result in accordance with previous studies (Brembu *et al.*, 2017 ; Brunet *et al.*, 2011 ; Latasa et Berdalet, 1994 ; Robert *et al.*, 2002). This evolution is confirmed when monitoring the pelagic phase, with the change of pattern of PSII effective quantum yield *ca.* day 20. During the first 20 days of culture, the oscillations in F_q'/F_m' values implied regular renewal of the biomass, with an oscillating proportion of living cells resuspended. After day 20 the F_q'/F_m' low plateau is likely to result from a halt in the renewal of biomass. Finally, the senescent phase is illustrated by the drop in the biomass concentration starting *ca.* day 25 (Robert *et al.*, 2002).

Diatoms are known to produce extracellular polymeric substances (EPS) (Shnyukova et Zolotariova, 2015), which composition, structure, and productivity are influenced by the physiological state of the producing microorganisms. Physiological state is impacted by many environmental factors, such as growth irradiance level and quality, temperature, nutrient availability (Laroche, 2022 ; Shnyukova et Zolotariova, 2015 ; Underwood *et al.*, 2004), which notably induce EPS production variability along growth phases of culture (Martinho De Brito *et al.*, 2023 ; Myklestad et Haug, 1972). Structurally and functionally, extracellular marennine (EMn) can be assimilated to EPS produced by *H. ostrearia*, and as observed over the 34 days of culture EMn productivity and quality did change with the growth phases of culture.

Regarding EMn productivities the present results are in agreement with a previous observation in batch culture (Robert *et al.*, 2002). During the exponential phase of growth, the highest specific EMn productivity is reached, yet no correlation between EMn production and biomass increase can be observed. This is in agreement with the hypothesis of marennine being a product of the primary carbon metabolism, as its synthesis is driven by growth irradiance and is decreased or stopped when light and nutrient become limiting (Robert *et al.*, 2002). During stationary growth, a lack of nutrients occurred (Table S 17), and the accumulation of marennine created a shaded environment. If the volumetric productivity of the MPBR is at its maximum, the specific EMn productivity of *H. ostrearia* biomass decreased and stabilized for few days. The nutrient limitation did not upregulate EMn production, but rather maintained it to a basal level supporting the hypothesis that EMn is not a secondary metabolite. Eventually, during the senescent phase, no EMn accumulated in the supernatant, and the observed volumetric productivity of the MPBR resulted from the harvest of EMn accumulated during the two previous growth phases. Under the culture conditions used in this study, phosphorus (P) was the first limiting factor (Gargouch *et al.*, 2022 ; Nghiem Xuan *et al.*, 2021 ; Turpin *et al.*, 1999) (Table S 17). Essential component for living organisms, P is found in DNA and RNA and is involved in energy transfer as a component of ATP and NADPH (Brembu *et al.*, 2017). Its limitation has been shown to induce rerouting of the carbon flow, which, in diatoms, could modulate EPS production

(Brembu *et al.*, 2017). In diatoms, the specific consequences of P limitation in EPS production are not predictable. Changes turned out to be highly diversified from one species to another, the complexity of EPS dynamics is still highly misunderstood (Laroche, 2022 ; Lovio-Fragoso *et al.*, 2021 ; Urbani *et al.*, 2005, 2012), and remains unknown in *H. ostrearia*. Yet, such changes in EPS production pattern could affect culture supernatant composition. Furthermore, senescent cell lysis releases in the culture medium intracellular marennine (IMn) and other metabolites, all of which are also likely to accumulate along batch culture.

To date, the ultrafiltration method proposed by Pouvreau *et al.* (2006b) remains the most frequently used approach to produce a bioactive EMn extract for possible application in aquaculture (Falaise, 2019), although such a refining process did not allow the obtention of a purified solution. Indeed, changes in culture parameters (temperature, growth irradiance, nutrient concentrations) and in the timing of BW harvest result in changes in the supernatant composition and could affect EMn extract quality, potentially resulting in different bioactive capacity. For the present work, EMn extract quality was monitored using a comprehensive approach, based on spectral analyses of marennine and EPS (Celina *et al.*, 1997 ; Pouvreau *et al.*, 2006a), and on bioassays (Falaise *et al.*, 2019a). Three lots of supernatant were compared, BW1, BW2, BW3, corresponding to the three main stages of the *H. ostrearia* culture, exponential, stationary and senescent, respectively. BW1 presented the highest efficiency regarding bacterial growth inhibition, compared to BW2 and BW3. This pattern was not observed for the antioxidant activity, the three lots of supernatant exhibiting very similar DPPH scavenging activity. This suggests that the functional groups for both bioactivities are different, and that their relative importance in the EMn extracts varies with the culture cycle.

Recent studies on EMn structure described this specific blue pigment as a heteropolysaccharide holding chromophores, of which a phenolic nature remains to be demonstrated (Pouvreau *et al.*, 2006a ; Yusuf *et al.*, 2023 ; Zebiri *et al.*, 2023). Such a molecular structure implies that both polysaccharidic and phenolic moieties may potentially be the origin of the bioactivities attributed to marennine as demonstrated for other natural

compounds (Bouarab-Chibane *et al.*, 2019 ; Hemalatha *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2021). Here, EMn was quantified using spectrophotometry (Pouvreau *et al.*, 2006a), a method which allowed estimating the amount of chromophores in the extracts but did not provide information on the heteropolysaccharide moiety. Regarding EMn antioxidant activity, the results of the DPPH scavenging efficiency method are in agreement with previous works (Pouvreau *et al.*, 2008a ; Prasetya *et al.*, 2021), and the EMn chromophore quantification explained most of the variability observed between the three different lots of BW, which implies that the chromophore might be responsible for this antioxidant activity. In contrast, the chromophore abundance in the three lots of BW cannot explain their respective antibacterial activities. Indeed, the difference observed between BW1 and both BW2 and BW3 indicated that another molecular moiety modulates the bacterial inhibition and that its quality is affected with time during the culture growth stage. Such evolution and possible degradation of marennine in culture has already been studied in conditions similar to the MPBR (Prasetya *et al.*, 2022). These authors monitored EMn chromophore spectrophotometrically and concluded that such degradation was not significant after 20 days of exposure, but they did not address possible changes in EMn heteropolysaccharide skeleton. In the present work, it was observed that using a 3-kDa membrane, EMn retention varied from 33% for BW1 to 75% for BW2 and BW3, supporting the hypothesis that BW composition changed with culture stage. The change in retention of EMn could reflect differences in apparent molecular weight, which could be explained by marennine's polydisperse nature. EMn polydispersity has been hypothesized previously (Vandanjon *et al.*, 1999), in particular using BW from batch culture obtained regardless of the culture stage. Results from the present work suggest that EMn polydispersity evolves with the culture growth stage, and several hypotheses could explain this observation. Changes could occur at the production level, with higher apparent molecular weight EMn produced, due to polymerisation or aggregation with other EPS present in the supernatant, the nature of which is also likely to fluctuate with changing physiological state of the diatom (Underwood *et al.*, 2004). Changes could also result from the biodegradation of one part of the molecule, when cells face starvation (Zhang et Bishop, 2003), either of the chromophore or the

polysaccharidic backbone. The former would result in the decrease of the ratio chromophore to polysaccharides, a condition inducing an apparent increase of EMn molecular weight estimated using spectrophotometry. Such changes could be responsible for the observed decline with time of the bacterial inhibition capacity of EMn extracts, due to the degradation of active sites of the molecule or the aggregation with other EPS that could prevent access to the bioactive moiety.

Spectral analyses as ATR-FTIR and UV-Vis spectrometry are frequently used to study bioactive EPS (Borjas Esqueda *et al.*, 2022), in particular for the research of functional groups responsible for their bioactivities (Wang *et al.*, 2021 ; Zayed *et al.*, 2020). According to UV-Vis spectra of the BW lots, no significant difference was observed, indicating that the structure of EMn remained stable all along the fed-batch culture. In contrast, ATR-FTIR analysis evidenced changes in EPS composition in the different BW lots, supporting the hypothesis of coproduct accumulation with time. BW1 displayed better defined bands corresponding to EPS purified structure (Borjas Esqueda *et al.*, 2022). BW2 and BW3 differed from BW1, displaying a relatively higher band around 1547 cm⁻¹ that corresponds to the presence of amide. This functional group has not been evidenced in recent studies on marennine structure (Yusuf *et al.*, 2023 ; Zebiri *et al.*, 2023) and it could correspond to lysates or other EPS co-extracted with EMn, an hypothesis consistent with the accumulation of senescent biomass fraction in the fed batch culture, and the decline of the antibacterial activity observed. Degradation of the polysaccharidic backbones of marennine along *H. ostrearia* culture could also explain the evolution of ATR-FTIR profile. Indeed, a decrease of the relative prominence of bands corresponding to pyran rings of carbohydrates, such as the C-O-C vibration at 1100 cm⁻¹ (Borjas Esqueda *et al.*, 2022), can be observed from BW1, harvested during the exponential growth, to BW3 harvested during the senescent phase.

In the context of EMn or BW valorisation in aquaculture, the culture process should be optimized to compromise between the high EMn volumetric productivity reached at the beginning of the stationary phase and the quality of the BW produced. To do so, two strategies can be applied. A semi-continuous harvest of the biomass, as proposed by Nghiem

Xuan *et al.* (2021), could allow maintaining *H. ostrearia* in exponential phase of growth to ensure a higher specific production of marennine, and avoid accumulation of lysates in the supernatant. Combined with an immersed membrane, this strategy would improve volumetric productivity of the process, enabling the production of preconcentrated, high-quality BW (ca. 20 mg_{EMn} L⁻¹, at the end of exponential phase) (Gargouch *et al.*, 2022 ; Pedron *et al.*, 2023). Another approach would consist in increasing the supernatant dilution rate, as proposed by Gargouch *et al.* (2022), to cultivate *H. ostrearia* without self-shading (Pouvreau *et al.*, 2007), a condition expected at a dilution rate of 0.5 d⁻¹ in the present MPBR (Gargouch *et al.*, 2022). At high light intensity, biomass could then be cultivated under proper conditions to maintain a high specific EMn productivity, and a high dilution rate would prevent nutritional shortage. A higher dilution rate would also prevent the accumulation of inhibitory factors, which should enable long-term (>150 days) cultivation of blue *Haslea* strains (Prasetya *et al.*, 2022). As an increase of dilution rate would greatly increase the water use of the system, this approach would need to be combined to an additional extraction step allowing recycling water after EMn extraction. The solid phase extraction (SPE) step proposed by Bélanger *et al.* (2020, and *submitted*), is an interesting solution, as SPE would collect EMn from the culture supernatant without the need of solvent. For both strategies, monitoring *H. ostrearia* cells is required to ensure they are maintained under optimal growth condition, allowing optimal EMn production and BW quality. Our results showed that *in vivo* monitoring of Chl *a* fluorescence parameters of the pelagic phase was consistent with the physiological state of the total biomass. The continuous homogenization provided by the Airlift system inside the chamber allowed random resuspension of part of the biomass, the monitoring of which informed on the physiological state of the total biomass. Such monitoring approach is compatible for online *in situ* monitoring (Bonnanfant, 2020), reducing sampling effort and simplifying greatly the management of the culture, provided that the culture system displays a homogenisation system such as Airlift to ensure the random resuspension of part of *H. ostrearia* benthic biomass.

3.2.5 Conclusion

Interest arises around marennine as its bioactivities make it a potential alternative to synthetic antibiotics in aquaculture. Up to now, most culture systems used to produce extracellular marennine (EMn) are batch or fed batch cultures of *H. ostrearia*, and few information are available regarding possible changes in EMn or blue water (BW, supernatant containing EMn) quality and the consequence on its bioactivities. To further promote culture of *H. ostrearia* and EMn valorisation in aquaculture, it has become essential to fill this gap, by studying the changes in EMn productivity and quality in function of *H. ostrearia* physiology evolution with culture time. This study highlights the need to consider the evolution of the total EPS production by *H. ostrearia*, which potentially fluctuates in parallel with marennine production. EPS and its degradation products are likely to be present in the intermediate molecular weight fraction (30-3kDa) of blue water, commonly considered as the main fraction containing marennine. The results of this study also highlight the likely accumulation of lysates with time using a fed batch mode of culture and suggest that cascade ultrafiltration may not be sufficient to prevent such accumulation, as the resulting compounds could aggregate to marennine. As such accumulation could adversely affect both marennine final quality and the physiological state of *H. ostrearia* in culture, we recommend reducing the residence time of the culture supernatant. Regarding the marennine extract, an additional preparation step could be a solution to guaranty the consistency of the extract despite variation of coproduct in culture supernatant, although this additional step must be readily achievable and economically reasonable to keep marennine production attractive.

Acknowledgments

This research work is part of a project that has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement N° 734708/GHaNA/H2020-MSCA-RISE-2016 (J.-L.M.) and was supported by the Ressources Aquatiques Québec (RAQ) Research Network supported by the Fonds de Recherche du Québec-Nature et Technologies N° 2014-RS-171172. This work also received funding from

the Institut France-Québec pour la coopération scientifique en appui au secteur maritime (IFQM) and Nantes Université for E.P.'s PhD position.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this study.

3.3 SUPPLEMENTARY MATERIALS: TEMPORAL VARIATION OF BLUE PIGMENT EXTRACT PRODUCTION AND QUALITY IN A FED-BATCH CULTURE OF *HASLEA OSTREARIA*.

Elodie Pedron^{1,2}, J-L Mouget³, Marylise Duperthuy⁴, Annabelle Mathieu-Denoncourt⁴, Céline Laroche⁵, R. Tremblay², J-S. Deschênes², O. Gonçalves¹, A. Massé^{1*}

¹GEPEA, CNRS UMR 6144, Nantes Université, Oniris, Saint-Nazaire, France

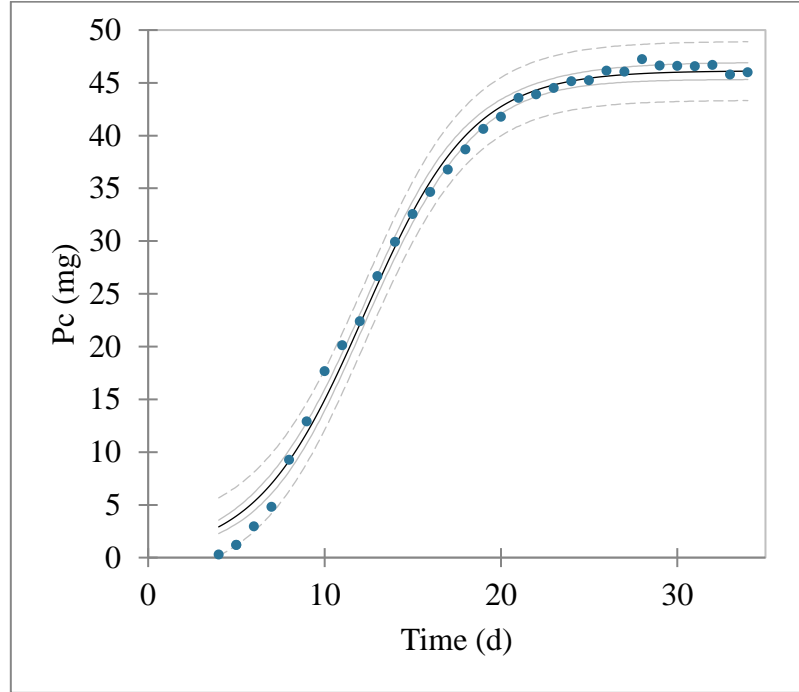
²Institut des sciences de la mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, Rimouski, Canada

³Mer-Molécules-Santé, MMS, FR CNRS 3473, IUML, Le Mans Université, Le Mans, France

⁴Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada

⁵Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, Institut Pascal, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France CNRS, UMR 6602, IP, F-63178 Aubière, France

***Corresponding author:** Elodie Pedron, pedronelodie@gmail.com



| Parameters | Value | Standard error | Lower limit (95%) | Upper limit (95%) |
|---------------|-------|----------------|-------------------|-------------------|
| $P_{c_{max}}$ | 46.1 | 0.4 | 45.3 | 46.9 |
| k | 0.33 | 0.01 | 0.30 | 0.35 |
| $T_{1/2}$ | 12.3 | 0.1 | 12.0 | 12.5 |

Figure S. 5 Logarithm regression of cumulative production of extracellular marennine (P_c) during cultivation of *H. ostrearia* NCC53 in MPBR. $R^2=0.99$, $P_c = 46.1/(1+\exp(-0,3*(\text{time}-12,3)))$. Parameters are detailed in the table below the graph. Confidence intervals (95%) in solid line, prediction interval (95%) in dotted line

Table S 12: Parameters of Gompertz modelling of *H. ostrearia* NCC 531 fitting the biomass proxy in function of time. Two biomass proxies were used: cell concentration (N , 10^6 cell L^{-1} , with initial $N = 100 \cdot 10^6$ cell L^{-1}), estimated by cell count ($n=3$), and chlorophyll a concentration ($[Chl_a]$, $ng L^{-1}$, with initial $[Chl_a]= 244$ $ng L^{-1}$) ($n=3$). K (d^{-1}), slope of the exponential growth phase, corresponds to the growth rate. X_c (d), corresponds to the mid-exponential phase. Data set used to model *H. ostrearia* growth resulted from daily measurements realised in triplicate ($n=3$) before and after culture homogenisation, to sample the pelagic phase (pelagic) and total biomass (total). $R^2_{N_{total}}=0.99$; $R^2_{N_{pelagic}}=0.98$; $R^2_{[Chl_a]_{total}}=0.99$; $R^2_{[Chl_a]_{pelagic}}=0.97$, all values are presented as estimate \pm standard error

| Gompertz parameters | N-based modelling | | | [Chl _a]-based modelling | | |
|---------------------|---|-------------------------|-----------|---|-------------------------|-----------|
| | N _{max} (10 ⁶ cell L ⁻¹) | K (d ⁻¹) | Xc (d) | [Chl _a] _{max} (ng L ⁻¹) | K (d ⁻¹) | Xc (d) |
| Pelagic | 113 ± 2 | 2.4 ± 0.7 | n/a | 166 ± 4 | 2 ± 1 | n/a |
| Total | 618 ± 7 | 0.39 ± 0.02 | 5.3 ± 0.1 | 1114 ± 13 | 0.38 ± 0.02 | 5.39±0.09 |

Table S 13: Physiological parameters measured during *H. ostrearia* NCC 531 culture in MPBR (d=0.1 d⁻¹), ANOVA results are displayed beneath the result table. When significant differences were observed Fisher's LSD was used as a post-hoc test, LSD values are added to the ANOVA table.

| Stage | Exponential | Early stationary | | Late stationary | | End of culture | | |
|--|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| Phase | pelagic | total | pelagic | total | pelagic | total | pelagic | total |
| Chl _a spe (µg 10 ⁶ cell ⁻¹) | 1.5±0.1 10 ⁻⁹ c | 1.9±0.1 10 ⁻⁹ a | 1.5±0.2 10 ⁻⁹ c | 1.8±0.1 10 ⁻⁹ b | 1.3±0.1 10 ⁻⁹ d | 1.7±0.0 9 10 ⁻⁹ a,b | 0.8±0.2 10 ⁻⁹ e | 1.2±0.1 10 ⁻⁹ d |
| CarT _{spe} (µg 10 ⁶ cell ⁻¹) | 0.9 ±0.1 10 ⁻⁹ c | 1.0±0.0 10 ⁻⁹ b,c | 1.0±0.1 10 ⁻⁹ b,c | 1.0±0.0 10 ⁻⁹ b,c | 1.0±0.1 10 ⁻⁹ b | 0.9±0.0 10 ⁻⁹ b,c | 1.2±0.0 10 ⁻⁹ a | 0.8±0.0 10 ⁻⁹ d |
| P ^T _{spe} (µg 10 ⁶ cell ⁻¹) | 2.4±0.1 10 ⁻⁹ c,d | 2.9±0.1 10 ⁻⁹ a | 2.5±0.2 10 ⁻⁹ c,d | 2.7±0.2 10 ⁻⁹ a,b | 2.2±0.2 10 ⁻⁹ d,e | 2.6 ±0.1 10 ⁻⁹ b,c | 2.0 ±0.3 10 ⁻⁹ e,f | 2.0±0.1 10 ⁻⁹ f |
| CarT/C hl _a | 0.63±0. 03 d | 0.53±0. 00 a | 0.68±0. 03 e | 0.55±0. 01 b | 0.82±0. 06 f | 0.56±0. 00 c | 1.4±0.1 g | 0.62±0. 02 d |

| Effect | DF | SS | MS | F | P-value | LSD-value |
|-------------------------------|----|-------|-------|---------|---------|------------------------|
| Stage_Phase | | | | | | |
| Chl _a spe | 7 | 3.413 | 0.488 | 38.573 | <0.0001 | 0.145 10 ⁻⁹ |
| Residual | 30 | 0.379 | 0.013 | | | |
| CarT _{spe} | 7 | 0.366 | 0.052 | 11.588 | <0.0001 | 0.087 10 ⁻⁹ |
| Residual | 30 | 0.136 | 0.005 | | | |
| P ^T _{spe} | 7 | 3.310 | 0.473 | 13.209 | <0.0001 | 0.244 10 ⁻⁹ |
| Residual | 30 | 1.074 | 0.036 | | | |
| CarT/Chl _a | 7 | 2.360 | 0.337 | 133.066 | <0.0001 | 0.065 |
| Residual | 29 | 0.073 | 0.003 | | | |

Table S 14 : Band assignments for the ATR-FTIR spectra of marennine extracts (Figure 3.4a) produced by *H. ostrearia* NCC531 MPBR culture. The extracts correspond to the blue water

intermediate fraction obtained by double ultrafiltration and diafiltration at 30 and 3kDa cut off respectively, as proposed by Pouvreau *et al.* (2006b)

| Experimental wavenumber (cm ⁻¹) | Characteristic equivalent wavenumber (cm ⁻¹) | Assignment | Reference |
|---|--|------------------------|--|
| 3394 | 3200-3400 | -OH | (Bélanger <i>et al.</i> , 2020 ; Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022 ; Sanniyasi <i>et al.</i> , 2022) |
| 2924 | 2920-2930 | CH ₂ | (Bélanger <i>et al.</i> , 2020 ; Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022 ; Sanniyasi <i>et al.</i> , 2022) |
| 1622 | 1630-1640 | C=O C=C | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022) (Sanniyasi <i>et al.</i> , 2022) |
| 1593 | 1560-1605 | COO- | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022) |
| 1547 | 1525-1540 | O=C-NH-CH ₃ | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022) |
| 1421 | 1400-1420 | COO ⁻ | (Bélanger <i>et al.</i> , 2020 ; Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022) |
| 1266 | 1245-1255 | S=O | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022) |
| | 1240-1250 | O-Ac | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022) |
| 1100 | 1075-1165 | C-O | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022 ; Sanniyasi <i>et al.</i> , 2022) |
| 1040 | 1020-1030 | C-C (ring) | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022 ; Sanniyasi <i>et al.</i> , 2022) |
| 858 | 890-900 | β linkage | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022 ; Sanniyasi <i>et al.</i> , 2022) |
| | 840-850 | α linkage | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022 ; Sanniyasi <i>et al.</i> , 2022) |
| | 845 | S=O | (Bélanger <i>et al.</i> , 2020) |

Table S 15 : Results of the one-way analysis of variance (ANOVA) on the effect of “BW lot” on EMn concentration enabling a 20% growth inhibition of *V. splendidus* 4D1-8 (IC20 mg_{EMn} L⁻¹) and the post-hoc Fisher’sSD test (LSD = 0.623). (Figure 3.5a)

| Effect | DF | SS | MS | F | P-value |
|------------------------------|----|-------|-------|--------|---------|
| Log₂(IC20) | | | | | |
| BW lot | 2 | 3.565 | 1.782 | 18.312 | 0.003 |
| Residual | 6 | 0.584 | 0.097 | | |

| Comparison | Difference | SD | t-value | p-value |
|------------|------------|--------|---------|-------------------|
| BW1 vs BW3 | -1.483 | -7.289 | 2.447 | <0.0001 |
| BW1 vs BW2 | -1.107 | -4.542 | 2.447 | 0.004 |
| BW2 vs BW3 | -0.375 | -2.204 | 2.447 | 0.069 |

Table S 16 : Summary of the ANCOVA realised on the linear curve response curve of DPPH test (Figure 3.5b) and summary of the individual linear dose-response curve. Residual error: 2.541, DF = 3, R²=0.97

| Effect | Estimate | SD | t-value | P-value |
|-------------|----------|----------|---------|------------------|
| (intercept) | 6.293 | 3.113 | 2.022 | 0.13644 |
| [EMn] | 771.202 | 126.310 | 6.106 | 0.00883** |
| BW1 | -4.227 | 6.403 | -0.660 | 0.55634 |
| BW2 | 1.775 | 4.402 | 0.403 | 0.71385 |
| [EMn]*BW1 | 865.035 | 1080.231 | 0.801 | 0.48181 |
| [EMn]*BW2 | -57.211 | 179.998 | -0.318 | 0.77144 |

Table S 17 : Nitrate and Phosphate dosage using ionic chromatography, and phosphore and silicium dosage using ICP-AES. Dosage was effectuated on culture medium permeate after biomass was removed by filtration (0.05µm cutoff) and EMn was removed by ultrafiltration (3 kDa cutoff).

| Harvest phase of culture medium | NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹) | PO ₄ ³⁻ (mg L ⁻¹) | P (mg L ⁻¹) | Si (mg L ⁻¹) |
|---------------------------------|--|---|-------------------------|--------------------------|
| exponential | 77 | N/A | <0.1 | 7.14 |
| stationary | 120 | N/A | <0.1 | 16.2 |
| end | 158 | N/A | <0.1 | 18.5 |

CHAPITRE 4

ÉTUDE APPROFONDIE DE LA QUALITE DE L'EXTRAIT DE MARENNINE COMME POSTBIOTIQUE EN AQUACULTURE

Cette étude a été menée entre les laboratoires GEPEA (UMR CNRS 6144, Saint-Nazaire, France), ISMER-UQAR (Rimouski, QC, Canada) et le laboratoire de microbiologie du département microbiologie, infectiologie, immunologie de l'Université de Montréal (UdeM, Montréal, QC, Canada). Elle fait l'objet d'un article intitulé « *Comprehensive quality analyses of benthic diatom blue pigment extract as postbiotic in aquaculture* » dont la version présentée ici sera soumise au journal *Aquaculture*. Cet article fut corédigé par moi-même ainsi que Marylise Duperthuy, Annabelle Mathieu-Denoncourt, William Bélanger, Céline Laroche, Réjean Tremblay, Jean-Sébastien Deschênes, Anthony Massé, et Olivier Gonçalves. En tant que première auteure, ma contribution à ces travaux fut l'essentiel de la recherche sur l'état de l'art, le développement de la méthode, l'exécution des expériences, les analyses en laboratoire et la rédaction de l'article. Réjean Tremblay, Jean-Sébastien Deschênes, Anthony Massé, et Olivier Gonçalves ont fournis l'idée originale. Ils ont aidé à l'élaboration et la problématique ainsi qu'au développement de la méthode. William Bélanger a participé au raffinage des extraits et a apporté son expertise sur la chimie de la marennine. Marylise Duperthuy et Annabelle Mathieu-Denoncourt ont contribué aux analyses microbiologiques et à l'étude de leurs résultats. Céline Laroche a apporté son expertise concernant les analyses spectrales des polysaccharides. Tous les auteurs ont participé à la rédaction et à la révision des écrits.

Pedron, E., Duperthuy, M., Mathieu-Denoncourt, A., Laroche, C., Bélanger, W., Gonçalves, O., Massé, A., Deschênes, J.-S., Tremblay, R. (en préparation pour soumission). *Comprehensive quality analyses of benthic diatom blue pigment extract as postbiotic in aquaculture*.

4.1 RESUME

La marennine est un pigment bleu naturel produit par *Haslea ostrearia*. Ses bioactivités, notamment antibactériennes et antioxydantes, suscitent l'intérêt de la recherche en aquaculture, où des alternatives aux antibiotiques de synthèses sont activement recherchées afin de limiter l'émergence de souches bactériennes résistantes, une menace à la santé et sécurité alimentaire. L'utilisation potentielle de la marennine dépend cependant de la robustesse de sa production, de la culture de *H. ostrearia* jusqu'au raffinage d'extraits de qualité satisfaisante. L'objectif de cette étude fut d'évaluer l'impact du procédé de raffinage sur la qualité de l'extrait de marennine. Pour ce faire, des extraits de ce pigment obtenus à partir de différentes voies de raffinage ont été comparés sur la base de leurs activités biologiques (DPPH, test d'inhibition de la croissance de plusieurs souches de *Vibrio*) et d'analyses physicochimiques (teneur en sucre totaux, UV-Visible, ATR-FTIR). Les résultats ont montré que l'ajout d'une extraction en phase solide et d'une gélification ionotropique au procédé d'ultrafiltration permettait d'améliorer les propriétés antioxydantes et antibactériennes de ceux-ci. L'efficacité de l'activité de piégeage du radical DPPH a été multipliée par 5, et les analyses physicochimiques tendent à montrer que l'amélioration de la quantité de chromophore et de son accessibilité en sont les principaux facteurs. Les mesures d'activité d'inhibition de la croissance de *Vibrio* ont suggéré que l'étape de gélification ionotropique, en éliminant une partie des co-extraits, améliorerait la répétabilité de la réponse d'inhibition tandis que le fractionnement permis par l'ultrafiltration semblerait améliorer la réponse antibactérienne. L'origine de la variabilité de la réponse antibactérienne a été plus amplement discutée, toutefois cette étude a pu confirmer le potentiel de la marennine en tant qu'intrant naturel en aquaculture, et soutient l'utilisation combinée de l'extraction en phase solide, de la gélification ionotropique et de l'ultrafiltration en tant que voie de raffinage robuste pour produire des extraits de marennine valorisables.

4.2 COMPREHENSIVE QUALITY ANALYSES OF BENTHIC DIATOM BLUE PIGMENT EXTRACT AS POSTBIOTIC IN AQUACULTURE.

Elodie Pedron^{1,2}, Marylise Duperthuy³, Annabelle Mathieu-Denoncourt³, William Bélanger¹, Céline Laroche⁴, Olivier Gonçalves², Anthony Massé², Jean-Sébastien Deschênes¹, Réjean Tremblay¹

¹Institut des sciences de la mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, Rimouski, Canada

²GEPEA, CNRS UMR 6144, Nantes Université, Oniris, Saint-Nazaire, France

³Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada

⁴ Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, Institut Pascal, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France CNRS, UMR 6602, IP, F-63178 Aubière, France

***Corresponding author:** Elodie Pedron, pedronelodie@gmail.com

Keywords

Natural blue pigment, Extracellular marennine; antibacterial activity; antioxidant activity; refining process; SPE

Abbreviations

BW: Blue water

DW: Dry weight

EMn: Extracellular marennine

EPS: Exopolymer substances

HMW: High molecular weight

LMW: Low molecular weight

MMW: Medium molecular weight

PS: Polysaccharides

SPE: Solid phase extraction

UF: Ultrafiltration

Graphical abstract

| Marennine extract | Antioxidant activity | Antibacterial activity | Chromophore content | Carbohydrate content |
|-------------------|----------------------|------------------------|---------------------|----------------------|
| MMW-UF | + | ++ | ++ | + |
| MMW-SPE | +++ | +++ | +++ | + |
| LMW-SPE | ++ | ++ | ++ | - |
| HMW-SPE | + | - | + | +++ |

Highlights

- SPE of marennine combined with ionotropic gelation increases antioxidant activity of the extract.
- SPE of marennine combined with ionotropic gelation improves bacterial growth inhibition.
- Antioxidant bioactivity is linked to the presence of marennine chromophore.
- The polydisperse nature of marennine influences its antibacterial activity.
- The chromophore alone does not explain the observed bacterial growth inhibition.

Abstract

Marennine is a natural blue pigment produced by *Haslea ostrearia*. Its bioactivities, especially antibacterial and antioxidant, have attracted interest in aquaculture research, where alternatives to synthetic antibiotics have been actively investigated to limit the emergence of resistant strains, an important threat to food safety and a health issue. The success of marennine commercialization, however, partly relies on the robustness of its production from the culture of *Haslea ostrearia* to the refining of sufficient-quality extracts. In this study, marennine extracts obtained from different refining pathways were physiochemically characterized (carbohydrate content, UV-Visible, ATR-FTIR) and their activities were compared using bioassays (DPPH scavenging and *Vibrio* growth inhibition assay on different strains). The results showed that the addition of solid-phase extraction and ionotropic gelation to the currently used ultrafiltration approach of marennine refining enabled the improvement of both the antioxidant and antibacterial properties of marennine. DPPH scavenging activity efficiency was increased by a factor of 5, and physicochemical analyses implied that improved chromophore quantity and accessibility were the main causing factors. Meanwhile, our results indicate that the ionotropic gelation step, by removing some co-extracts, could enhance the growth inhibition of pathogenic *Vibrio* while the fractionation step facilitated by ultrafiltration appeared to enhance its potency. Altogether, this study confirmed the potential of marennine as a natural inurant in aquaculture and supports the combined use of solid- phase extraction ionotropic gelation and ultrafiltration as a reliable refining pathway to produce a valuable marennine extract.

4.2.1 Introduction

Marennine is a natural blue pigment produced and externalized by the diatom *Haslea ostrearia*. Its hydrosoluble and polydisperse nature makes it an unusual pigment, and its numerous bioactivities (antioxidant, anticoagulant, antiviral, antibacterial, prophylactic, and antiproliferative (Gastineau *et al.*, 2014) have attracted the interest of several sectors, from cosmetics to aquaculture. The latter is currently on the lookout for alternatives to synthetic

antibiotics, favoring the emergence of resistant bacterial strains, an important threat to food safety and a major health issue. Marennine is considered an interesting potential candidate for its antibacterial activities, such as bacterial growth inhibition (Falaise *et al.*, 2019b), reduction of strain virulence (Bouhleb *et al.*, 2021 ; Latour *et al.*, 2023 ; Tardy-Laporte *et al.*, 2013 ; Turcotte *et al.*, 2016), prophylactic effect on some bivalves larvae (Latour *et al.*, 2023 ; Turcotte *et al.*, 2016), and the absence of bactericidal effect reported to date. Moreover, the growth inhibition activity of marennine has been observed against *Vibrio* species known to induce vibriosis, resulting in important bivalves lost, especially at the larval and juvenile stages (Bower, 2009 ; Genard *et al.*, 2011). Marennine also accumulates on bivalves gills, where filter-feeding activities are expected to accumulate microorganisms such as bacteria up to 1000 times more than their concentration in the surrounding environment (Balbi *et al.*, 2021 ; Gastineau *et al.*, 2012). We suggest that accumulation of marennine on juveniles' gills could help reducing the oxidative stress of individuals facing contamination in their environment (Ahmad *et al.*, 2012). Thus, antioxidant and antibacterial activity of marennine could be useful to reduce mortalities in hatchery and nursery.

The potential use of marennine partly relies on the robustness of its production from the culture of *H. ostrearia* to the refinement of a sufficient quality extract, which hinges on the expectation of its valorization sector. Recent advances regarding the cultivation process of *H. ostrearia* are encouraging, proposing solutions to the low growth rate of this benthic microalgae using a system that allows benthic growth (Prasetya *et al.*, 2022) or a hybrid system enabling separation of cell culture management and harvesting of the culture supernatant, known as blue water (Gargouch *et al.*, 2022 ; Pedron *et al.*, 2023 ; Rossignol *et al.*, 2000b). Both approaches have been demonstrated to enable relatively low marennine volumetric productivities that are reliable over a long period of time (150 days) or high volumetric productivity (10 times higher) on a short period of time (over 20 days). The combination of these approaches being practicable, blue water production is conceivable. Leveraging the natural externalization of marennine to compensate for the slow growth of *Haslea* is promising. However, the water usage for these cultures remains important. Indeed, considering that reaching 50 mg L⁻¹ of marennine inside the culture is detrimental for *H.*

ostrearia development, it hinders further concentration of the production within the culture chamber (Pouvreau *et al.*, 2007). Up until recently, the double ultrafiltration of the blue water was considered as the most cost-effective and straight forward refining process to get a marennine extract ready to be used for its bioactive properties in aquaculture (Gastineau *et al.*, 2014 ; Pouvreau *et al.*, 2006b). Double ultrafiltration diafiltration, as proposed by Pouvreau *et al.* (2006b), enables the selection of the intermediate molecular weight fraction of blue water, between 30 and 3 kDa, which contains marennine at a relatively high level of purity (Pouvreau *et al.*, 2006a). Because no additional purification step was added in the refining process of this extract, it is expected that ultrafiltration and diafiltration alone will preserve the macrostructure of the native extracellular marennine. However, such an approach is also prone to co-extract marennine with other substances. Despite diafiltration, salts may have been retained by the polymeric structure, as well exopolymers, whose molecular weight ranged between 3 and 30 kDa or even aggregate to marennine through non-covalent molecular bonds. Diatoms, such as *Haslea*, are well-known for their aptitude to produce high quantities of exopolymers (Gügi *et al.*, 2015 ; Shnyukova et Zolotariova, 2015 ; Underwood *et al.*, 2004 ; Xiao et Zheng, 2016), especially benthic diatoms for which exopolysaccharide production is highly related to their biofilm formation (Pierre *et al.*, 2014 ; Underwood *et al.*, 2004). The composition and productivity of exopolymers by diatoms depend on culture conditions and physiological states of the cultivated diatoms (Underwood *et al.*, 2004 ; Wotton, 2004). Knowing this, it is likely that the composition of the culture supernatant from which marennine originates fluctuates. Such a variability is likely to be observed in the composition of coextracts and could induce variability of the quality of the latter. Bélanger *et al.* (2020 and *submitted*) proposed the addition of a on-line pre-purification step in the preparation of the marennine extract to facilitate the management of a high volume of blue water. The approach based on extraction by retention on reusable graphite particles combined with a separation by ionotropic gelation allows the collection of a blue fraction containing marennine and allows the culture medium to be potentially recycled in the culture system. The newly concentrated blue extract is further fractioned according to its molecular mass as proposed by Pouvreau *et al.* (2006b). This process allows for the collection of the

main extract and, enable the selection of the intermediate molecular weight fraction of marennine extract using cutoffs of 30 and 3 kDa. This results in a low molecular weight fraction (in the permeate of 3kDa cutoff) and a high molecular weight fraction (retained by the 30 kDa cutoff).

The focus of this study was to assess the impact of the refining process on the quality of marennine extract, as a postbiotic against *Vibrio* (Bondad-Reantaso *et al.*, 2023). Marennine extracts obtained from different refining pathways were compared using a method combining bioassay (antioxidant and antibacterial activities) and physicochemical assessment to evaluate their quality. Antioxidant and bacterial growth inhibition assays were performed. The antioxidant assay provides information allowing to discuss the impact of the process on the molecular environment and accessibility of the marennine antioxidant moiety. Bacterial growth inhibition assay is a straightforward measure of the marennine extract efficiency against *Vibrio* pathogenic strains (Falaise *et al.*, 2019b). Complementary spectral and chemical analyses are expected to improve our understanding of the chemical origin of the eventual variation in bioactivity efficiency and the factors that improve or degrade the latter. Thus, this study could also be a starting point for further structure-activity relationship analysis of marennine.

4.2.2 Materials and methods

Microalgae and culture maintenance

Supernatant culture containing marennine (called blue water) was provided by the Station aquicole de Pointe-au-Père (48°31' N; 68°28' W, QC, Canada). Algal production was performed using the NCC519 and NCC553 strains of *H. ostrearia* provided by the Nantes Culture Collection. *Haslea ostrearia* NCC 519 was isolated from Bourgneuf Bay, France and provided by the Nantes Culture Collection, and *H. ostrearia* NCC553 resulted from an auxosporulation between *H. ostrearia* NCC527 and *H. ostrearia* NCC532, both isolated from Bourgneuf Bay (Loire-Atlantique, France). Cultures were grown in a semi-continuous mode in 50 kDa (KOCH Membrane, Romicon, Wilmington, DE, USA) ultrafiltered seawater

enriched with F/2 media and 30 mg L⁻¹ silicates. Batch cultures were produced in 30 L flat bottom PBRs at a light intensity of 180 μmol photons m⁻² s⁻¹, 14/10 h light/dark cycles, a temperature of 20°C, and a salinity of 28 ppt. BW containing extracellular marennine from the PBRs was harvested after 35 days, when the concentration reached approximately 10 mg L⁻¹. BW was filtered at 1 μm with a centrifugal pump to eliminate any cells or particles, and marennine concentration was estimated on the cell-free culture water (syringe-filtered on 0.22 μm). Absorbance was measured at the visible λ_{max} in culture (677 nm) (Pouvreau *et al.*, 2006a) with a cuvette of 10 cm optical path length.

Marennine extract refining.

The MMW-UF reference extract was obtained from a BW batch of *H. ostrearia* NCC519 culture and was refined according to Pouvreau *et al.* (2006b) cascade diafiltration to yield marennine with average molecular weights between 30 and 3 kDa, using 30 and 3 kDa cutoff membranes. Diafiltration at 3 kDa was performed until the permeate salinity reached 0 ppt. The resulting intermediate fraction (MMW-UF) was freeze-dried and dissolved in nanopure water (NW).

MMW-SPE, LMW-SPE, HMW-SPE and extracellular polymeric substances (EPS-H₂O) samples were processed using the methods outlined in Bélanger *et al.* (*submitted*). Briefly, graphite flakes were added to supernatant (BW) from the *H. ostrearia* NCC553 culture, stirred mechanically, and left to settle. The supernatant was discarded, and the solid phase was loaded in a chromatography column and eluted with an aqueous butanone solution (20 %, v/v). The raw extract was gelled with disodium phosphate and calcium acetate before being centrifuged to separate marennine from the soluble EPS. The marennine hydrogel was washed with nanopure water (NW) and dissolved in an aqueous solution of ethylene-diamine tetraacetate (EDTA). The resulting solution was purified and fractionated via cascade diafiltration to yield marennine with average molecular weights of 3-1 kDa (LMW-SPE), 30-3 kDa (MMW-SPE), and >30 kDa (HMW-SPE). The end-permeate (<1 kDa) was partially desalted by dilution in a large volume of nanopure water and underwent another extraction cycle using solid-phase extraction (SPE) on graphite. This extract of low molecular weight

was dried using a rotary evaporator and combined with the 3-1 kDa marennine fraction (LMW-SPE). All marennine fractions were freeze-dried and dissolved in NW. EPS were extracted from the gelation supernatant by evaporating the solvent using a rotary evaporator, dissolved in dilute hydrochloric acid (HCl), and neutralized with sodium hydroxide (NaOH). The suspension was filtered through a cellulose filter, diafiltered on a 1 kDa molecular weight cut-off (MWCO) membrane and freeze-dried. Finally, the dry EPS extract was washed with methanol and centrifuged to retain only the lipophobic fraction, which was dried again and dissolved in NW (EPS-H2O). All the different steps are resumed in Figure 4.1.

All ultrafiltration steps were performed at 20°C, using AMICON ® 400 mL stirred cells and Ultracel® membranes. Pressure was maintained at 50 psi.

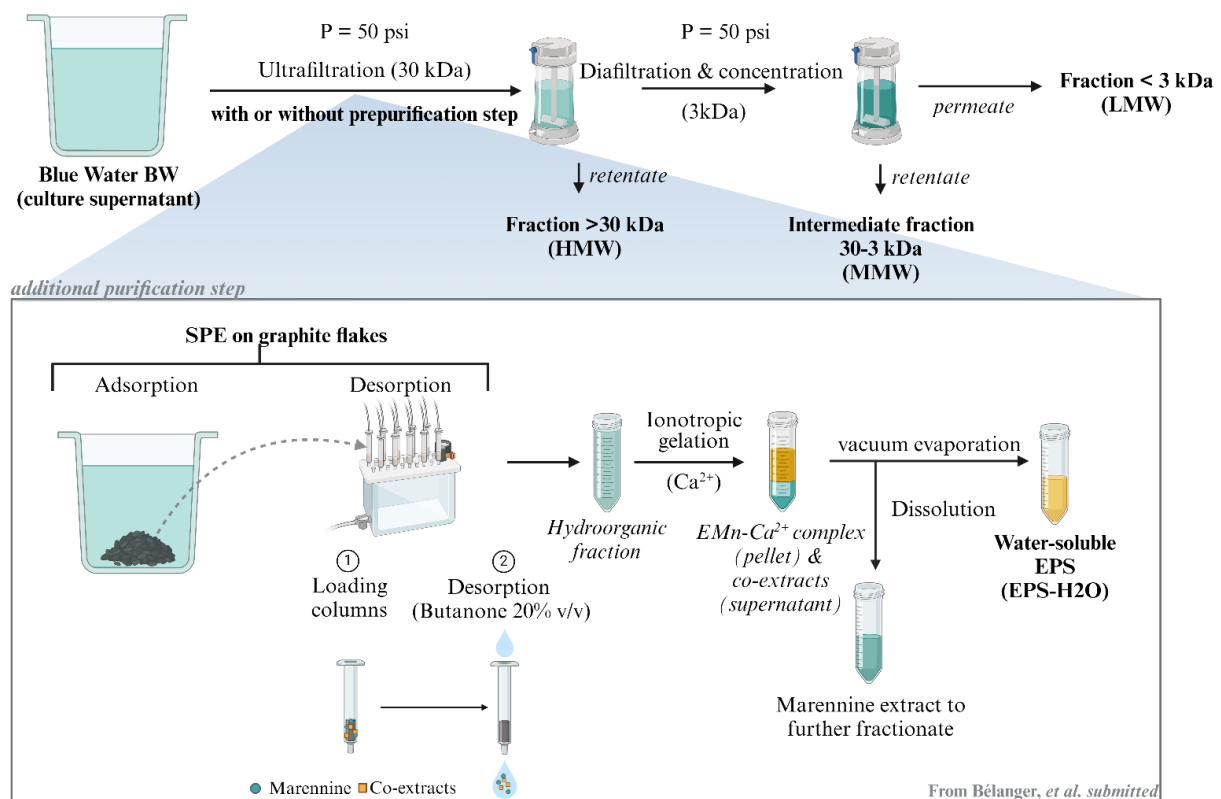


Figure 4.1 : Purification process enabling the five studied extracts to be obtained: without the additional purification step MMW-UF and with the additional purification step MMW-SPE, LMW-SPE, HMW-SPE, and EPS-H2O (created with BioRender.com).

Bioactivity study

Antioxidant activity

The DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) scavenging assay was performed using the Dojindo DPPH assay kit, according to a method from Shimamura *et al.* (2014) adapted to marennine extract of all levels of purification, to ease future comparison. The initial DPPH solution (0.2 mM) was diluted 5-fold (0.04 mM) so that the activity would be detectable within low concentration range of extracts (dilution carried with nanopure water). As proposed by Gang *et al.* (2021), the 99% ethanol used to prepare the DPPH solution was replaced by a 70% ethanol solution, which is more suitable for the saline extracts. For each microplate, the antioxidant capacity of a positive control, the antioxidant Trolox ([Trolox] maximal concentration reaching 8.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), was also tested to ensure the reliability of the DPPH solution used.

After 20 μL of the tested sample, BW or Trolox solution, and 80 μL of 0.1 M Tris–HCl buffer (pH 7.4) were added into the microplate's wells, 100 μL of the DPPH solution (0.04 mM) was added. The plate was shaken for 30 s and left at room temperature in the dark for 30 minutes, after which the absorbance of the solution at 517 nm was measured (SpectraMax® 190 microplate reader). For each microplate, a mixed solution of 120 μL of ethanol and 80 μL of Tris–HCl buffer was used as the blank for Trolox, and 100 μL of ethanol and 20 μL of NW and 80 μL of Tris–HCl buffer as the blank in the absence of marennine. As marennine absorbs near 517 nm, 100 μL of ethanol and 20 μL of extract solution at each tested concentration, and 80 μL of Tris–HCl buffer were used as blanks for extract solution. The absorbance at the addition of the tested sample was expressed as A_s , the absorbance at the addition of the corresponding blank as A_c , and the DPPH inhibition (%) was obtained from the following equation:

$$DPPH\ inhibition = \frac{A_c - A_s}{A_c} * 100 \quad (1)$$

When the extract concentration enabled it, its concentration inducing 50% DPPH scavenging, IC₅₀, was obtained. The IC₂₀, a concentration inducing 20% DPPH scavenging, was also determined to allow comparison of the extracts whose IC₅₀ was not attainable under these experimental conditions.

TEAC, normally calculated using the ABTS test, corresponds to an index that enables the comparison of the bioactivity of one compound with that of the standard antioxidant molecule, Trolox. In this study the TEAC index was calculated from the Trolox capacity to scavenge the DPPH radical, as proposed by Shimamura *et al.* (2014). The TEAC was calculated using the IC₅₀ of the sample tested and the IC₅₀ of Trolox, both coming from the same replicate:

$$TEAC = \frac{IC_{50}Trolox}{IC_{50}sample} \quad (2)$$

Antibacterial activity

Four strains of *Vibrio splendidus* were used to study the antibacterial activity of marennine extracts. *Vibrio splendidus* 4D1-8, 4G4-G, 4G1-8, and 3T8-11 were selected for their growth inhibition response to marennine extract (Falaise *et al.*, 2019b). Strains were supplied by the Laboratoire de biologie intégrative des modèles marins (LBI2M) (Station biologique de Roscoff, France) and were isolated from oyster tissues, *V. splendidus* 4D1-8, 4G4-4 and 3T8-11 showing moderate virulence against them (Oyanedel *et al.*, 2020). *Vibrio* strains were grown in LB broth media containing 2% NaCl (LB 2%NaCl) (10 mg mL⁻¹ tryptone (Thermo Fisher™), 5mg mL⁻¹ yeast extract (Thermo Fisher™), 20 mg mL⁻¹ NaCl) or on LB-2% NaCl-1.2% agar media (LBA 2% NaCl).

For the growth inhibition assay, three colonies per Petri dish (biological replicates, n=3) were inoculated in 5 mL LB 2% NaCl and grown overnight at room temperature (20°C) under moderate agitation (130 rpm). The next day, 100 µL of the bacterial suspension was transferred into 5 mL of LB 2% NaCl and incubated at 20°C with agitation until the bacterial suspension reached an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 2. This inoculum was then

subcultured 2 h before the antibacterial response test to ensure that the inoculum was growing exponentially. Right before inoculation of the 96-wells microplate, the inoculum was diluted in a 3 times concentrated LB 2% NaCl (3xLB 2% NaCl) culture medium, to reach a theoretical OD₆₀₀ of 0.0001. *Vibrio splendidus* was exposed to the tested extracts, which were serially diluted at a 1/2 ratio (dilution carried with 3xLB 2% NaCl). Antibacterial activity was evaluated in a 96-well microplate in which 25 µL of inoculum was added to 75 µL of tested marennine extract. Each concentration was tested in technical triplicates, and a blank without bacteria was prepared with 25 µL of 3xLB 2% NaCl and 75 µL of the corresponding dilution of BW. Bacteria were incubated at 20°C with 160 rpm agitation for 24 h, after which the level of growth was assessed by measuring the absorbance at 600 nm (SpectraMax ID3 plate reader). The growth inhibition (%) of *V. splendidus* is estimated from the following equation:

$$\text{Growth inhibition} = \frac{(Abs_t - Abs_{LB}) - (Abs_i - Abs_{EMn})}{(Abs_t - Abs_{LB})} * 100 \quad (3)$$

with Abs_t the absorbance at 600 nm of the well containing 100 µL the *V. splendidus* strain culture, Abs_{LB} the absorbance at 600 nm of well containing 100 µL LB medium, Abs_i the absorbance at 600 nm of the well containing the *V. splendidus* exposed to a concentration of marennine extract, Abs_{EMn} the absorbance at 600 nm of the well containing non-inoculated LB culture medium and corresponding solution of BW.

When the extract concentration enabled it, its concentration inducing 50% growth inhibition, IC₅₀, was determined. IC₂₀, the concentration inducing 20% growth inhibition, was also calculated to allow comparison of the extracts whose IC₅₀ was not attainable under these experimental conditions.

Physicochemical analysis

ATR-FTIR

For the ATR-FTIR spectra acquisition, a Bruker tensor 27 FTIR spectrometer equipped with an HTSXT plate reader module, a deuterated triglycine sulfate detector RT- DLaTGS, and the OpusLab v 7.0.122 software (Bruker Optics, Germany) was used. Infrared spectra were then recorded directly in transmission mode, and dry extracts were deposited directly on the Bruker tensor 27 FTIR spectrometer lens. The following parameters were set up: spectral resolution was fixed to 1 cm^{-1} , number of scans to 32, selected spectral range between $4,000$ and 400 cm^{-1} , and microplate reader pinhole aperture set to 3 mm. Therefore, the diameter of the IR beam was sufficient to detect all the material within a spot diameter of approximately 3 mm. Background spectra were collected using the same instrument settings as those employed for the samples.

UV-Visible

For UV–Visible (UV–Vis) spectral acquisition, a Cary 100 spectrophotometer (Agilent/Varian, Santa Clara, CA, USA), combined with Varian WinUV software (version 3.00) was used. The UV–Vis samples were analyzed at 24°C in quartz cuvettes of 1-cm path length. The selected spectral range was between 200 and 800 nm. The absorbance of the chromophore $\text{Abs}_{\lambda_{\text{Vis}}}$ was measured at the observed λ_{max} in the visible range (between 400 and 800 nm).

Mass absorptivity

Dry weight was measured using the freeze-dried extract with the microbalance Cubis 3.6P-2500-M (Sartorius, Goettingen, Germany) and mass concentration was adjusted by solubilization in NW. The absorbance of the solubilized extracts was measured by collecting of their visible spectra (acquisition range 400-800 nm) using the same Cary 100 spectrophotometer (Agilent/Varian, Santa Clara, CA, USA). Taking into account the λ_{Vis} shift in the visible region (between 400 and 800 nm), the maximum absorbance was collected and its ratio to its corresponding mass concentration was calculated to obtain the mass absorptivity of each extract, ϵ_{m} .

Carbohydrate content

The total carbohydrates amount ($\text{mg}_{\text{eq. Glucose}} \text{mg}_{\text{DW}}^{-1}$) was determined using the phenol sulfuric acid method and expressed as glucose equivalent as described in DuBois *et al.* (1956).

A composition ratio (equation 5) of marennine extract ($\text{mg}_{\text{EMn}} \text{mg}_{\text{eq. Glucose}}^{-1}$) was calculated using the carbohydrate content experimentally determined and the marennine content ($\text{mg}_{\text{EMn}} \text{mg}_{\text{DW}}^{-1}$) estimated by its absorbance measurement (equation 4):

$$[EMn] = \frac{Abs_{\lambda_{vis}}}{\epsilon * l} * M \quad (4)$$

$$Composition\ ratio = \frac{[EMn] * \frac{1}{Cm}}{Carbohydrate\ content} \quad (5)$$

with $Abs_{\lambda_{vis}}$ the absorbance measurement at λ_{vis} (a.u.), ϵ the molar extinction coefficient of EMn determined by Pouvreau *et al.* (2006a) ($\epsilon = 12.10^4 \text{ L mol}^{-1}$), l the length of the optical path in the cell (cm), EMn molar mass as provided by Pouvreau *et al.* (2006a) ($M = 9893 \text{ Da}$), and Cm the mass concentration of the extract ($\text{mg}_{\text{DW}} \text{L}^{-1}$).

Statistical analysis

The DPPH inhibition and bacterial growth inhibition results are modeled as a dose-response curve following a 4-parameter logarithmic function using the "drda" package and R software R-4.3. Experiments were conducted in triplicate (technical replicates, $n=3$) and replicate were modeled separately. Interpolation of each model enabled the acquisition of IC50 and IC20 values. IC50 and IC20 obtained after the same incubation time during the antibacterial assay were compared to their median values according to the nature of the extract or to the *V. splendidus* strain tested.

Statistical analysis was performed using XLSTAT software on the DPPH assay results, the carbohydrate content and the composition ratio. The normality of the distributions and the homoscedasticity of the variances were tested beforehand by the Shapiro-Wilk and

Levene test. DPPH IC50 and IC20, as well as carbohydrate content and composition ratio were analyzed with one-way ANOVA to determine differences between extract bioactivities. When differences were detected, Fisher's LSD multiple comparison tests were used to determine which means were significantly different. Significance of differences was defined at $p < 0.05$.

All ANOVA and Fisher's LSD tests results are detailed in supplementary materials.

4.2.3 Results

Antioxidant activity

The DPPH scavenging capacity of marennine extracts displayed significant differences depending on the refining steps followed by the extracts, as observed in Figure 4.2a and illustrated in the dose-response curves of Figure S. 6. According to mass concentrations, the most efficient extract to scavenge DPPH radicals is MMW-SPE, reaching 20% and 50% radical scavenging at $4.0 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$ and $15.8 \pm 3.1 \text{ mg L}^{-1}$ respectively. This extract is followed by LMW-SPE, which displayed a half as efficient antioxidant activity, reaching 20% radical scavenging at $8.4 \pm 1.3 \text{ mg L}^{-1}$ and 50% at $27.0 \pm 2.2 \text{ mg L}^{-1}$. MMW-UF, the equivalent extract to MMW-SPE without the pretreatment proposed by Bélanger *et al.* (*submitted*), displayed a 4-fold less efficient DPPH scavenging activity with an IC20 of $17.8 \pm 2.9 \text{ mg L}^{-1}$, and an IC50, obtained according to the inhibition response modelization, predicted a 7-fold lower efficiency. HMW-SPE displayed a very low DPPH scavenging activity, closer to the EPS-H2O extract efficiency than to any of the other blue extracts. EPS-H2O, the soluble polysaccharide fraction removed from the blue extract through ionotropic gelation, displayed a low but significant antioxidant activity, comparatively to the marennine-containing extracts, being 16 times less efficient than MMW-SPE. It is worth noticing that MMW-UF and HMW-SPE displayed a higher response variability, reaching 50% DPPH radical scavenging. MMW-UF variability could be explained by the prediction uncertainty, which was higher than the experimental one, as IC50 was not reached with the concentration available for the experiment. It was not the case of HMW-SPE for which the

variability was experimentally observed and thus is more susceptible to being intrinsic to the extract, which should be taken into consideration during the discussion.

To relate the observed antioxidant activity to the pigment itself, the equivalent absorbances of IC20 and IC50 were calculated using the mass absorptivity ϵ_m (Table 4.1) of each blue extract (Figure 4.2b). According to this standardization, the three extracts obtained following the SPE purification step reached IC20 and IC50 at equivalent relative

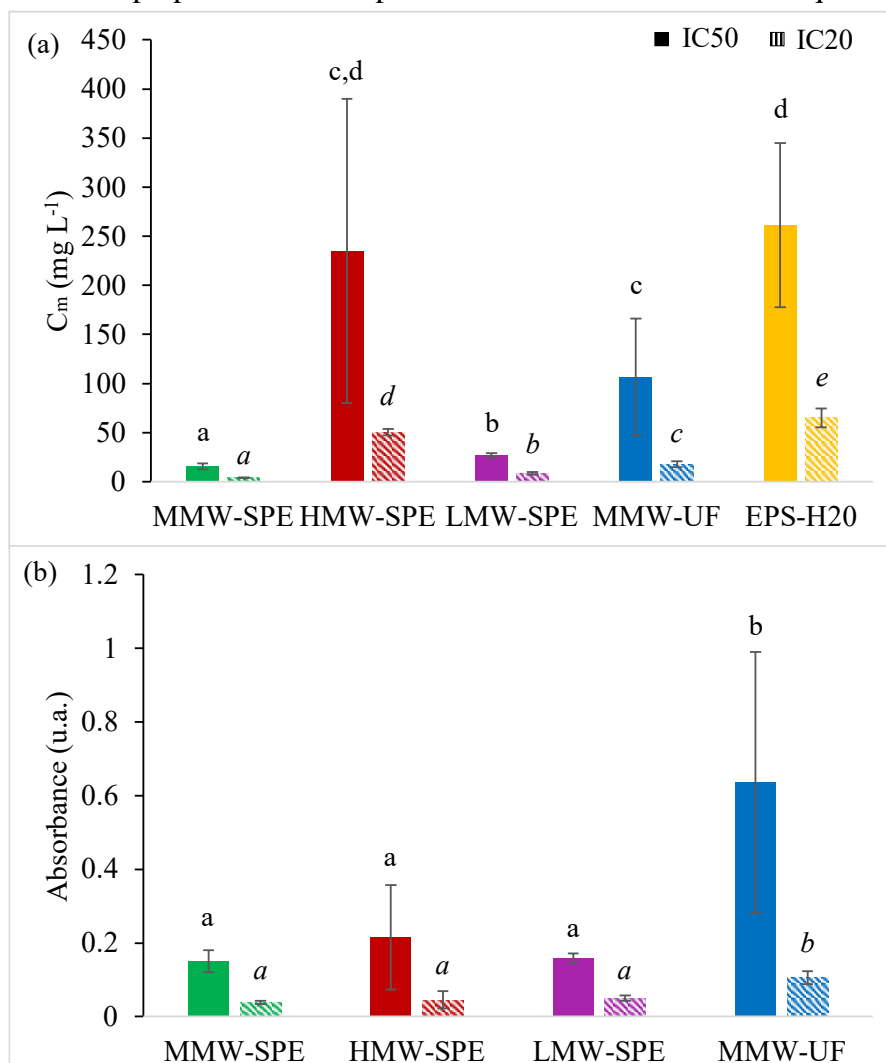


Figure 4.2 : Marennine extract concentration inducing 20 (IC20, lined histogram) or 50% (IC50, plain histogram) DPPH scavenging. Concentrations are expressed as (a) mass concentrations (mg L⁻¹) and (b) the equivalent extracellular marennine chromophore absorbance (a.u.) of each extract. Results are expressed as mean \pm SD (n=3). Different letters indicate significant group difference (ANOVA, LSD; $p < 0.05$).

absorbances of 0.045 ± 0.006 and 0.17 ± 0.04 u.a., respectively. As for the MMW-UF, at IC₂₀ and IC₅₀, the relative absorbance of the extract was twice as high, reaching 0.11 ± 0.02 and 0.64 ± 0.35 u.a..

***Vibrio splendidus* growth inhibition**

V. splendidus growth was measured after 24h of marennine extracts exposition for four strains, which were selected beforehand for their growth inhibition response to the presence of marennine extract. Each strain was tested with three different clones. The mean responses are displayed in Figure 4.3, and dose-response curves and detailed strains response can be found in Figure S. 7, Table S 19 and Table S 20.

EPS-H₂O extract, the hydrosoluble polysaccharide fraction co-extracted with marennine during SPE, displayed no *V. splendidus* growth inhibition activity for the four strains tested (Table S 19, Figure S. 7). Further result description will only focus on the *V. splendidus*. response to marennine-containing extracts, *i.e.*, MMW-UF, MMW-SPE, HMW-SPE, and LMW-SPE. All these extracts induced significant bacterial growth inhibition (Table S 20). Comparing the 4 strains, *V. splendidus* 4G1-8 appeared the most sensitive, regardless of the marennine extract tested, with a median IC₂₀ of 18 mg L^{-1} , meanwhile *V. splendidus* 4D1-8, 4G4-4, and 3T8-11 presented median IC₂₀ values of 25 mg L^{-1} , 26 mg L^{-1} and 27 mg L^{-1} respectively (Table S 20).

The most effective extract against *V. splendidus* strain was MMW-SPE, displaying a median IC₂₀ of 22 mg L^{-1} , followed closely by MMW-UF with a IC₂₀ of 25 mg L^{-1} , and LMW-SPE with a median IC₂₀ of 28 mg L^{-1} (Figure 4.3a). HMW-SPE presented a 2-to-3-times lower efficiency compared with the three other extracts with a median IC₂₀ of 70 mg L^{-1} , when it reached 20% growth inhibition. No inhibition was observed for *V. splendidus* 4D1-8 and 3T8-11. An important potency variability of the different extracts appeared when reaching higher growth inhibition levels, and the IC₅₀ obtained appeared more inconsistent than the IC₂₀. First, IC₅₀ was not reached when exposing *V. splendidus* strains to HMW-SPE, under the available concentration range (0 to 80 mg L^{-1}). Then, LMW-SPE displayed

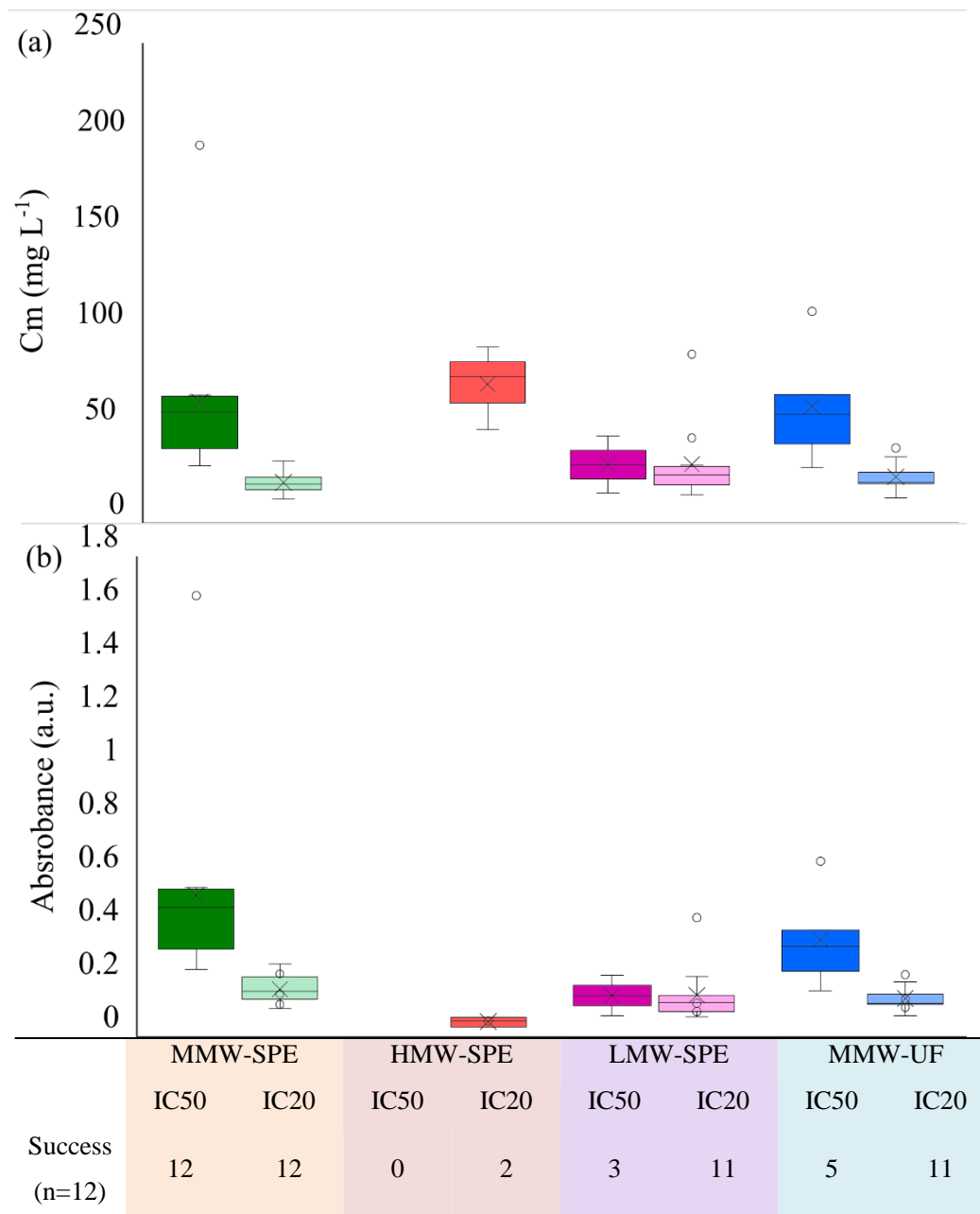


Figure 4.3 Marennine extract concentration inducing 50 (IC50) or 20% (IC20) of *V. splendidus* growth inhibition after 24h of exposition in LB2% NaCl. Both IC20 and IC50 are expressed in (a) mass concentrations (mg L⁻¹) and in (b) equivalent absorptivity (a.u.) according to the maximal absorbance of each extract. For each type of extract, IC50 is on the left (darker colour), and IC20 on the right (lighter colour). Box plots display the results observed for 4 strains of *V. splendidus* tested. The table displays the number of conclusive 20 or 50% growth inhibition observed (n=12)

the highest efficiency, with a median IC50 of 27 mg L⁻¹ but only reached such an

inhibition on 3 of the 12 clones tested (two clones of 4D1-8 and one clone of 4G1-8, Table S 19). Eventually, the most consistent inhibition responses were observed when *V. splendidus* strains were exposed to MMW-UF and MMW-SPE extracts. The growth inhibition activity of these two extracts was equivalent, with a median IC₅₀ of 58.2 mg L⁻¹ MMW-UF and 53.7 mg L⁻¹ for MMW-SPE, all strain considered. However, considering strains separately, MMW-SPE appeared to be the most reliable extract, displaying rather consistent performances, with 50% inhibition reached on 12 occasions (n=12), when MMW-UF induced 50% growth inhibition of *V. splendidus* only on 5 occasions (n=12), all strains considered.

Finally, on rare occasions, complete growth inhibition events were observed for LMW-SPE against *V. splendidus* 4D1-8 and 4G1-8 (data not shown). In this situation, the inoculation of LBA2%NaCl plates with well content of the well led to colony development, implying that if maximal inhibition was reached on scarce occasions the minimal bactericidal concentration was not.

This inhibition appeared to be related to the presence of marennine because EPS-H₂O did not exhibit antibacterial activity. Knowing the mass absorptivity of each extract, the relative absorbances of IC₂₀ and IC₅₀ were deduced. Such data transformation did not level the observed IC, implying that *V. splendidus* growth inhibition was not directly related to the absorptivity of the extract (Figure 4.3b).

Physicochemical analyses

UV-Visible

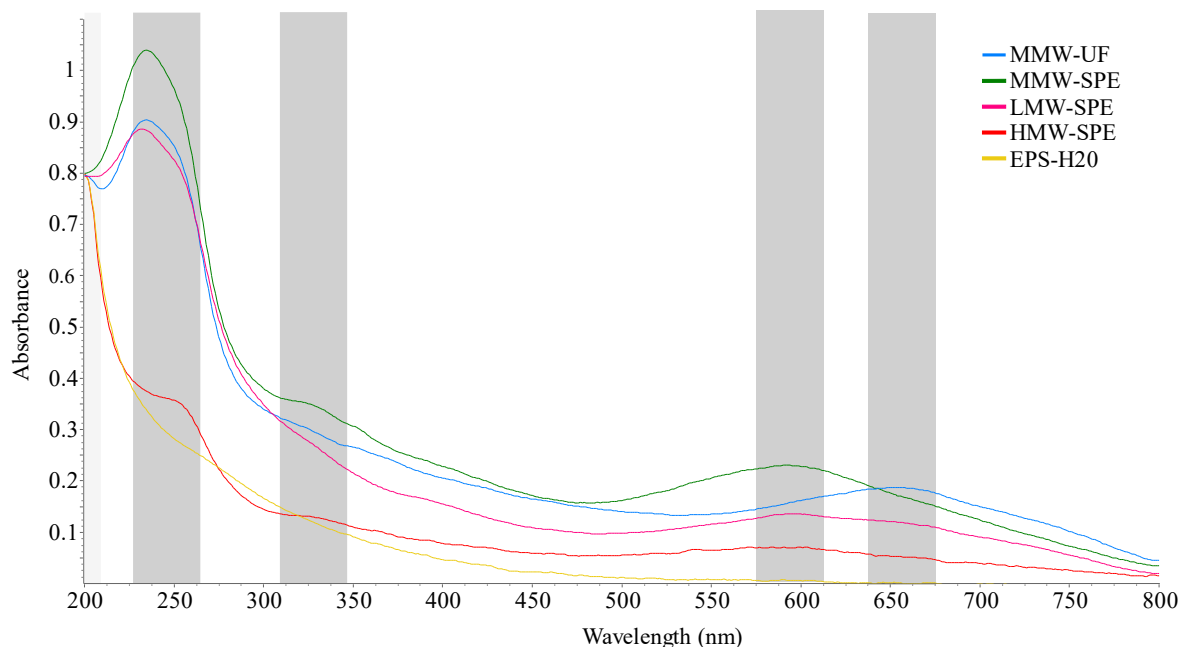


Figure 4.4 : UV-Visible spectra of the different blue water extracts at pH 7. Characteristic bands (grey area) are detailed in Table 4.1.

Table 4.1: UV-Vis bands and absorbance ratios of the different blue water extracts . EMn corresponds to the purified extract of reference, as proposed by Pouvreau *et al.* (2006a).

| | Absorbance | | | $234/\lambda_{Vis}$ | $320/\lambda_{Vis}$ | ϵ_m ($L\ cm^{-1}\ g^{-1}$) |
|-----------------|------------|--------|------------------------|---------------------|---------------------|--|
| | 234 nm | 320 nm | Abs(λ_{Vis}) | | | |
| MMW-SPE | 1.039 | 0.354 | 0.229(594) | 4.5 | 1.6 | 8.4 |
| HMW-SPE | 0.377 | - | 0.072(596) | 5.3 | - | 0.8 |
| EPS-H2O | 0.344 | - | - | - | - | - |
| MMW-UF | 0.908 | - | 0.190(648) | 4.8 | - | 6.0 |
| LMW-SPE | 0.891 | - | 0.141(600) | 6.3 | - | 5.1 |
| EMn (reference) | 0.85 | 0.32 | 0.23 (677) | 3.5 | 1.3 | 11.6 |

Physicochemical analysis revealed certain differences between the 5 extracts. UV-Vis spectral analysis differentiated them according to the position of EMn characteristic bands and absorbance ratios (Figure 4.4, Table 4.1). Spectra were compared to the reference spectrum proposed by Pouvreau *et al.* (2006a) of purified EMn ($M= 9.893\ kDa$), displaying three main absorbance bands at a pH equal to 8 : at 247, 322, and 677 nm. MMW-UF and MMW-SPE both displayed the UV band around 234 nm, and the main visible band expected

at 677 nm was observed at 594 nm for MMW-SPE extracts and at 648 nm for MMW-UF. Taking into account this shift, the ratios of these two bands were similar for both MMW-UF and MMW-SPE extracts, reaching 4.8 and 4.5, respectively, and were the closest to the 3.5 ratio of the purified EMn, compared with the other marennine-containing extracts studied. Other than the shift of the λ_{vis} , MMW-SPE differentiated from MMW-UF and the other marennine-containing extracts with the appearance of an absorbance band around 322nm, relating this spectrum to that of the purified EMn, with a ratio $322/\lambda_{\text{vis}}$ of 1.6. The two other marennine-containing extracts, LMW-SPE (MW<3kDa) and HMW-SPE (MW>30 kDa) also displayed λ_{vis} close to 600 nm and an absorbance band around 234 nm. However, compared to MMW-SPE, their $234/\lambda_{\text{vis}}$ ratio were higher implying the prominence of the band at 234 nm compared to the λ_{vis} absorbance. HMW-SPE was distinguished from the three other marennine-containing extracts with the 234 nm absorbance band being reduce to a shoulder to a high absorbance band around 200 nm. This relates HMW-SPE to the EPS-H2O fraction, which contained no more marennine, as confirmed by the absence of absorbance in the 677 nm region, and for which the UV-Vis spectrum only displayed an important increase in absorbance closer to 200 nm region.

The mass absorptivity of each extract, ϵ_m , was calculated to obtain an index qualifying the level of chromophore absorbance relative to the extract dry mass. The MMW-SPE displayed the highest absorptivity of $9.7 \text{ L cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ compared to the LMW-SPE and MMW-UF, for which the mass absorptivity, respectively 5.9 and $6.0 \text{ L cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$, implied a lower amount of chromophore per dry mass. Finally, HMW-SPE presented a very low mass absorptivity of $0.9 \text{ L cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$, implying a lower relative proportion of chromophore in this extract. Caution must yet be taken as the apparent relative proportion of chromophore might be biased with its accessibility and absorbance might be influenced by its environment.

ATR-FTIR

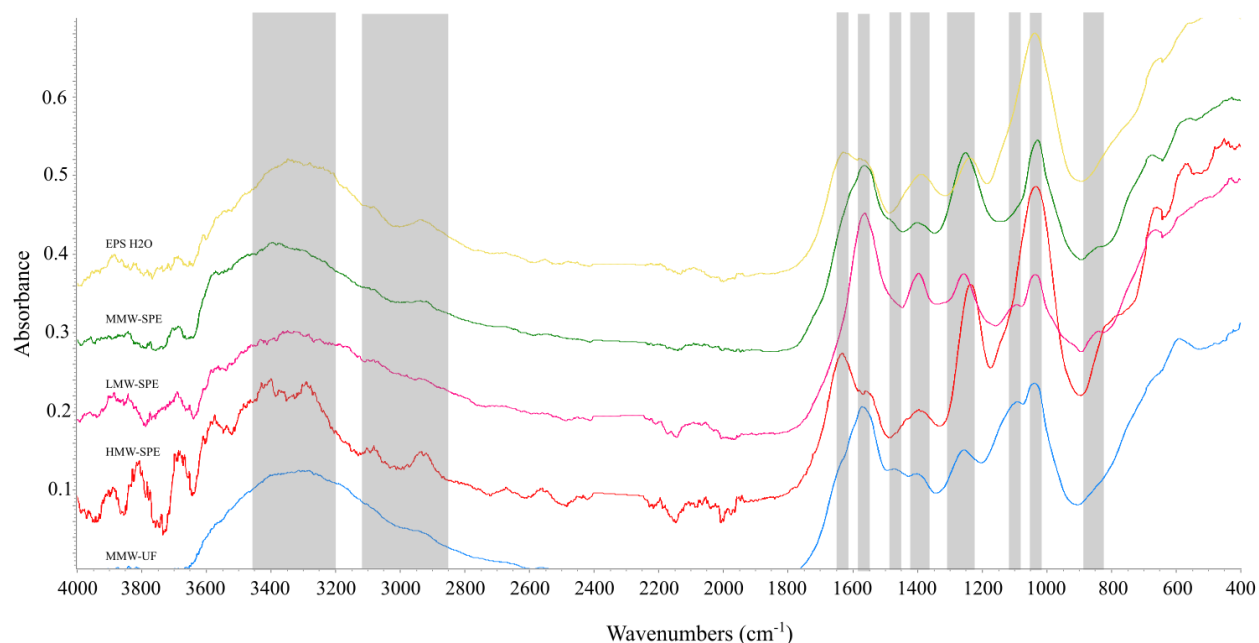


Figure 4.5 : ATR-FTIR spectra of the different blue water extracts. Characteristic bands (grey area) refer to assignments indicated in Table 4.2.

The ATR-FTIR spectra of the five different extracts studied are displayed in Figure 4.5, and Table 4.2 summarizes the bands observed and their potential assignments. The five extracts profiles presented common bands: the band centered around 3300 cm^{-1} corresponding to -OH stretching and the band at 1040 cm^{-1} corresponding to the C-C liaison associated with the pyran rings. These bands are typically found in polysaccharide extracts. All five extracts also presented a band around 1250 cm^{-1} which could be associated with both sulfate and acetyl groups vibrating. The MMW-UF and LMW-SPE extracts were distinguished from the other extracts by displaying a shoulder around 1090 cm^{-1} likely to correspond to the C-OH of the pyran rings stretching. All the extracts also displayed a band around 1400 cm^{-1} implying a carboxylate stretching. MMW-SPE, MMW-UF, and LMW-SPE related with their band around 1560 cm^{-1} also associated with stretching of the carboxylate anion. HMW-SPE and EPS-H₂O both displayed an important band around 1630 cm^{-1} likely to correspond to carbonyl group vibrating and absent in the other three extracts' spectra. A shoulder at 1470 cm^{-1} implying the presence of methyl groups, was observed only on the two intermediate molecular weight fractions, MMW-UF and MMW-SPE.

Table 4.2: ATR-FTIR characteristic bands and assignments referring to the bands shown on Figure 4.5.

| Experimental wavenumber (cm ⁻¹) | Characteristic equivalent wavenumber (cm ⁻¹) | Assignment | Reference |
|---|--|--|--|
| 3316 | 3200-3400 | -OH | (Bélanger <i>et al.</i> , 2020 ; Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022 ; Rani, 2017 ; Sanniyasi <i>et al.</i> , 2022) |
| 2930 | 2920-2930 | CH ₂ | (Bélanger <i>et al.</i> , 2020 ; Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022 ; Sanniyasi <i>et al.</i> , 2022) |
| 1633 | 1630-1640 | C=O C=C | (Bélanger <i>et al.</i> , 2020 ; Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022 ; Rani, 2017) (Sanniyasi <i>et al.</i> , 2022) |
| 1565 | 1560-1605 | COO- | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022 ; Noriega et Subramanian, 2011) |
| 1470 | 1525-1540 1455-1470 | O=C-NH-CH ₃ -CH ₃ | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022) (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022) |
| 1400 | 1400-1420 | COO ⁻ | (Bélanger <i>et al.</i> , 2020 ; Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022) |
| 1250 | 1245-1255 1240-1250 | S=O O-Ac | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022) (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022) |
| 1100 | 1075-1165 | C-OH | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022 ; Sanniyasi <i>et al.</i> , 2022) |
| 1040 | 1020-1030 | C-C (ring) | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022 ; Sanniyasi <i>et al.</i> , 2022) |
| 845 | 840-850 845 | Glycosidic linkage S=O | (Borjas Esqueda <i>et al.</i> , 2022 ; Sanniyasi <i>et al.</i> , 2022) (Bélanger <i>et al.</i> , 2020 ; Rani, 2017) |
| 800 | 803 | S=O | (Bélanger <i>et al.</i> , 2020 ; Rani, 2017) |

Finally, the MMW-SPE and LMW-SPE spectra showed a common shoulder peaking at 845 cm⁻¹, which could be due to a glycosidic bond or a sulfate stretching, both potentially masked in the other spectra. The major differences that discriminated the extracts from one another resulted from the relative proportion of the band observed at 1560 cm⁻¹ and the one vibrating at 1040 cm⁻¹. LMW-SPE displayed a predominant band at 1560 cm⁻¹, while MMW-UF and

MMW-SPE both displayed relative equivalence between these two bands. On the other hand, HMW-SPE and EPS-H2O presented spectra where 1040 cm^{-1} band was prominent.

Carbohydrate determination

Carbohydrate content (Figure 4.6a) revealed a certain heterogeneity between the different extracts. LMW-SPE appeared to have the lowest carbohydrate content, reaching $0.028 \pm 0.002 \text{ mg}_{\text{eq.Glucose}} \text{ mg}_{\text{DW}}^{-1}$, followed by MMW UF and MMW-SPE, displaying 0.083 ± 0.004 and $0.129 \pm 0.002 \text{ mg}_{\text{eq.Glucose}} \text{ mg}_{\text{DW}}^{-1}$, respectively. HMW-SPE and EPS-H2O presented the highest carbohydrate content, reaching $0.28 \pm 0.01 \text{ mg}_{\text{eq.Glucose}} \text{ mg}_{\text{DW}}^{-1}$, more than 5 times the content found in LMW-SPE, and around 2 times the amount in both MMW extracts. The composition ratio (Figure 4.6b), which corresponds to the ratio between the marennine chromophore content and the measured carbohydrate content, revealed that LMW-SPE presented the highest chromophore purity level, reaching $15 \pm 1 \text{ mg}_{\text{EMn}} \text{ mg}_{\text{eq.Glucose}}^{-1}$. MMW-SPE and MMW-UF presented similar level of chromophore purity, with a composition ratio three-times lower than LMW-SPE, reaching 5.38 ± 0.08 and $6.0 \pm 0.3 \text{ mg}_{\text{EMn}} \text{ mg}_{\text{eq.Glucose}}^{-1}$, respectively. Meanwhile, HMW-SPE appeared to have the lowest level of marennine chromophore purity, with $0.24 \pm 0.01 \text{ mg}_{\text{EMn}} \text{ mg}_{\text{eq.Glucose}}^{-1}$ implying a relatively low carbohydrate content compared with the amount of chromophore in this extract.

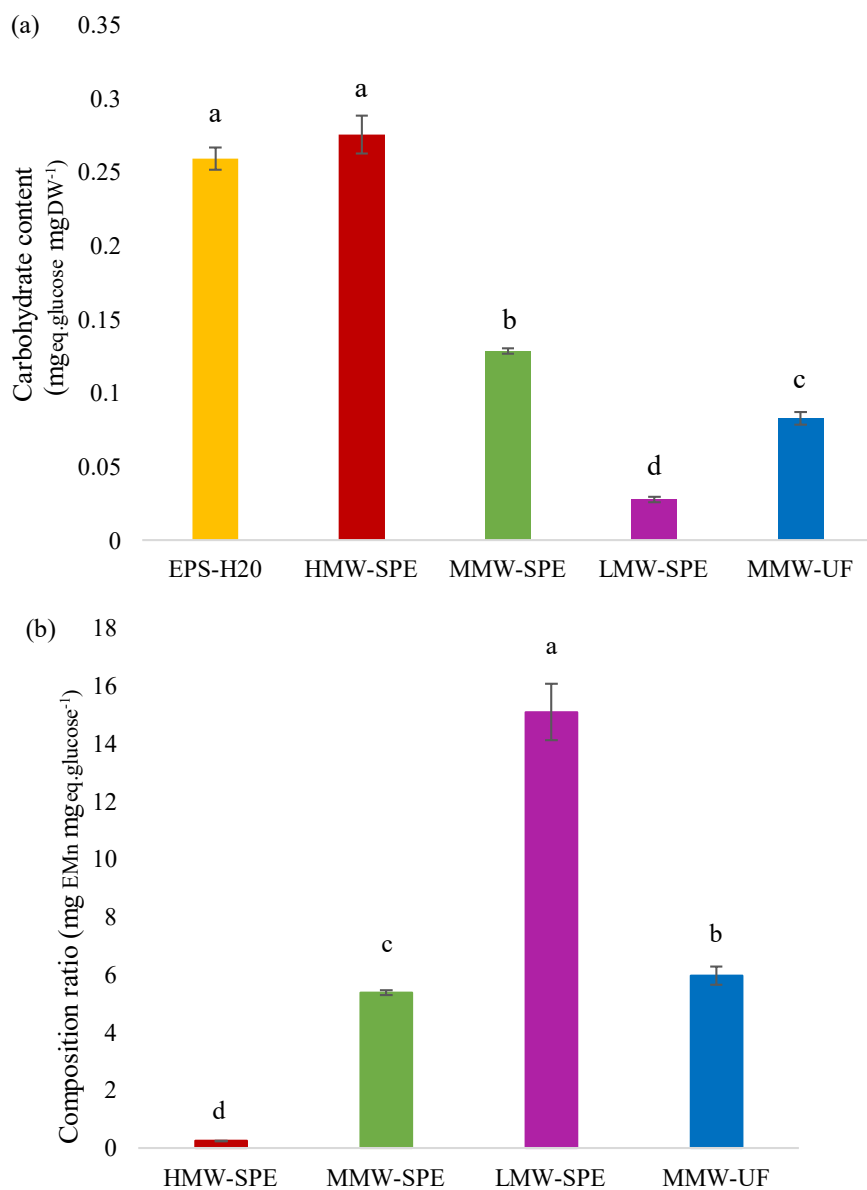


Figure 4.6 : Marennine extract (a) carbohydrate content (mg_{eq,Glucose} mg_{DW}⁻¹) and (b) composition ratio (mg_{EMn} mg_{eq,Glucose}⁻¹). Results are expressed as mean ±sd (n=3). Different letters indicate significant group difference (ANOVA, LSD; p < 0.05)

4.2.4 Discussion

Our results confirm the antioxidative and antibacterial properties of marennine, supporting their potential use as postbiotic in aquaculture (Bondad-Reantaso *et al.*, 2023). However, the different refining processes of marennine extracts affect largely the bioactivities and seem related to their physicochemical characteristics as discussed below.

Improvement of extract bioactivities following SPE and ionotropic gelation

The DPPH radical scavenging assay enabled to test the antioxidant capacity of the different extracts. Considering the mass concentration of each of the five extracts enabling to reach IC50 and IC20, significantly differences have been observed. The MMW-SPE was the most effective blue fraction and HMW-SPE was the least effective, ranking just above EPS-H2O. The later is composed of hydrosoluble co-products of blue water but no marennine (no chromophore detected by UV-Visible spectroscopy). Thus, the addition of the purification steps proposed by Bélanger *et al.* (2020, *submitted*) enabled the antioxidant potential of the marennine extract to be improved by five times, from MMW-UF reaching a Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of 0.15 to MMW-SPE reaching a TEAC of 0.88. This means that the marennine extract MMW-SPE was only 10% less efficient than Trolox, a conventional antioxidant compound, under these experimental conditions. This result confirms marennine extract as potential compound agent to reduce oxidation (Istomina *et al.*, 2021 ; Lattos *et al.*, 2023).

For all *Vibrio* strains used, three moderately virulent and one non-virulent strains isolated from oyster tissues (Oyanedel *et al.*, 2020) some marennine extracts showed important bacterial growth inhibition. These results encourage its potential use as an alternative to synthetic antibiotics in the aquaculture (Bondad-Reantaso *et al.*, 2023). However, the five extracts showed differential antibacterial activities without correspondence to the pattern of variability observed for radical scavenging activity. EPS-

H₂O was the only extract displaying no significant growth inhibition activity, encouraging to study further the exopolymer extracts of *H. ostrearia* digestibility by *Vibrio*. Moreover, removal of this co-extract, following the ionotropic gelation, allowed further purification of the bioactive part of BW. This bioactive fraction was recovered in all three SPE marennine-containing extracts, further fractioned according to their molecular weight, MMW-SPE, LMW-SPE and HMW-SPE, as demonstrated by their growth inhibition activity on the four strains tested of *V. splendidus*. However, variability in the inhibition response was observed, allowing differentiation between each SPE extract. HMW-SPE displayed the lowest inhibition capacity with growth inhibition response observed at the relatively high mass concentration of 50 mg L⁻¹. This inhibition response was however higher than EPS-H₂O extract (Figure S. 7). The highest growth inhibition responses were achieved with LMW-SPE, but with an important variability between clonal replicates, suggesting a random factor in the composition of the extract, which could induce bacterial response variability. MMW-SPE displayed an inhibition response equivalent to MMW-UF, according to their median IC₂₀, but with lower variability from one clone to another and from one strain to another. Thus, we suggest that ionotropic gelation step, removing EPS coextracts, seem to select the active part of BW. Further fractioning using ultrafiltration also appeared essential to the bioactive extract preparation, to remove part of the non-determined random factor causing high response variability, thus improving the consistency of the bacterial growth inhibition response. Further analyses should help determining the nature of such factor.

Impact of refining steps on the physicochemical nature of the extracts

The quality differences brought to the fore with the bioassays illustrated the consequences of the refining steps on the bioactivity of marennine extracts. Such consequences resulting from modifications of the extract composition, a better understanding of the impact of each steps on the extract physicochemical nature is relevant.

The composition variability between MMW-UF and SPE extracts, linked to the addition of the SPE and ionotropic gelation, is expected to be related to the removal of coextracts to the marennine originating from culture supernatant. Such a preparation process

selects extracts based on their non-covalent interactions and is not selective. Thus, marennine, as a polyanion, and other anionic polymers presents in the mixture are likely to be retained on the carbon phase by electrostatic interaction. The following ionotropic gelation using a cation enable to further separate such aggregations. EPS-H₂O represents the hydrosoluble fraction of the removed coextracts, initially found in the BW. Its UV-Vis spectrum confirmed that it is chromophore free, and its ATR-FTIR spectrum as well as its high total carbohydrate content dosage supported the absence of marennine and the partial polysaccharide nature of this extract. MMW-SPE corresponds to a molecular weight fraction of BW equivalent to that of MMW-UF but after supplementary SPE and ionotropic gelation. The chromophore is the main indicator of the presence of marennine inside an extract. Thus, the efficiency of marennine purification approach is supported by an increase in the mass absorptivity (ϵ_m) from MMW-UF to MMW-SPE, indicating an increase in the chromophore absorbance per dry mass. In agreement with Bélanger *et al.* (*submitted*), and according to the ϵ_m , the level of purification is not at its maximum compared with the purified fraction obtained by semi-preparative chromatography (Pouvreau *et al.*, 2006a), and the presence of remaining coextracts cannot be ruled out. To this matter, ATR-FTIR analysis, with the signal reduction at 1100 cm⁻¹ from MMW-UF to MMW-SPE, combined with the composition ratio ($\text{mg}_{\text{EMn}} \text{ mg}_{\text{eq.glucose}}^{-1}$) obtained with the carbohydrate dosage, revealed a higher relative amount of marennine to total carbohydrate amount in MMW-UF than MMW-SPE. In addition, EPS-H₂O, fraction excluded during the ionotropic gelation steps, presented a twice as high carbohydrate content ($\text{mg}_{\text{eq.glucose}} \text{ mg}_{\text{DW}}^{-1}$) as both MMW extracts. These results combined suggested that, if the addition of the ionotropic gelation following the SPE induce the removal of polysaccharides co-extract (*i.e.* EPS-H₂O) by influencing ionic interactions of the mixture (Polaczek *et al.*, 2007), it also appears to have concentrated the marennine, a heteropolysaccharide, meanwhile removing non-carbohydrate co-extracts present in MMW-UF. To support this hypothesis, the observed hypsochromic shift in all SPE-resulting fractions UV-Visible spectra compared to MMW-UF UV-Visible spectra also implies a change in the chromophore molecular environment (Pakhomov *et al.*, 2006 ; Rathnachalam *et al.*, 2021 ; Tsoraev *et al.*, 2022).

Impact of the ultrafiltration steps can be deduced from HMW-SPE, LMW-SPE and MMW-SPE comparison. LMW-SPE corresponded to the fraction of the SPE-resulting extract of a molecular weight lower than 3 kDa. Despite purified EMn being expected to reach a mean molecular weight of 9.9 kDa (Pouvreau *et al.*, 2006a), LMW-SPE appears to contain marennine fraction. Indeed, LMW-SPE displayed an equivalent ϵ_m than MMWUF extract, but less than that of MMW-SPE, and the highest composition ratio ($\text{mg}_{\text{EMn}} \text{mg}_{\text{eq.glucose}}^{-1}$). The ATR-FTIR spectrum of this extract can be distinguished from the other extracts by the especially low signal of the 1040 cm^{-1} bands, which could be associated with the polysaccharidic part of EPS (Borjas Esqueda *et al.*, 2022 ; Noriega et Subramanian, 2011), and counterbalanced by a relatively high signal at 1560 cm^{-1} associated to a carboxyl functional group of polysaccharides (Borjas Esqueda *et al.*, 2022 ; Sanniyasi *et al.*, 2022). Such profiles, combined with the low carbohydrate content of this extract, could be interpreted as a lower relative amount of polysaccharides in LMW-SPE. Eventually, considering that purified EMn molecular weight is 9.9 kDa, it is likely that LMW-SPE corresponds to the degradation product of marennine, and its composition might contain small oligosaccharides, holding bioactive functional group such as carboxyl function, and with or without chromophore attached to their structure. On the other hand, HMW-SPE corresponds to the high molecular weight fraction of SPE-extracted marennine. This extract presented a particularly low ϵ_m and composition ratio ($\text{mg}_{\text{EMn}} \text{mg}_{\text{eq.glucose}}^{-1}$) implying a low proportion of the chromophore in this fraction. Compared with MMW-UF, MMW-SPE, and LMW-SPE, the ATR-FTIR spectrum of HMW-SPE implies a mainly polysaccharidic nature, as confirmed by its total carbohydrate content, bringing this extract closer to the profile of EPS-H₂O. Thus HMW-SPE could correspond to marennine molecule still linked to other EPS through ionic interaction maintained despite ionotropic gelation. The possibility of a molecule of marennine of which polysaccharidic skeleton present a higher level of polymerisation cannot be ruled out, and further structural analysis should be performed to differentiate the extracts.

Understanding the underlying chemical mechanisms of marennine bioactivities

The results of the present study showed that the removal of co-extracts found in BW from marennine improved the potency of the scavenging activity of the pigment and the reliability of both its antioxidant and bacterial growth inhibition capacity.

Regarding the radical scavenging activity of marennine extracts, it was observed that MMW-UF differed from the three others marennine-containing extracts, MMW-SPE, HMW-SPE, and LMW-SPE, being 2 to 3 times less efficient, after transforming measured IC₅₀ and IC₂₀ to their equivalent chromophore absorbance (Figure 4.2b). This result shows that radical scavenging efficiency is mainly related to the abundance of chromophores in the extract and its molecular environment. Although it cannot be ruled out that the polysaccharide skeleton of marennine may also present some antioxidant activities, which were not quantified using a DPPH assay. Indeed, polysaccharides have been previously associated with such bioactivities (Friedman, 2016 ; Tiwari *et al.*, 2017 ; Yuan *et al.*, 2020), and the EPS-H₂O fraction, a non-marennine-containing extract, demonstrated significant DPPH inhibition, but with lower efficiency. Yet, the lower antioxidant efficiency of the solely ultrafiltrated extract (MMW-UF) implied that the additional SPE combined with ionotropic gelation apparently remove co-extracted exopolymers such as EPS-H₂O, which could be found in the final composition of MMW-UF, hindering the radical scavenging active sites of marennine. The marennine chromophore structure is suspected to take the form of an aromatic aglycon (Gastineau *et al.*, 2014 ; Zebiri *et al.*, 2023), such as a phenolic compound (Pouvreau *et al.*, 2006a). Such compounds are acknowledged for their scavenging properties, which originate from hydroxyl groups and depend on their position, and molecular environment (Heim *et al.*, 2002 ; Zeb, 2020). Because the DPPH assay is highly sensitive to the level of hindrance of the hydroxyl group (Schaich *et al.*, 2015), the results of this study support the hypothesis that the radical scavenging activity of marennine originates from a phenolic chromophore. Meanwhile, the molecular weight (MW) of the extract did not appear to influence the activity of the chromophore, as HMW-SPE induced the same inhibition

response as MMW-SPE and LMW-SPE at equivalent absorbance. This implies that other marennine moieties are unlikely to influence radical scavenging ability, as long as the chromophore remains accessible. Thus, the lower antioxidant efficiency of MMW-UF compared with that of the SPE extracts could result from the coextracts remaining after the solely double ultrafiltration. Their presence could reduce the accessibility of the marennine active site or also presents other bioactive mechanisms that could interfere with the antioxidant reaction (Schaich *et al.*, 2015). Eventually, this hypothesis is supported by the available data regarding marennine antioxidant capacity found in the literature. The IC₅₀ of purified marennine (BW-AE800) determined by Pouvreau *et al.* (2008a), once transformed according to the molar ratio of marennine to DPPH in solution ($\text{mol}_{\text{EMn}}/\text{100 mol}_{\text{DPPH}}$), predicted 50% radical scavenging at 3 $\text{mol}_{\text{EMn}}/100 \text{ mol}_{\text{DPPH}}$ while to reach the same inhibition, MMW-SPE needed to reach 10 $\text{mol}_{\text{EMn}}/100 \text{ mol}_{\text{DPPH}}$. The differences between Pouvreau *et al.* (2008a) results and the results of this study support the presence of coproducts hindering the accessibility of the marennine chromophore as the main factor influencing its scavenging activity.

The differences observed regarding the antibacterial activity of the five extracts were more subtle, and the sole chromophore abundance of the different extracts did not explain the observed antibacterial response variability. These results support that the underlying mechanisms of this bioactivity might be more complex than those of the radical scavenging activity. The bacterial growth inhibition of marennine extracts could originate from the polysaccharidic backbones of marennine (Wang *et al.*, 2021), its synergistic action with the chromophores (Bouarab-Chibane *et al.*, 2019), or being the consequence of several antibacterial mechanisms, originating from both moiety, all resulting *in fine* in *Vibrio* growth inhibition. The removal of the coextracts with purification appeared to improve the reliability of the growth inhibition response while fractioning during ultrafiltration appeared to influence the inhibition response potency. Both reliability – here based on the repeatability of the growth inhibition response – and the potency of the bacterial response are likely to relate to the accessibility of the active sites of the marennine extract to the bacteria. Indeed, the presence of coextracts and higher molecular weight compounds are likely to prevent close

access to bacterial membranes (Garcia *et al.*, 2020 ; Liu *et al.*, 2017 ; Wang *et al.*, 2021), which could both explain the lower reliability of MMW-UF and the lower efficiency of HMW-SPE. Conversely, reducing coextracts and molecular weight could eliminate the hindrance of active sites, and facilitate access to the bacterial membrane respectively. Thus, the active sites might be related to the chromophore or its PS backbone, but its actual potential to induce an inhibition activity might depend on its ability to get close enough to the bacterial membrane. This hypothesis would explain the observed scarce events of high growth inhibition by LMW-SPE. This low molecular weight extract (<3 kDa) displayed a lower relative carbohydrate content and signal related to carboxylate groups are prominent on its ATR-FTIR spectrum. This functional group could relate to the presence of uronic acid units of the polysaccharide backbones. Such a profile appeared to be the best suited to get closer to the bacterial membrane, and uronic acid, such as galacturonic or glucuronic acid have been associated to bacterial growth inhibition activity of polysaccharides (Ayrapetyan *et al.*, 2021 ; Zhang *et al.*, 2022a). However, as previously stipulated, LMW-SPE is likely to result from marennine and co-products degradation. Such a heterogeneous mixture of compounds, still holding or not active sites could explain the unpredictable growth inhibition response observed.

Regarding the active sites, the increase of potency associated to an increase of mass absorptivity suggests that the active sites are carried by the marennine itself rather than a coextract from BW. However, it does not allow us to conclude whether bioactivity is rather brought by the chromophore aglycon or its polysaccharide skeleton. The presence of sulfate groups on the polysaccharide backbones of marennine (Bélanger *et al. submitted*), as well as uronic acid as suggested by the ATR-FTIR spectra, and the hypothesized phenolic nature of the marennine chromophore might all explain the antibacterial activity (Bouarab-Chibane *et al.*, 2019). Sulfate groups could improve the antibacterial activity of compounds by interacting with proteins, such as receptors or growth factors of the outer membrane (Feng *et al.*, 2021 ; Jun *et al.*, 2018 ; Lu *et al.*, 2021), as well as phenolic compounds, which have been associated with the rigidification of the bacterial membrane (Phan *et al.*, 2014). Uronic acids of polysaccharides have been associated to membrane disruption of some bacterial

strain (Zhang *et al.*, 2022a) and bacteriostatic activity (Ayrapetyan *et al.*, 2021). Other polysaccharides containing such acid units have been observed to inhibit bacterial biofilm formation (Jiang *et al.*, 2021). Confirming the presence of these functional groups could explain membrane stiffening response of *Vibrio* when exposed to marennine extract (Bouarab-Chibane *et al.*, 2019 ; Bouhlel *et al.*, 2021 ; Laroche, 2022). Indeed, as previous work highlighted, the structure of marennine is unlikely to act as an intracellular inhibition factor, for its mean molecular weight is expected to be (Bouhlel *et al.*, 2021 ; Tardy-Laporte *et al.*, 2013) close to 10 kDa (Bouhlel *et al.*, 2021 ; Neidhardt *et al.*, 1994). Instead an interaction is more likely to occur with bacterial outer membrane LPS, (Bouhlel *et al.*, 2021 ; Tardy-Laporte *et al.*, 2013). This could be explained by active groups carried by polysaccharide, such as sulfates groups, carboxyl groups as well as a phenolic chromophore and would induce negative consequences on bacterial biofilm development or the pathogenicity of the strain. The complexity of the response of *Vibrio* facing marennine remains to be further studied to figure if the antibacterial response results from synergy work between its chromophores and its polysaccharide backbones both moiety inducing complementary mechanism, as it has been hypothesized for similar molecular structure (Vunduk *et al.*, 2019 ; Wang *et al.*, 2021). Also, Zebiri *et al.* (2023) structural analyses of marennine did not reveal the presence of sulfate or carboxyl groups. Yet the harsh hydrolysis conditions used to allow the determination of the structure might have altered its composition, refraining to detect these potential functional groups. To confirm these hypotheses, a dosage of sulfates and carboxyl groups in each extract should be carried out and results compared to their bioactivities efficiencies. Separate purification of the chromophore remains to be achieved to allow the confirmation of its expected phenolic structure and its separate study from the polysaccharide moiety.

4.2.5 Conclusion and perspectives

Marennine have been suggested to be used as an alternative to synthetic antibiotics in aquaculture. However, the preparation of the extract must be cost-efficient and guaranty an interesting level of bioactivity of the extract to promote its use. In this study, we showed that

the addition of solid-phase extraction and ionotropic gelation to the double ultrafiltration process used up to now enable to efficiently remove part of marennine co-products found in culture supernatant. Doing so, the extract bioactivities appeared improved. With the use of this refining approach, over 80% of bacterial growth inhibition was observed with a high level of replicability. This extract could also be used for its improved antioxidant efficiency. This study provides new clues regarding the chemical origin of these improvements. On one hand, antioxidant activity seemed strongly correlated with the amount and accessibility of marennine chromophore. Meanwhile, steric hindrance of the bioactive compound could be the major factor impacting marennine antibacterial activity, by modulating bacterial membrane accessibility. Future work should focus on the impact of SPE-resulting marennine extract on bivalve physiology, to ensure that it induces the expected bioactivities without inducing the stress induced by its purified equivalent.

Acknowledgments

This research work is part of a project that has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement N° 734708/GHaNA/H2020-MSCA-RISE-2016 (J.-L.M.) and was supported by the Ressource Aquatiques Québec (RAQ) Research Network supported by the Fonds de Recherche du Québec-Nature et Technologies N° 2014-RS-171172. This work also received funding from the Institut France-Québec pour la coopération scientifique en appui au secteur maritime (IFQM) and Nantes Université for E.P.'s PhD position.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this study.

4.3 SUPPLEMENTARY MATERIALS: COMPREHENSIVE QUALITY ANALYSES OF BENTHIC DIATOM BLUE PIGMENT EXTRACT AS POSTBIOTIC IN AQUACULTURE.

Elodie Pedron^{1,2}, Marylise Duperthuy³, Annabelle Mathieu-Denoncourt³, William Bélanger¹, Céline Laroche⁴, Olivier Gonçalves², Anthony Massé², Réjean Tremblay¹, Jean-Sébastien Deschênes¹

¹Institut des sciences de la mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, Rimouski, Canada

²GEPEA, CNRS UMR 6144, Nantes Université, Oniris, Saint-Nazaire, France

³ Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada

⁴ Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, Institut Pascal, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France CNRS, UMR 6602, IP, F-63178 Aubière, France

***Corresponding author:** Elodie Pedron, pedronelodie@gmail.com

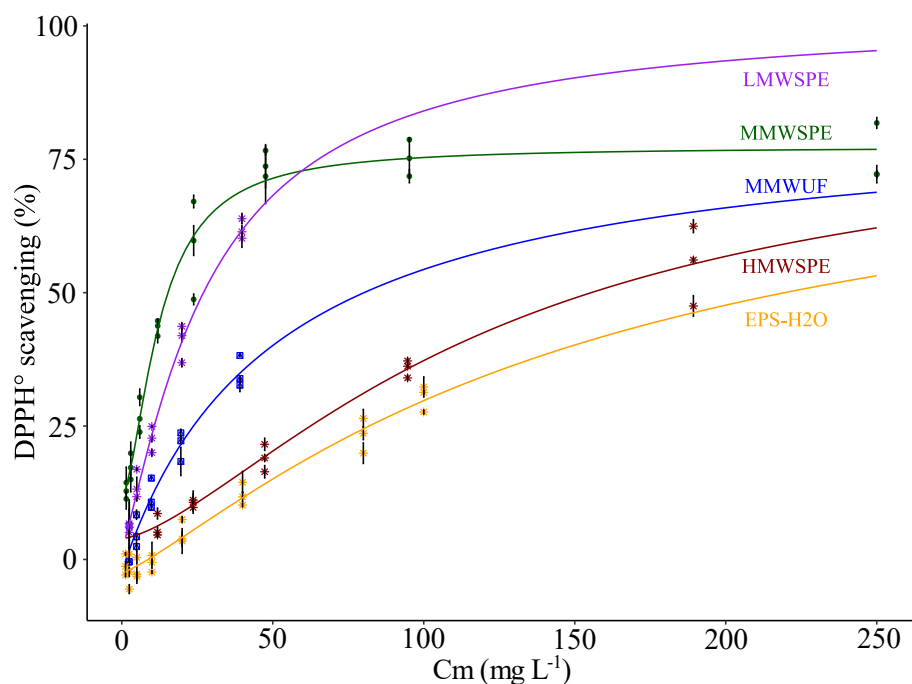


Figure S. 6: Dose-response curve of the scavenging effect of marennine extracts on the DPPH (diphenyl picrylhydrazyl) radical. The concentrations of marennine are expressed as the final concentration in the reaction mixture (C_m mg L^{-1}). The percentage values are means of three replicates \pm sd and each extract has been tested 3 times.

Table S 18 : Marennine extracts concentration inducing 20 (IC20) or 50% (IC50) of DPPH scavenging. Both IC20 and IC50 are expressed in mass concentrations (mg L^{-1}) and its equivalent absorbance (a.u.) according to the chromophore maximal absorbance of each extract. Results are expressed as mean \pm sd ($n=3$). Different letters indicate significant group difference (ANOVA, LSD; $p < 0.05$, $R^2_{\text{Abs50}} = 0.72$, $R^2_{\text{IC50}} = 0.69$, $R^2_{\text{Abs20}} = 0.95$, $R^2_{\text{IC20}} = 0.98$). ANOVA and Fisher LSD results are detailed beneath the results table.

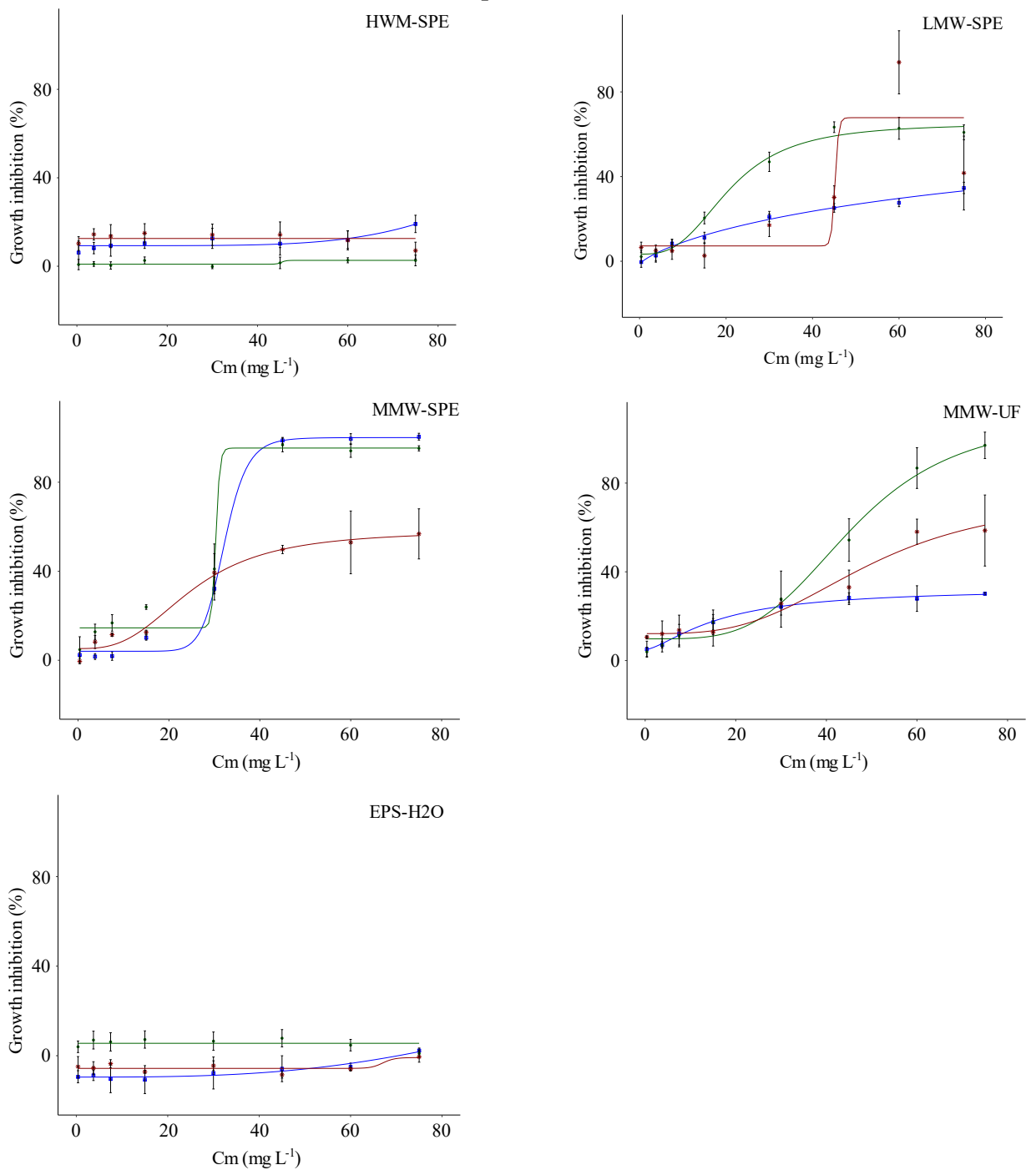
| Extract | IC50 mg L^{-1} | Abs50 | IC20 mg L^{-1} | Abs20 |
|---------|-------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| MMW-SPE | 15.6 \pm 3.1 a | 0.151 \pm 0.030 a | 4.0 \pm 0.4 a | 0.039 \pm 0.004 a |
| HMW-SPE | 235.1 \pm 154.8 c,d | 0.216 \pm 0.142 a | 50.4 \pm 3.1 d | 0.046 \pm 0.024 a |
| LMW-SPE | 27.0 \pm 2.2 b | 0.158 \pm 0.013 a | 8.4 \pm 1.3 b | 0.050 \pm 0.007 a |
| MMW-UF | 106.6 \pm 59.3 c | 0.636 \pm 0.354 b | 17.8 \pm 2.9 c | 0.106 \pm 0.017 b |
| EPS-H2O | 261.2 \pm 83.8 d | N/A | 65.0 \pm 9.5 e | N/A |

| Effect | DF | SS | MS | F | P-value |
|-----------|----|-------|-------|---------|------------|
| IC50 | | | | | |
| Extract | 3 | 0,092 | 0,031 | 4,462 | 0,040* |
| Residuals | 8 | 0,055 | 0,007 | | |
| Abs50 | | | | | |
| Extract | 3 | 0,533 | 0,178 | 5,018 | 0,030* |
| Residuals | 8 | 0,284 | 0,035 | | |
| IC20 | | | | | |
| Extract | 3 | 0,004 | 0,001 | 260,814 | <0,0001*** |
| Residuals | 8 | 0,000 | 0,000 | | |
| Abs20 | | | | | |
| Extract | 3 | 0,010 | 0,003 | 37,675 | <0,0001*** |
| Residuals | 8 | 0,001 | 0,000 | | |

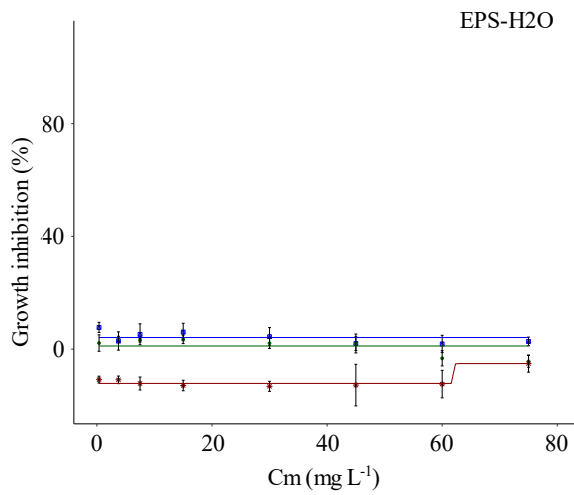
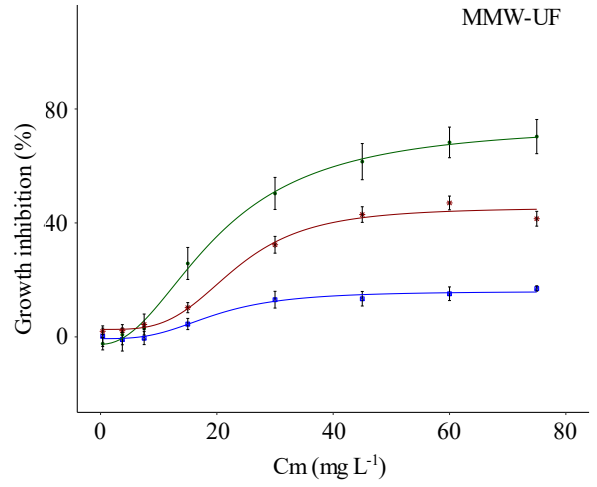
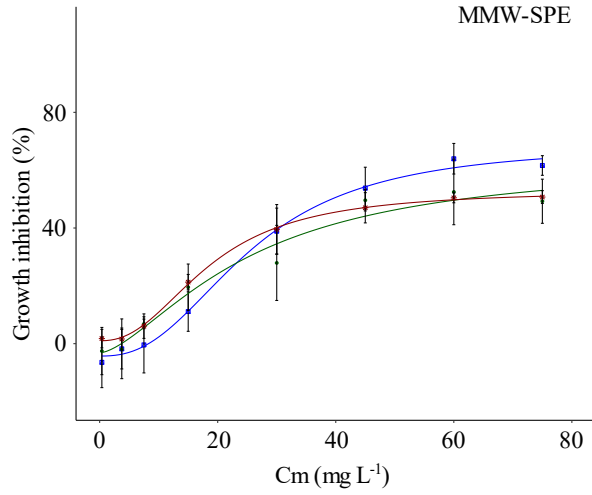
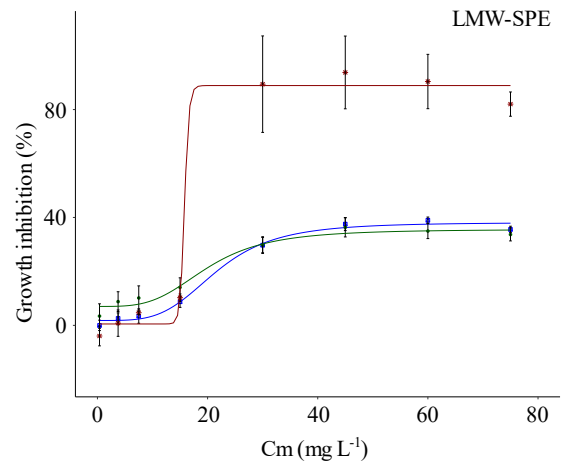
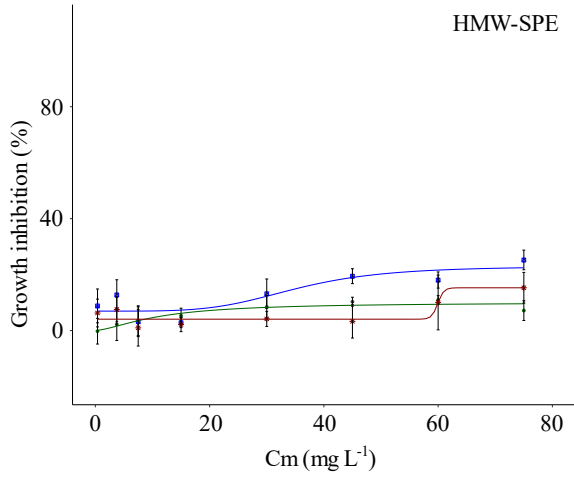
| Fisher's LSD | DF | t-value | LSD |
|--------------|----|----------|-------|
| IC50 | 8 | 2.306004 | 0.156 |
| Abs50 | 8 | 2.306004 | 0.354 |
| IC20 | 8 | 2.306004 | 0.004 |
| Abs20 | 8 | 2.306004 | 0.018 |

Figure S. 7: *Vibrio splendidus* dose-response curves after 24h of exposition to marennine extracts. Four strains have been tested, 4D1-8, 4G1-8, 4G4-4, 3T8-11. Marennine concentrations are expressed as the final concentration in the reaction mixture (C_m mg L⁻¹). Percentage values are means of three replicates \pm sd, each extract has been tested three times.

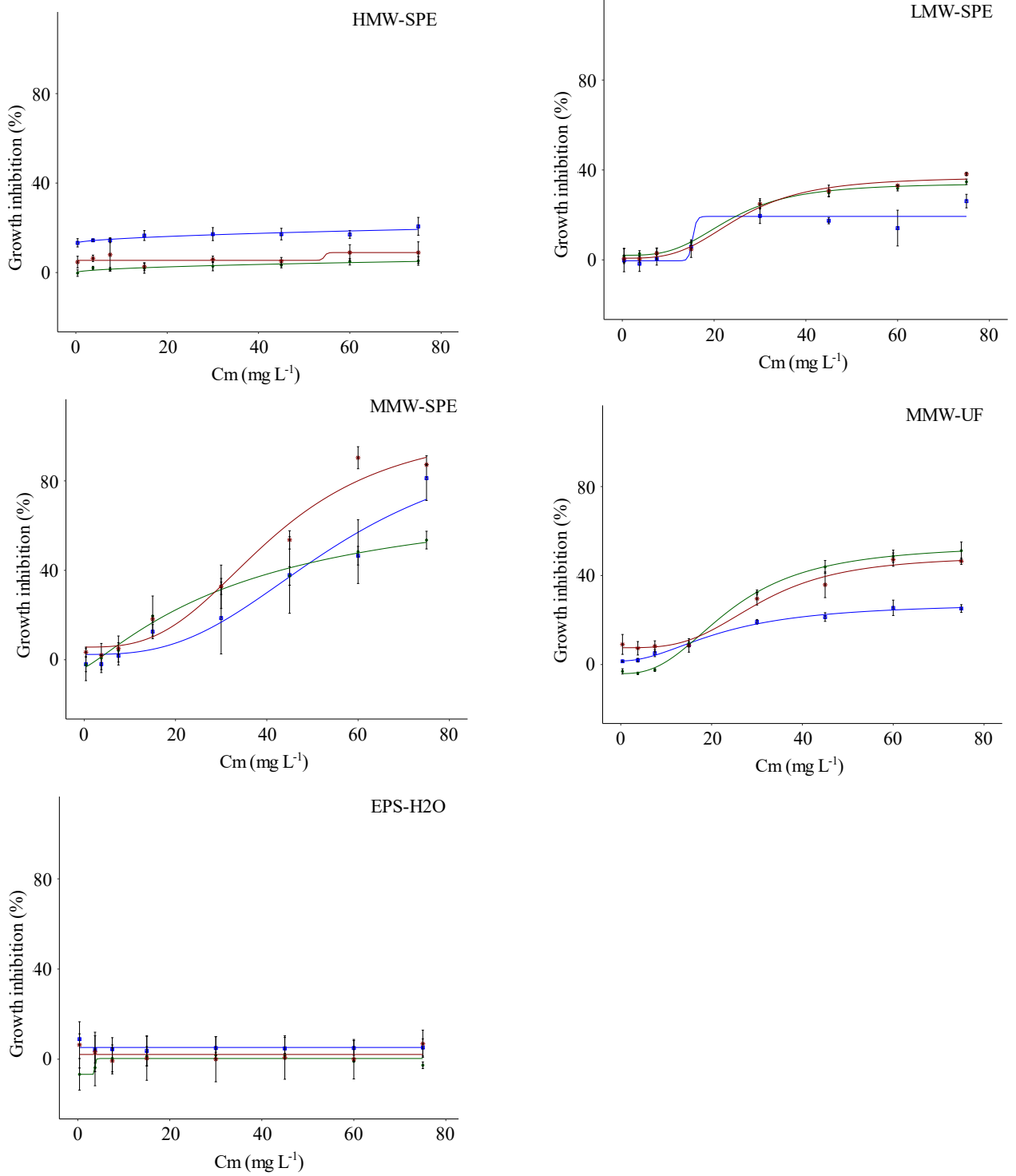
***V. splendidus* 4D1-8**



V. splendidus 4G1-8



V. splendidus 4G4-4



V. splendidus 3T8-11

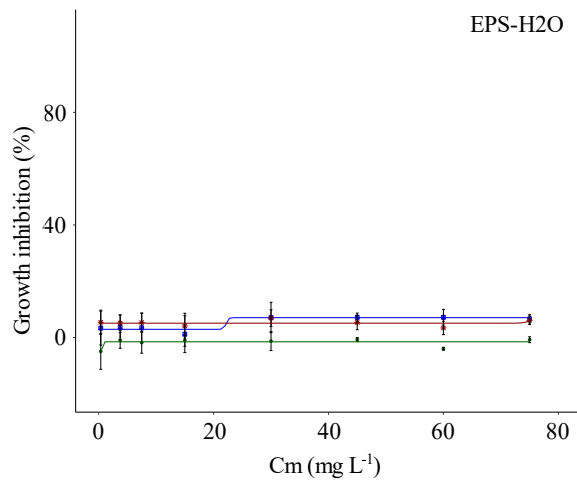
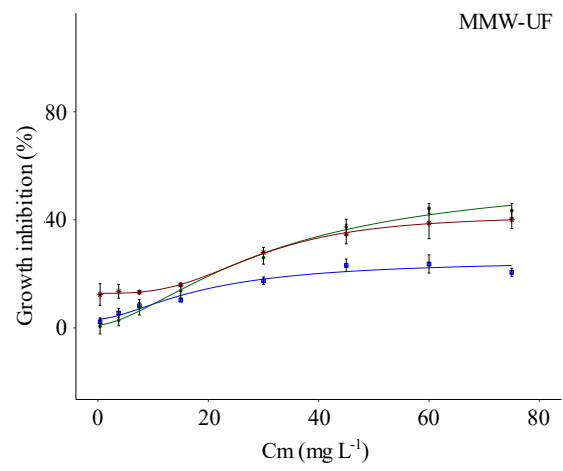
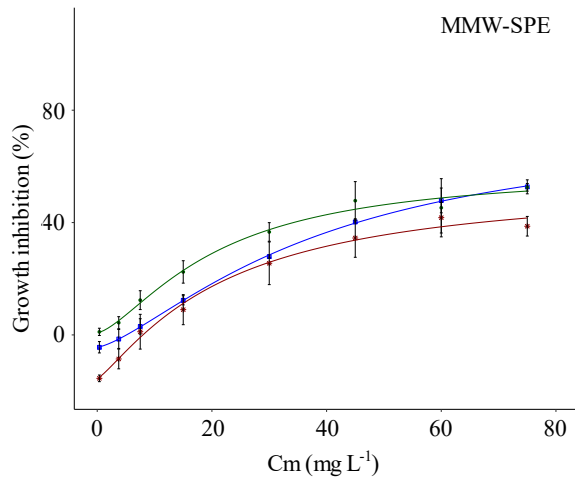
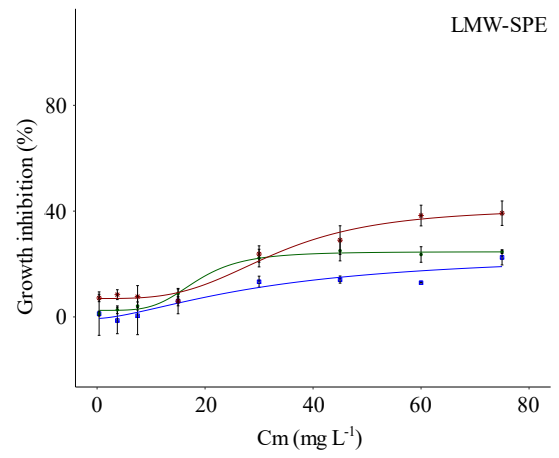
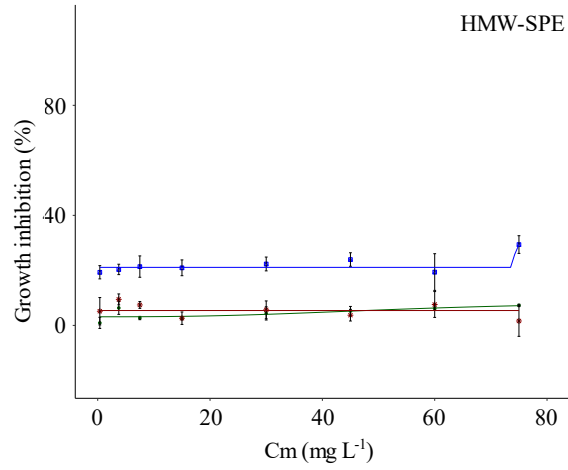


Table S 19 : Marennine extracts concentration inducing 20 (IC20) or 50% (IC50) of *V. splendidus* growth inhibition after 24h of exposition. Both IC20 and IC50 are expressed in mass concentrations (mg L⁻¹) and in equivalent absorptivity (a.u.) according to the maximal absorbance of each extract. Results are expressed as median ± sd (conclusive n) (n=3)

| Extract | IC50 mg L ⁻¹ | Abs _{λmax} 50 | IC20 mg L ⁻¹ | AbS _{λmax} 20 |
|---|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| <i>V. splendidus</i> 4D1-8 growth inhibition | | | | |
| MMW-SPE | 35.8±8.3 (3) | 0.346±0.080 (3) | 25.2±6.1 (3) | 0.243±0.059 (3) |
| HMW-SPE | N/A | N/A | N/A | N/A |
| LMW-SPE | 38.2±10.5 (2) | 0.223±0.061 (2) | 30.0±14.9 (3) | 0.176±0.087 (3) |
| MMW-UF | 49.2±11.1 (2) | 0.294±0.066 (2) | 24.0±4.5 (3) | 0.143±0.027 (3) |
| EPS-H20 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| <i>V. splendidus</i> 4G1-8 growth inhibition | | | | |
| MMW-SPE | 54.3±13.0 (3) | 0.524±0.125 (3) | 16.9±2.3 (3) | 0.163±0.022 (3) |
| HMW-SPE | N/A | N/A | 49.0 (1) | 0.045 (1) |
| LMW-SPE | 15.9 (1) | 0.093 (1) | 18.6±3.2 (3) | 0.109±0.019 (3) |
| MMW-UF | 29.2 (1) | 0.174 (1) | 17.2±5.3 (2) | 0.102±0.032 (2) |
| EPS-H20 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| <i>V. splendidus</i> 4G4-4 growth inhibition | | | | |
| MMW-SPE | 53.2±13.9 (3) | 0.514±0.135 (3) | 24.4±7.5 (3) | 0.236±0.072 (3) |
| HMW-SPE | N/A | N/A | 92 (1) | 0.085 (1) |
| LMW-SPE | N/A | N/A | 26.0±0.9 (2) | 0.152±0.005 (2) |
| MMW-UF | 67.2 (1) | 0.401 (1) | 26.7±7.2 (3) | 0.159±0.043 (3) |
| EPS-H20 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| <i>V. splendidus</i> 3T8-11 growth inhibition | | | | |
| MMW-SPE | 109.9±75.3 (3) | 1.06±0.73 (3) | 19.1±5.4 (3) | 0.184±0.052 (3) |
| HMW-SPE | N/A | N/A | N/A | N/A |
| LMW-SPE | N/A | N/A | 47.3±35.3 (3) | 0.277±0.207 (3) |
| MMW-UF | 110.5 (1) | 0.659 (1) | 26.9±10.7 (3) | 0.161±0.064 (3) |
| EPS-H20 | N/A | N/A | N/A | N/A |

Table S 20 : Median growth inhibition response of *V. splendidus* strains to exposition to marennine-containing extracts.

| IC20 (mg L⁻¹) | 4G1-8 | 4D1-8 | 4G4-4 | 3T8-11 | Median |
|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|
| MMW-SPE | 16.9 | 25.2 | 24.4 | 19.1 | 21.7 |
| HMW -SPE | 49 | N/A | 92 | N/A | 70.5 |
| LMW-SPE | 18.6 | 30 | 26 | 47.3 | 28 |
| MMW-UF | 17.2 | 24 | 26.7 | 26.9 | 25.3 |
| median | 17.9 | 25.2 | 26.3 | 26.9 | 25.6 |

| IC50 (mg L⁻¹) | 4G1-8 | 4D1-8 | 4G4-4 | 3T8-11 | Median |
|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|---------------|
| MMW-SPE | 54.3 | 35.8 | 53.2 | 109.9 | 53.7 |
| HMW -SPE | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| LMW-SPE | 15.9 | 38.2 | N/A | N/A | 27.0 |
| MMW-UF | 29.2 | 49.2 | 67.2 | 110.5 | 58.2 |
| Median | 29.2 | 38.2 | 60.2 | 110.2 | 51.2 |

Table S 21: Results of one-way ANOVA et Fisher's LSD test on carbohydrate content (mg_{eq.Glucose} mg_{DW}⁻¹) of the different marennine extracts.

| Effect | DF | SS | MS | F | P-value |
|-----------|----|---------|---------|-----|-------------|
| Extract | 4 | 0.15215 | 0.03804 | 794 | 1.82e-12*** |
| Residuals | 10 | 0.00048 | 0.00005 | | |

| | DF | t-value | LSD |
|--------------|----|----------|-------------|
| Fisher's LSD | 10 | 2.228139 | 0.009070273 |

| Extract | Carbohydrate content (mg _{eq.Glucose} mg _{DW} ⁻¹) | Group |
|---------|---|-------|
| MMW-UF | 0.083 ± 0.004 | c |
| MMW-SPE | 0.129 ± 0.002 | b |
| LMW-SPE | 0.028 ± 0.002 | d |
| HMW-SPE | 0.276 ± 0.013 | a |
| EPS-H2O | 0.259 ± 0.008 | a |

Table S 22: One way ANOVA and Fisher's LSD test on composition ratio ($\text{mg}_{\text{EMn}} \text{mg}_{\text{eq.Glucose}}^{-1}$) of the different marennine extracts.

| Effect | DF | SS | MS | F | P-value |
|-----------|----|--------|-------|------|--------------------------|
| Extract | 3 | 283.81 | 94.60 | 5528 | 1.33e^{-13} *** |
| Residuals | 8 | 0.7 | 0.09 | | |

| | DF | t-value | LSD |
|--------------|----|----------|-----------|
| Fisher's LSD | 8 | 2.306004 | 0.2463172 |

| Extract | Composition ratio ($\text{mg}_{\text{EMn}} \text{mg}_{\text{eq.Glucose}}^{-1}$) | Group |
|---------|---|-------|
| MMW-UF | 6.0 ± 0.3 | b |
| MMW-SPE | 5.38 ± 0.08 | c |
| LMW-SPE | 15.1 ± 1.0 | a |
| HMW-SPE | 0.24 ± 0.01 | d |

CONCLUSION GÉNÉRALE

1. RAPPEL DE LA PROBLÉMATIQUE ET ORIGINALITÉ DE L'ÉTUDE

Haslea ostrearia et sa production de marennine ont longuement été étudiées en raison de leur lien avec le verdissement des huîtres, un phénomène ayant des implications économiques significatives en France (Gabed *et al.*, 2022). Aujourd'hui, ce pigment est perçu comme un composé bioactif naturel doté de propriétés qui pourraient être exploitées pour relever le défi de durabilité auquel est confrontée l'aquaculture des bivalves, notamment pour lutter contre les épidémies de vibriose (Sanches-Fernandes *et al.*, 2022). Les propriétés de la marennine en font une candidate intéressante pour une utilisation en tant que « postbiotique » (Bondad-Reantaso *et al.*, 2023). En s'accumulant sur la chair des bivalves, au niveau des palpes labiaux et des branchies, la marennine pourrait permettre d'y réduire la charge bactérienne (Falaise *et al.*, 2019b), tout en déclenchant leur réponse immunitaire (Latour *et al.*, 2023 ; Turcotte *et al.*, 2016). L'étude d'un tel traitement par ajout en faible concentration au milieu de culture (Prasetya *et al.*, 2017a) pourrait être considérée en éclosiers et pouponnières sur des stades larvaires et juvéniles de bivalves, plus sensibles aux infections de vibriose (Bower, 2009 ; Latour *et al.*, 2023).

Pour promouvoir la valorisation de la marennine, notamment comme supplément en aquaculture, une maîtrise de sa production est essentielle. Pourtant à l'heure actuelle, **l'impact du procédé de culture de *H. ostrearia* ainsi que celui du raffinage de la marennine, sur la production de ce pigment reste encore méconnu.** Dans le but d'améliorer la compréhension des différents facteurs pouvant *in fine* avoir un impact sur la productivité et la qualité d'un extrait de marennine, le système de production a été étudié dans sa globalité, de la culture de *H. ostrearia* à l'obtention d'un extrait du pigment, potentiellement utilisable en intrant dans les milieux de culture larvaires et juvéniles de

bivalves. La notion de qualité évoquée dans cette étude se veut appliquée, et n'est pas nécessairement synonyme de pureté, mais correspond ici à son efficacité bioactive. En effet, cette étude n'utilise pas d'extrait pur de marennine, son obtention en aquaculture n'étant pas économiquement envisageable (Gastineau *et al.*, 2014).

2. APPORT DE L'ETUDE

Pour répondre à la problématique avancée, notre étude s'est articulée autour des principales étapes d'une production de marennine en cherchant à répondre à trois questions principales. La première interrogeait l'intérêt de l'utilisation d'un procédé de culture à membrane immergée pour permettre une production fiable et adaptable aux différentes **souches de *H. ostrearia***. La deuxième questionnait l'influence de **l'état physiologique** des diatomées au cours de leur culture sur les variabilités observées au niveau de la productivité et de la bioactivité de l'extrait de marennine obtenu. La dernière interrogeait sur les conséquences du choix de **procédé de raffinage** utilisé sur la qualité de l'extrait de marennine en résultant.

2.1 Variabilité biologique et conséquences sur les productivités en marennine par *Haslea ostrearia*

La marennine extracellulaire fait partie des substances polymériques extracellulaires (EPS) produites par *H. ostrearia*. De ce fait, la première source de variabilité de sa production va découler directement de l'organisme producteur. Cette variabilité biologique et ses conséquences sur la qualité de l'extrait de marennine ont pu être mises en évidence au travers des résultats des chapitres 2 et 3. Le chapitre 2 s'est intéressé aux changements d'inoculum utilisé pour la culture, tandis que le chapitre 3 a étudié l'évolution de celui-ci tout au long d'une culture en fed-batch. De cette manière, la variabilité biologique a pu être évaluée à différentes échelles : la variabilité que peut apporter un changement de souche de *H. ostrearia*, celle apportée par le vieillissement d'une souche en laboratoire, et enfin la variabilité apportée par l'évolution de la biomasse le long d'une culture. Il a pu être déduit

que les productivités en marennine allaient grandement dépendre de l'état physiologique de l'inoculum en culture et que de ces différences de productivités découleraient des changements au niveau de la qualité du surnageant de culture récolté, contenant la marennine extracellulaire et ses co-produits.

Ainsi, différents inocula se sont démarqués les uns des autres par leur réponse à un même environnement de forte intensité lumineuse, au sein duquel le rôle d'ombrage de la marennine pour *H. ostrearia* est apparu moteur de sa production. Pour chaque culture, une stabilisation de la concentration en marennine du surnageant de culture a pu être observée et a été maintenue sur plusieurs jours, et ce en dépit d'une récolte du surnageant et d'un renouvellement quotidien de 10% du milieu de culture. Cela vient soutenir l'hypothèse de l'existence d'une boucle de régulation de la synthèse de marennine (Pouvreau *et al.*, 2007) dans l'objectif de maintenir un environnement lumineux adéquat, autrement dit d'entretenir l'auto-ombrage requis par la souche de *H. ostrearia* cultivée. Une telle hypothèse permettrait d'expliquer les différences de productivité des inocula cultivés. En effet, malgré la diminution de la taille des cellules observée le long de leur cycle de vie, associée à une diminution de la taille des chloroplastes et une diminution de la densité cellulaire atteinte en culture, l'accumulation de marennine dans la culture (*i.e.* le niveau d'ombrage créé par son accumulation) a été maintenue, grâce à une augmentation de la productivité spécifique en marennine des cellules en culture. En se basant sur l'hypothèse du rôle moteur de l'ombrage, les productivités en marennine particulièrement élevées de *H. ostrearia* NCC529 peuvent également être discutées. Lors de la culture de cette souche, l'accumulation de marennine a atteint un niveau plus élevé qu'avec les autres souches étudiées, sous-entendant un besoin d'ombrage plus important. Des données sur la composition pigmentaire de cette souche, obtenues lors de travaux non publiés (Tableau 5), nous permettent de la différencier des deux autres souches en raison de sa plus faible quantité relative de caroténoïdes. Cette information vient étayer l'hypothèse d'un équilibre des stratégies de photoprotection mis en place par *H. ostrearia*. Cet équilibre aurait lieu entre des stratégies de photoacclimatation comme l'accumulation de caroténoïdes pour protéger les photosystèmes (Scarsini *et al.*, 2019), et de stratégies de photorégulation auxquelles pourrait appartenir la génération

Tableau 5 : Ratios pigmentaires retrouvés chez trois souches de *H. ostrearia* cultivées dans le même environnement lumineux, au cours de la phase stationnaire d'une culture en MPBR. CarT correspond à la concentration en caroténoïdes totaux mesurée dans la biomasse, et Chl_{a+c} correspond à la mesure de la concentration en chlorophylle *a* et *c* de la biomasse.

| <i>H. ostrearia</i> | NCC 553 | NCC 531 | NCC 529 |
|---|-----------|-----------|-----------|
| Milieu nutritionnel | ES 1/3 | ES 1/3 | NX |
| Système de culture | MPBR | MPBR | MPBR |
| Intensité lumineuse ($\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$) | 200 | 200 | 200 |
| Taux de dilution (d^{-1}) | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| CarT/Chl _{a+c} | 0,44±0,01 | 0,49±0,00 | 0,36±0,03 |

d'un auto-ombrage par la synthèse et l'externalisation de la marennine (Pouvreau *et al.*, 2007). Selon la souche, une voie métabolique pourrait être favorisée relativement à l'autre. Enfin, l'hypothèse de l'ombrage comme moteur de la production de marennine est également validée par les résultats du chapitre 3. L'analyse plus spécifique de l'évolution de la productivité en marennine au cours d'une culture de *H. ostrearia* y est mise en parallèle de l'évolution de la croissance de la biomasse. Les résultats de cette étude montrent que la biomasse présente une productivité forte en phase exponentielle de croissance, alors que les conditions de croissances sont optimales et que le niveau d'ombrage limitant n'est pas atteint. Par la suite, la productivité en marennine se stabilisent pour compenser le soutirage quotidien, jusqu'à ce que la carence nutritionnelle du système vienne affecter le métabolisme primaire de la biomasse. Celle-ci entraîne la sénescence des cellules en culture, qui s'accompagne d'une chute de leur productivité en marennine. L'ombrage serait ainsi le facteur principal faisant varier la productivité en marennine d'un procédé de culture de *H. ostrearia*, lorsque la culture est en conditions nutritionnelles non limitantes. Cette hypothèse est soutenue par les travaux de Gargouch *et al.* (2022), démontrant qu'en augmentant le taux de dilution du milieu de culture, en repoussant donc la limite nutritionnelle associée et l'ombrage créé par l'accumulation de marennine, une augmentation des productivités du pigment était possible pour une même souche de *H. ostrearia*. Un procédé hybride, tel qu'utilisé dans cette étude, comportant une membrane immergée dans une chambre de culture, se présente alors comme une solution de choix pour adapter les conditions de cultures à la variabilité biologique décrite ici. La membrane immergée en donnant accès à une régulation *turbidostat* du taux de

dilution de la culture, c'est-à-dire selon la densité optique de milieux, permettrait le maintien d'une culture benthique de *H. ostrearia* à un niveau d'ombrage suboptimal, tirant la boucle de régulation de la production marennine vers sa synthèse.

2.2 Importance du procédé de raffinage dans la production d'un extrait de marennine de qualité fiable

À la variabilité de productivité en marennine, observée au cours d'une culture et d'une culture à l'autre, se sont ajoutées les variabilités observées au niveau de la bioactivité des extraits de marennine en découlant. D'une part, la production de marennine par *H. ostrearia* NCC529, après s'être démarquée par ses fortes productivités, a démontré des capacités de piégeage de radicaux libres plus importantes, tandis que ses capacités d'inhibition de croissance bactérienne se sont avérées équivalentes aux extraits produits par les autres souches de *H. ostrearia*. D'autre part, à l'échelle d'une culture de *H. ostrearia*, l'extrait de marennine récolté en phase exponentielle s'est avéré plus efficace pour inhiber la croissance bactérienne que les extraits provenant des récoltes en phase stationnaire et sénescence, mais aucune différence significative n'a pu être observée concernant l'activité antioxydante. Ainsi si le changement souche comme celui de la phase de culture au moment de la récolte sont tous deux venus ajouter un facteur de variabilité à la qualité de l'extrait de marennine, ils ont entraîné sur les bioactivités des conséquences différentes. Les analyses spectrales venant compléter les mesures de bioactivités soutiennent l'hypothèse qu'une variabilité au niveau de la composition des extraits pourrait en être à l'origine. Une différence de bioactivité pourrait alors naître de l'accumulation de co-produits à la marennine, qui se retrouveraient en partie co-extraits au moment de la double ultrafiltration (30-3 kDa) utilisé pour obtenir un extrait de marennine purifié à 90%. Au cours d'une culture fed-batch, nos résultats suggèrent plutôt l'hypothèse d'une accumulation d'EPS et lysats cellulaire au cours de la culture, tandis que d'un inoculum à l'autre, les différences observées résulteraient plutôt de la proportion relative d'EMn dans le surnageant de culture relativement aux autres co-produits. Ainsi, la

surstimulation de la synthèse de marennine retrouvée chez *H. ostrearia* NCC529 permettrait l'obtention d'un extrait de marennine contenant moins de co-produits (Figure 18).

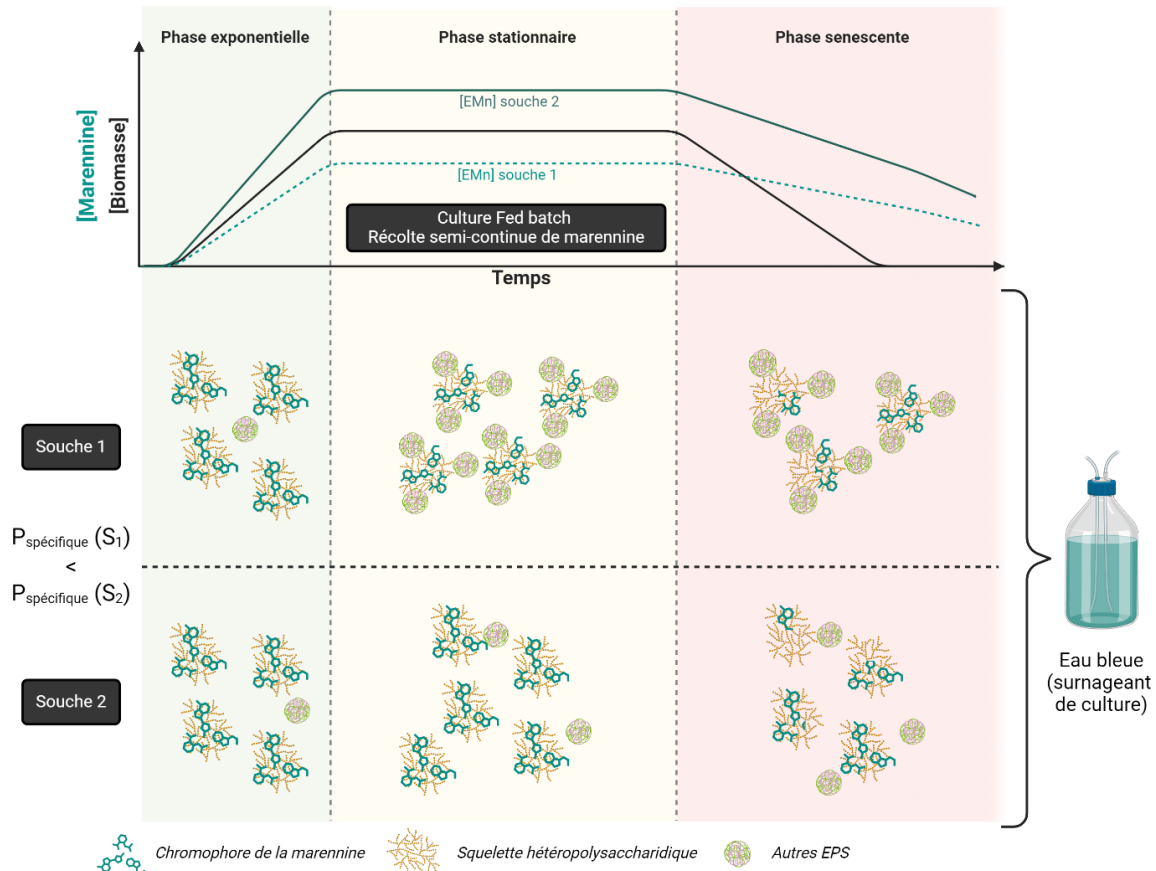


Figure 18: Hypothèses concernant l'impact du procédé de culture de *H. ostrearia* sur la qualité de la marennine produite, lors d'une culture en fed-batch. Avec [EMn] concentration en marennine extracellulaire dans le surnageant de culture, $P_{\text{spécifique}}$ productivité spécifique en marennine des cellules de *H. ostrearia* en culture (créé avec BioRender.com).

Le chapitre 4 en proposant une analyse de l'impact du raffinage sur la qualité de l'extrait de marennine obtenu, vient compléter notre compréhension concernant l'origine de la variabilité des bioactivités observées dans les chapitres 2 et 3. La vue d'ensemble permet de mieux définir les facteurs ayant un impact sur les bioactivités de la marennine, et permet de proposer des procédés pour limiter leur impact négatif. Les résultats présentés dans le

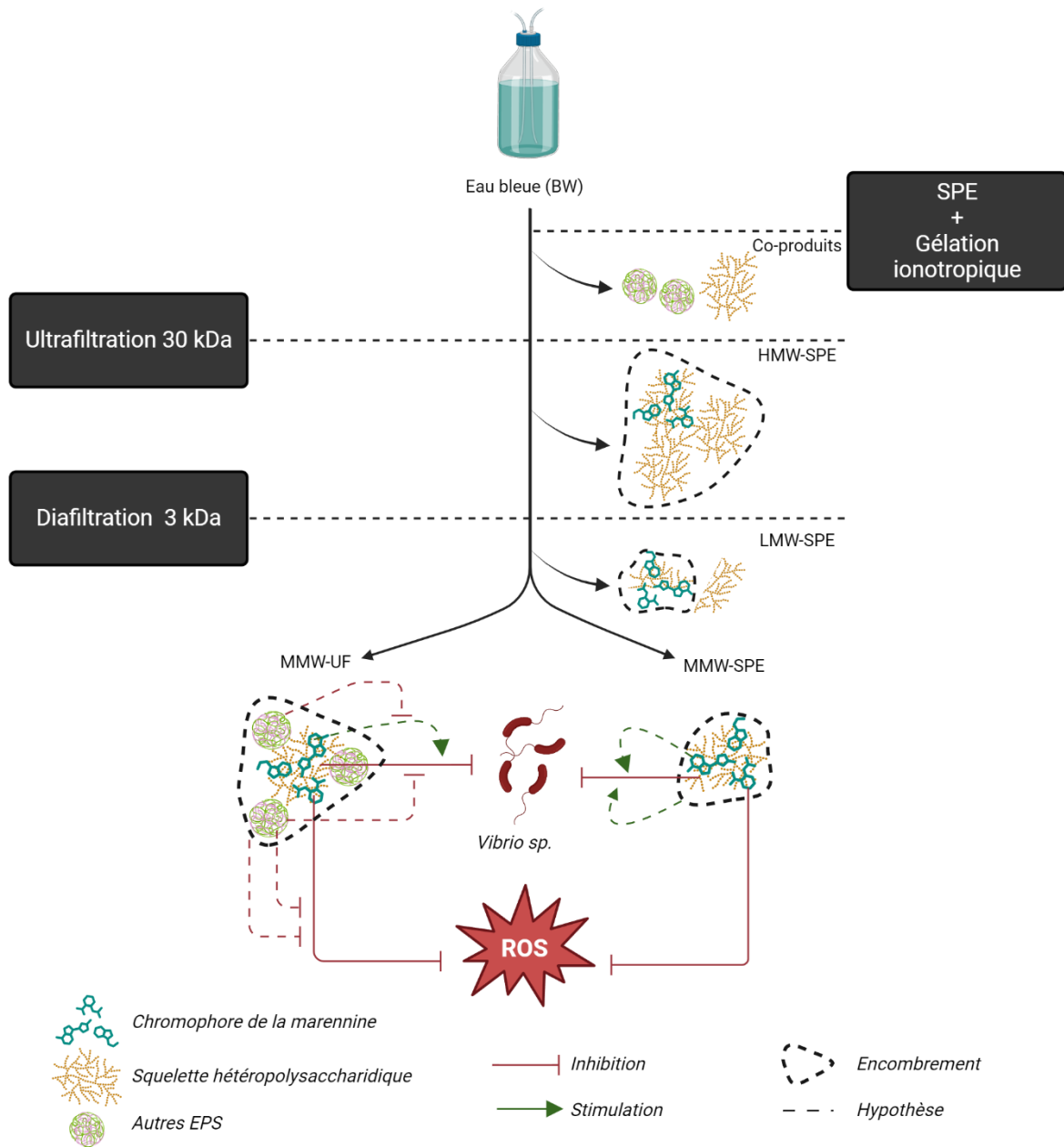


Figure 19 : Hypothèses de l'impact du procédé de raffinage sur la qualité de l'extrait de marennine obtenu et ses conséquences sur ses bioactivités antibactériennes et antioxydantes. Avec SPE extraction sur phase solide, HMW haut poids moléculaire, LMW faible poids moléculaire, UF ultrafiltration (créé avec BioRender.com).

chapitre 4 démontrent que l'efficacité de piégeage de radicaux libres est principalement corrélée à l'abondance supposée de chromophores dans l'extrait (*i.e.* absorbance de l'extrait),

et du niveau d'accessibilité de la zone porteuse de l'activité (*i.e.* le niveau de pureté du chromophore). Concernant l'activité antibactérienne, nos résultats l'associent à la présence de chromophore de la marennine dans l'extrait utilisé, mais la réponse inhibitrice n'est pas proportionnelle à son niveau de pureté dans l'extrait. Cela laisse à penser que la marennine est bien à l'origine de l'activité antibactérienne, mais celle-ci serait portée par sa partie n'absorbant pas le spectre visible, *i.e.* le squelette polysaccharidique. Pour soutenir cette hypothèse, il a pu être observé que les extraits de marennine se démarquant par une activité antibactérienne plus importante présentaient des points communs au niveau de leurs spectres FTIR-ATR. Si des hypothèses peuvent être émises sur les structures moléculaires pouvant être impliquées dans l'activité, cette corrélation met essentiellement en avant le facteur principal pouvant affecter la bioactivité de l'extrait de marennine : la variabilité observée par la fraction polymérique de l'extrait de marennine, le squelette polysaccharidique et ses co-extraits.

Nos résultats ont mis en avant qu'une double ultrafiltration du surnageant de culture ne permettait pas l'obtention d'un extrait de marennine dont les bioactivités étaient garanties. En parallèle, notre étude présente l'ajout d'une extraction sur phase solide (SPE) combinée à une gélation ionotrope comme efficace pour améliorer cette garantie. L'amélioration des activités antioxydantes et antibactériennes observées le confirme et soutient le rôle des co-produits comme facteur principal de variabilité de la bioactivité de l'extrait (Figure 19).

3. MISE EN PERSPECTIVE

Au travers de notre étude, une amélioration de la compréhension de la synthèse et de la bioactivité de la marennine est permise, et ouvre sur de nouvelles pistes de recherches.

Nos observations concernant la production de la marennine viennent soutenir la relation entre la synthèse de ce pigment et le métabolisme adaptatif de fixation du carbone de *H. ostrearia* (Rech, 2004). Dans nos cultures, la production de marennine est apparue liée au comportement photoautotrophe de *H. ostrearia*, dans un environnement où l'intensité lumineuse était en excès. L'origine de la sursollicitation de la stratégie d'auto-ombrage chez

H. ostrearia NCC529 reste encore inconnue, mais son étude pourrait être intéressante, les productivités volumétriques en marennine permises par la culture de cette souche étant deux fois supérieures à celles atteintes par les autres souches étudiées. *Haslea ostrearia* NCC529 a été maintenue à repiquage intensif (*i.e.* maintien en phase exponentielle de croissance sous forte intensité lumineuse) pendant un an, contrairement à une période d'un mois pour les autres souches. Le recours important à l'auto-ombrage pourrait alors résulter d'une adaptation en laboratoire (ALE, *Adaptive Laboratory Evolution*) (Lee & Kim, 2020). Ce repiquage fréquent dans un environnement de haute intensité lumineuse aurait induit une pression de sélection sur l'inoculum en culture, favorisant ainsi cette stratégie de photorégulation et les individus les plus aptes à la mettre en place. En phase exponentielle, dans l'absence de carence nutritionnelle, la synthèse de marennine serait alors favorisée au détriment des autres stratégies de photoprotection retrouvées chez les diatomées (Scarsini *et al.*, 2019). Pour le vérifier, une analyse comparative pourrait être menée pour étudier l'évolution de la productivité en marennine d'un inoculum initial évoluant à des rythmes de repiquage différents. En parallèle de la production en marennine, le contenu en pigments chloroplastiques devra être mesuré, pour comparer les niveaux de sollicitation des stratégies de photoprotection mis en place par *H. ostrearia*. Si une tendance à l'augmentation de la productivité en marennine est confirmée, le recours aux techniques « omiques » pourra apporter des éléments clés pour l'élucidation de la voie métabolique de la marennine et les stratégies d'adaptation mise en place par *H. ostrearia* (Mishra *et al.*, 2019). Une comparaison du génome et du transcriptome pourra permettre d'associer une différence de productivité en marennine à un mécanisme d'évolution du génome ou d'adaptation de son expression. Des analyses protéomiques et métabolomiques permettront de vérifier si la stimulation de la production de marennine résulte d'une modulation de l'ensemble du métabolisme de fixation du carbone inorganique (Roberts *et al.*, 2007), ou plutôt d'une modulation des voies métaboliques sollicitées dans la production d'EPS (Aslam *et al.*, 2018), ou encore la conséquence indirecte d'une sous-régulation de la voie de synthèse des caroténoïdes, autre voie de photorégulation chez *H. ostrearia* (Athanasakoglou *et al.*, 2019).

Nos travaux viennent également confirmer l'hypothèse d'une variabilité de composition d'un extrait de marennine émise dans l'étude de Zebiri *et al.* (2023). En venant étudier les conséquences de cette variabilité sur les bioactivités de l'extrait, nos résultats ont permis d'appuyer la nécessité d'approfondir son étude afin de promouvoir la valorisation de la marennine. Une étude compositionnelle de la marennine, par chromatographie ionique, permettra de vérifier l'intégrité et la consistance de la composition en monosaccharides du pigment au cours d'une culture, produit par des souches aux métabolismes adaptatifs différents, et tout au long du procédé de raffinage. Une attention particulière concernant la présence et l'abondance d'acides uroniques pourra être apportée, nos résultats suggérant un lien entre la présence de groupements carboxyle et l'efficacité des bioactivités observées. À cela, une étude de la composition globale des extraits de marennine, utilisant une approche RMN en phase liquide, pourra compléter l'information, en étudiant cette fois la variabilité découlant de la nature des co-extraits au pigment. L'ensemble de ces résultats devraient permettre de répondre à la question sur l'origine de la variabilité des bioactivités de l'extrait de marennine, en corrélant une variabilité de la composition de ses co-produits ou une modulation de la structure de la marennine elle-même, aux fluctuations d'efficacité observées.

Enfin, les résultats de notre étude viennent apporter des informations intéressantes sur l'origine des bioactivités de la marennine, et se faisant, soulèvent la question des mécanismes sous-jacents à celles-ci. Ils soulignent particulièrement l'importance du squelette polysaccharidique de la marennine dans l'activité antibactérienne. Les dernières études concernant les mécanismes de cette activité contre *Vibrio* démontrent un impact de la marennine sur la rigidité de la membrane (Bouhleb *et al.*, 2021), déjà observé pour d'autres polysaccharides polyanioniques naturels (Liu *et al.*, 2017). Les hypothèses quant à leurs mécanismes pouvant aller d'une interaction membranaire à la chélation d'ions modulant le *quorum sensing* bactérien, des études plus ciblées sont nécessaires pour élucider ceux entrant en jeu dans l'inhibition de la croissance bactérienne par la marennine. L'étude de l'interaction entre la marennine et la membrane bactérienne pourra être approfondie en s'intéressant à l'interaction de la marennine aux protéines membranaire des bactéries *Vibrio*. Par exemple,

une approche par marquage covalent des protéines membranaires, avec et sans exposition à un extrait de marennine, comme proposé par Pan et Vachet (2022) peut être développée pour détecter un site d'interaction ou une modification de conformation de protéine membranaire. En outre, sa nature polyanionique pouvant induire une chélation de certains ions, comme le calcium, reconnu pour participer à la signalétique de la formation du biofilm pour certaines espèces de *Vibrio* (Chodur *et al.*, 2018), l'étude de l'impact de la marennine sur le développement de biofilm bactérien pourrait s'avérer pertinente. L'aspect du biofilm et sa quantification, en plus du suivi de la croissance de la population bactérienne totale et la mesure de la fraction sénescence de celle-ci, devraient permettre de comprendre la forme prise par l'inhibition de la croissance bactérienne.

4. CONCLUSIONS ET SUITES DE L'ETUDE

Pour conclure, il peut être intéressant de souligner que si notre étude se termine en proposant les principaux facteurs ayant un impact sur la production de marennine, des dispositions peuvent être mises en place pour limiter leur impact négatif sur la production d'un extrait valorisable (Figure 20).

Concernant la synthèse de la marennine par *H. ostrearia*, nos résultats encouragent l'ajout d'une membrane immergée dans la chambre de culture. Ce procédé de filtration est un atout singulier pour l'optimisation des productivités en marennine du procédé de culture. Il permet de moduler à façon le taux de dilution de celle-ci, et ce sans entraîner une récolte systématique de biomasse. Les cellules peuvent alors être cultivées suivant une boucle de régulation *turbidostat*, pour stimuler continuellement la production de marennine en évitant que l'ombrage maximal soit atteint pour la souche cultivée. La synthèse de marennine ayant été associée au bon déroulement de la photosynthèse, des conditions nutritionnelles optimales devront être maintenues par renouvellement à façon du milieu, par rétrolavage de la membrane. Un suivi en ligne par fluorimétrie pourra être installé pour permettre un suivi de l'état physiologique de la biomasse en culture, tout en réduisant l'effort d'échantillonnage (Figure 20). En amont de la culture, un protocole ALE pourra être mis en place, pour solliciter

la voie métabolique de la marennine, favorisant une adaptation éventuelle des inocula vers une surexpression de la voie de synthèse de la marennine.

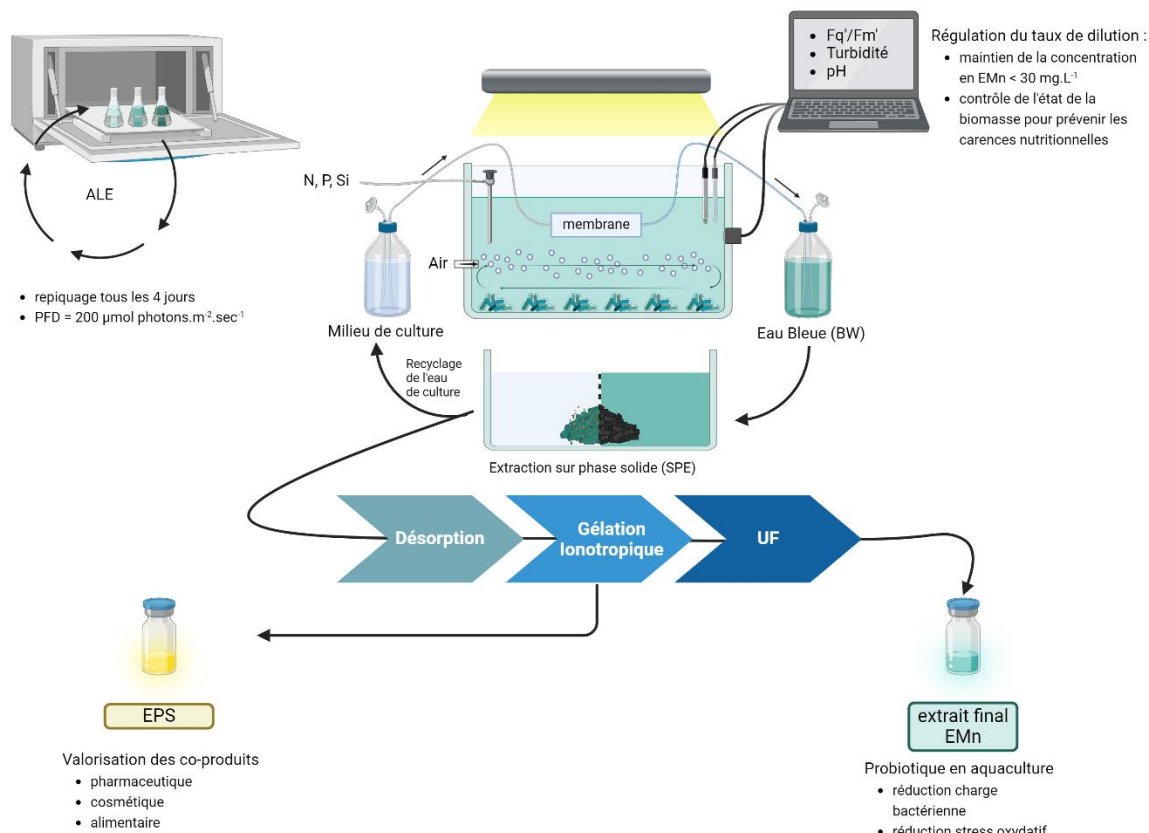


Figure 20 : Système de production de marennine pour la production d'un extrait utilisable en intrant en aquaculture. Système intégrant les solutions proposées dans le cadre de cette étude pour améliorer les productivités en marennine et la fiabilité de la qualité de l'extrait final. Avec F_q'/F_m' le rendement photosynthétique du photosystème II, UF correspondant à la double ultrafiltration 30 et 3 kDa de Pouvreau *et al.* (2006b) EPS substances polymériques extracellulaires, EMn marennine extracellulaire (créé avec BioRender.com).

L'eau bleue récoltée par filtration pourra être préférablement raffinée en suivant le protocole proposé par Bélanger *et al.* (2020, et *soumis*) en amont de la double ultrafiltration proposée par Pouvreau *et al.* (2006). En éliminant efficacement une partie des co-extraits éventuellement retrouvés dans le surnageant récolté, cet ajout devrait améliorer l'efficacité bioactive de l'extrait de marennine obtenu. L'utilisation d'une extraction sur particules de graphite se présente comme une option écologique et économique (Bélanger *et al.*, 2020), permettant l'extraction de la marennine tout en offrant la possibilité de recycler l'eau du

surnageant dans le système de production (Figure 20). Par la suite, la séparation par gélotion ionotropique devrait améliorer les bioactivités de la fraction contenant la marennine, tout en facilitant la récupération d'une fraction contenant des EPS co-extraites (EPS-H₂O) lors de la récolte du surnageant de culture (Figure 20). Cette fraction EPS-H₂O présente des caractéristiques structurales (Bélanger *et al.*, *soumis*) et des bioactivités (Chehoury *et al.*, *soumis*) qui encouragent sa valorisation dans le secteur pharmaceutique, promettant d'augmenter la valeur économique de la production de marennine. Cependant, l'introduction de ces étapes d'extraction complexifie le système de production, et, à défaut de leur automatisation, leur mise en place pourrait être compromise dans le cadre d'une production aquacole. Dans cette optique, une alternative envisageable reste la modulation du taux de dilution de la culture à l'aide d'une membrane immergée, comme proposée plus tôt, suivie d'une double ultrafiltration en ligne. Cette approche permettrait de faciliter le processus tout en maintenant un contrôle efficace sur la qualité des extraits et les productivités en marennine.

Dans l'ensemble, les résultats de cette étude appuient l'intérêt de poursuivre la recherche sur la marennine afin de promouvoir son utilisation en aquaculture, notamment comme traitement contre la vibriose. Cette recherche devrait se concentrer particulièrement sur les mécanismes d'activité de cette molécule, ce qui est essentiel pour garantir une utilisation sûre. De plus, pour promouvoir sa valorisation, l'extrait de marennine obtenu par la nouvelle méthode de raffinage proposée par Bélanger *et al.* (2020, et *soumis*) devrait être plus amplement étudiée. En effet, son impact sur la physiologie des larves et des juvéniles de bivalves se doit d'être vérifié, afin de connaître les concentrations limites d'utilisation d'un tel extrait (Latour *et al.*, 2023 ; Turcotte *et al.*, 2016) et envisager son utilisation comme alternative aux antibiotiques de synthèse en aquaculture.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adjout, R., Mouget, J., Pruvost, J., Chentir, I., Loiseau, C. et Baba Hamed, M. B. (2022). Effects of temperature, irradiance, and pH on the growth and biochemical composition of *Haslea ostrearia* batch-cultured in an airlift plan-photobioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12055-1>
- Ahmad, I., Mohmood, I., Coelho, J. P., Pacheco, M., Santos, M. A., Duarte, A. C. et Pereira, E. (2012). Role of non-enzymatic antioxidants on the bivalves' adaptation to environmental mercury: Organ-specificities and age effect in *Scrobicularia plana* inhabiting a contaminated lagoon. *Environmental Pollution*, *163*, 218-225. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.12.023>
- Ai, X.-X., Liang, J.-R., Gao, Y.-H., Lo, S. C.-L., Lee, F. W.-F., Chen, C.-P., Luo, C.-S. et Du, C. (2015). MALDI-TOF MS analysis of the extracellular polysaccharides released by the diatom *Thalassiosira pseudonana* under various nutrient conditions. *Journal of Applied Phycology*, *27*(2), 673-684. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0360-0>
- Ale, M. T., Mikkelsen, J. D. et Meyer, A. S. (2011). Important Determinants for Fucoidan Bioactivity: A Critical Review of Structure-Function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds. *Marine Drugs*, *9*(10), 2106-2130. <https://doi.org/10.3390/md9102106>
- Amato, A. (2010). Diatom Reproductive Biology: Living in a Crystal Cage. *The International Journal of Plant Reproductive Biology*, *2*, 1-10.
- Andersen, R. A. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier.
- Andrew, M. et Jayaraman, G. (2020). Structural features of microbial exopolysaccharides in relation to their antioxidant activity. *Carbohydrate Research*, *487*, 107881. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.107881>
- Antunes, J., Leão, P. et Vasconcelos, V. (2019). Marine biofilms: diversity of communities and of chemical cues. *Environmental Microbiology Reports*, *11*(3), 287-305. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12694>

- Anwar, S., Brenya, E., Alagoz, Y. et Cazzonelli, C. I. (2021). Epigenetic Control of Carotenogenesis During Plant Development. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 40(1), 23-48. <https://doi.org/10.1080/07352689.2020.1866829>
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M. et Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 85(5), 957-998. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>
- Aslam, S. N., Strauss, J., Thomas, D. N., Mock, T. et Underwood, G. J. C. (2018). Identifying metabolic pathways for production of extracellular polymeric substances by the diatom *Fragilariopsis cylindrus* inhabiting sea ice. *The ISME Journal*, 12(5), 1237-1251. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0039-z>
- Athanasakoglou, A., Grypioti, E., Michailidou, S., Ignea, C., Makris, A. M., Kalantidis, K., Massé, G., Argiriou, A., Verret, F. et Kampranis, S. C. (2019). Isoprenoid biosynthesis in the diatom *Haslea ostrearia*. *New Phytologist*, 222(1), 230-243. <https://doi.org/10.1111/nph.15586>
- Ayrapetyan, O. N., Obluchinskaya, E. D., Zhurishkina, E. V., Skorik, Y. A., Lebedev, D. V., Kulminskaya, A. A. et Lapina, I. M. (2021). Antibacterial Properties of Fucoidans from the Brown Algae *Fucus vesiculosus* L. of the Barents Sea. *Biology*, 10(1), 67. <https://doi.org/10.3390/biology10010067>
- Babich, O., Budenkova, E., Kashirskikh, E., Dolganyuk, V., Ivanova, S., Prosekov, A., Anokhova, V., Andreeva, A. et Sukhikh, S. (2022). Study of the Polysaccharide Production by the Microalga *Vischeria punctata* in Relation to Cultivation Conditions. *Life*, 12(10), 1614. <https://doi.org/10.3390/life12101614>
- Bagchi, S. et Jayaram Kumar, K. (2016). Studies on water soluble polysaccharides from *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. seeds. *Carbohydrate Polymers*, 138, 215-221. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.018>
- Bailleul, B., Berne, N., Murik, O., Petroustos, D., Prihoda, J., Tanaka, A., Villanova, V., Bligny, R., Flori, S., Falconet, D., Krieger-Liszkay, A., Santabarbara, S., Rappaport, F., Joliot, P., Tirichine, L., Falkowski, P. G., Cardol, P., Bowler, C. et Finazzi, G. (2015). Energetic coupling between plastids and mitochondria drives CO₂ assimilation in diatoms. *Nature*, 524(7565), 366-369. <https://doi.org/10.1038/nature14599>
- Balbi, T., Auguste, M., Ciacci, C. et Canesi, L. (2021). Immunological Responses of Marine Bivalves to Contaminant Exposure: Contribution of the -Omics Approach. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.618726>

- Bayu, A., Rachman, A., Noerdjito, D. R., Putra, M. Y. et Widayatno, W. B. (2020). High-value chemicals from marine diatoms: a biorefinery approach. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 460(1), 012012. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/460/1/012012>
- Begum, H., Yusoff, F. M., Banerjee, S., Khatoon, H. et Shariff, M. (2016). Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(13), 2209-2222. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.764841>
- Behrenfeld, M. J., Halsey, K. H., Boss, E., Karp-Boss, L., Milligan, A. J. et Peers, G. (2021). Thoughts on the evolution and ecological niche of diatoms. *Ecological Monographs*, 91(3), e01457. <https://doi.org/10.1002/ecm.1457>
- Bélangier, W., Arnold, A. A., Turcotte, F., Saint-Louis, R., Deschênes, J.-S., Genard, B., Marcotte, I. et Tremblay, R. (2020). Extraction Improvement of the Bioactive Blue-Green Pigment “Marennine” from Diatom *Haslea ostrearia*’s Blue Water: A Solid-Phase Method Based on Graphitic Matrices. *Marine Drugs*, 18(12), 653. <https://doi.org/10.3390/md18120653>
- Bélangier, W., Saint-Louis, R., Genard, B., Deschênes, J.-S., Tremblay, R., (2024). Scalable Purification of Marennine and Other Exopolymers from Diatom *Haslea ostrearia*’s “Blue Water”. Manuscrit soumis pour publication.
- Benedetti, M., Vecchi, V., Barera, S. et Dall’Osto, L. (2018). Biomass from microalgae: the potential of domestication towards sustainable biofactories. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1019-3>
- Bergé, J.-P., Bourgougnon, N., Alban, S., Pojer, F., Billaudel, S., Chermann, J.-C., Robert, J. M. et Franz, G. (1999). Antiviral and Anticoagulant Activities of a Water-Soluble Fraction of the Marine Diatom *Haslea ostrearia*. *Planta Medica*, 65(7), 604-609. <https://doi.org/10.1055/s-1999-14032>
- Bondad-Reantaso, M. G., MacKinnon, B., Karunasagar, I., Fridman, S., Alday-Sanz, V., Brun, E., Le Groumellec, M., Li, A., Surachetpong, W., Karunasagar, I., Hao, B., Dall’Occo, A., Urbani, R. et Caputo, A. (2023). Review of alternatives to antibiotic use in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 15(4), 1421-1451. <https://doi.org/10.1111/raq.12786>
- Bonnanfant, M. (2020). *Étude des mécanismes de conversion photosynthétique de l’énergie lumineuse par Chlorella vulgaris en photobioréacteur solaire* [Thèses, Université du Maine]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03084439>
- Borjas Esqueda, A., Gardarin, C. et Laroche, C. (2022). Exploring the Diversity of Red Microalgae for Exopolysaccharide Production. *Marine Drugs*, 20(4), 246. <https://doi.org/10.3390/md20040246>

- Bornet, E. et Chatin, A. D. (1895). Le verdissement des huîtres. *Bulletin des Séances de la Société Royale et Centrale d'agriculture*, 55, 429-439.
- Bouarab-Chibane, L., Forquet, V., Lantéri, P., Clément, Y., Léonard-Akkari, L., Oulahal, N., Degraeve, P. et Bordes, C. (2019). Antibacterial Properties of Polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) Models. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00829>
- Bouaziz, F., Koubaa, M., Helbert, C. B., Kallel, F., Driss, D., Kacem, I., Ghorbel, R. et Chaabouni, S. E. (2015). Purification, structural data and biological properties of polysaccharide from *Prunus amygdalus* gum. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(3), 578-584. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12687>
- Bouhleb, Z., Arnold, A. A., Deschênes, J.-S., Mouget, J.-L., Warschawski, D. E., Tremblay, R. et Marcotte, I. (2021). Investigating the action of the microalgal pigment marennine on *Vibrio splendidus* by in vivo ²H and ³¹P solid-state NMR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1863(9), 183642. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183642>
- Bower, S. M. (2009). *Précis des maladies infectieuses et des parasites des mollusques et des crustacés exploités commercialement : Vibrio spp. (vibriose des larves et juvéniles) d'huîtres*. <https://www.dfo-mpo.gc.ca/science/aah-saa/diseases-maladies/vibrioy-fra.html>
- Brembu, T., Mühlroth, A., Alipanah, L. et Bones, A. M. (2017). The effects of phosphorus limitation on carbon metabolism in diatoms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1728), 20160406. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0406>
- Brunet, C., Johnsen, G., Lavaud, J. et Roy, S. (2011). Pigments and photoacclimation processes. Dans *Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01101814>
- Carbonnelle, D., Pondaven, P., Morançais, M., Masse, G., Bosch, S., Jacquot, C., Briand, G., Robert, J. et 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 Research*, 19(1A), 621-624.
- Caspers, H. (1970). J. D. H. Strickland and T. R. Parsons: A Practical Handbook of Seawater Analysis. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada, Bulletin 167, 1968. 293 pp. \$ 7.50. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 55(1), 167-167. <https://doi.org/10.1002/iroh.19700550118>

- Celina, M., Ottesen, D. K., Gillen, K. T. et Clough, R. L. (1997). FTIR emission spectroscopy applied to polymer degradation. *Polymer Degradation and Stability*, 58(1), 15-31. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(96\)00218-2](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(96)00218-2)
- Chehourri, M. (2024). Marennine et exopolysaccharides de la microalgue bleue *Haslea ostrearia* : potentiel d'application cosmétique et pharmaceutique.(Mémoire de maîtrise en cours de dépôt, Université du Québec à Rimouski).
- Chepurnov, V. A., Mann, D. G., Sabbe, K. et Vyverman, W. (2004). Experimental Studies on Sexual Reproduction in Diatoms. Dans *International Review of Cytology* (vol. 237, p. 91-154). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)37003-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)37003-8)
- Chodur, D. M., Coulter, P., Isaacs, J., Pu, M., Fernandez, N., Waters, C. M. et Rowe-Magnus, D. A. (2018). Environmental Calcium Initiates a Feed-Forward Signaling Circuit That Regulates Biofilm Formation and Rugosity in *Vibrio vulnificus*. *mBio*, 9(4), 10.1128/mbio.01377-18. <https://doi.org/10.1128/mbio.01377-18>
- Cointet, E. (2019). *Diatomées benthiques marines : une ressource originale de souches « oléagineuses » pour une application en santé et nutrition* [Thèse de doctorat, Nantes]. <https://www.theses.fr/2019NANT4014>
- Cointet, E., Wielgosz-Collin, G., Méléder, V. et Gonçalves, O. (2019). Lipids in benthic diatoms: A new suitable screening procedure. *Algal Research*, 39, 101425. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101425>
- Cordier, C., Stavrakakis, C., Morga, B., Degrémont, L., Voulgaris, A., Bacchi, A., Sauvade, P., Coelho, F. et Moulin, P. (2020). Removal of pathogens by ultrafiltration from sea water. *Environment International*, 142, 105809. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105809>
- Cremin, K., Jones, B. A., Teahan, J., Meloni, G. N., Perry, D., Zerfass, C., Asally, M., Soyer, O. S. et Unwin, P. R. (2020). Scanning Ion Conductance Microscopy Reveals Differences in the Ionic Environments of Gram-Positive and Negative Bacteria. *Analytical Chemistry*, 92(24), 16024-16032. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03653>
- Daly, G., Decorosi, F., Viti, C. et Adessi, A. (2023). Shaping the phycosphere: Analysis of the EPS in diatom-bacterial co-cultures. *Journal of Phycology*, 59(4), 791-797. <https://doi.org/10.1111/jpy.13361>
- Davidovich, N. A., Mouget, J.-L. et Gaudin, P. (2009). Heterothallism in the pennate diatom *Haslea ostrearia* (Bacillariophyta). *European Journal of Phycology*, 44(2), 251-261. <https://doi.org/10.1080/09670260802710301>

- Davidovich, O. I., Davidovich, N. A. et Mouget, J.-L. (2018). The Effect of Temperature on Vegetative Growth and Sexual Reproduction of Two Diatoms from the Genus *Haslea* Simonsen. *Russian Journal of Marine Biology*, 44(1), 8-13. <https://doi.org/10.1134/S1063074018010030>
- De Brouwer, J. F. C. et Stal, L. J. (2002). Daily Fluctuations of Exopolymers in Cultures of the Benthic Diatoms *Cylindrotheca Closterium* and *Nitzschia Sp.* (bacillariophyceae)1. *Journal of Phycology*, 38(3), 464-472. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01164.x>
- Decamp, A., Martineau, E., Grizeau, D., Pruvost, J. et Gonçalves, O. (2023). Effects of the salinity on the biosynthesis of the polysaccharides of the marine microalgae *Porphyridium cruentum*. *Algal Research*, 71, 103089. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103089>
- Destoumieux-Garzón, D., Canesi, L., Oyanedel, D., Travers, M.-A., Charrière, G. M., Pruzzo, C. et Vezzulli, L. (2020). *Vibrio*–bivalve interactions in health and disease. *Environmental Microbiology*, 22(10), 4323-4341. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15055>
- Drira, M., Hentati, F., Babich, O., Sukhikh, S., Larina, V., Sharifian, S., Homai, A., Fendri, I., Lemos, M. F. L., Félix, C., Félix, R., Abdelkafi, S. et Michaud, P. (2021). Bioactive Carbohydrate Polymers—Between Myth and Reality. *Molecules*, 26(23), 7068. <https://doi.org/10.3390/molecules26237068>
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. et Smith, F. (1956). *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*, 2(3), 7.
- Falaise, C. (2019). *Valorisation des activités biologiques de la diatomée marine Haslea ostrearia* [Thèse, Université du Maine]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02127553>
- Falaise, C., Cormier, P., Tremblay, R., Audet, C., Deschênes, J.-S., Turcotte, F., François, C., Seger, A., Hallegraeff, G., Lindquist, N., Sirjacobs, D., Gobert, S., Lejeune, P., Demoulin, V. et Mouget, J.-L. (2019a). Harmful or harmless: Biological effects of marennine on marine organisms. *Aquatic Toxicology*, 209, 13-25. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.01.016>
- Falaise, C., James, A., Travers, M.-A., Zanella, M., Badawi, M. et Mouget, J.-L. (2019b). Complex Relationships between the Blue Pigment Marennine and Marine Bacteria of the Genus *Vibrio*. *Marine Drugs*, 17(3), 160. <https://doi.org/10.3390/md17030160>
- Falaise, C., Zebiri, L., Jacquette, B., Pasetto, P. et Mouget, J.-L. (2020). *procédé d'obtention d'une solution aqueuse enrichie en pigment bleu* (FR3089231A1).

- FAO. (2022). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022: Towards Blue Transformation*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Felipe, V., Breser, M. L., Bohl, L. P., Rodrigues da Silva, E., Morgante, C. A., Correa, S. G. et Porporatto, C. (2019). Chitosan disrupts biofilm formation and promotes biofilm eradication in *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 60-67. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.159>
- Feng, R.-F., Wang, N., Kou, J.-J., An, X.-W., Meng, F.-H., Zheng, X.-J., Wang, W.-W., Wang, L.-L., Wang, Z.-H., Liu, M.-J., Ao, C.-W. et Zhao, Z.-H. (2021). Sulfated Modification, Characterization and Potential Bioactivities of Polysaccharide From *Ziziphus jujuba* cv. *Jinsixiaozao*. *Natural Product Communications*, 16(10), 1934578X211033673. <https://doi.org/10.1177/1934578X211033673>
- Fogg, G. E. (1983). *The Ecological Significance of Extracellular Products of Phytoplankton Photosynthesis*, 26(1), 3-14. <https://doi.org/10.1515/botm.1983.26.1.3>
- Francezon, N., Herbaut, M., Bardeau, J.-F., Cougnon, C., Bélanger, W., Tremblay, R., Jacquette, B., Dittmer, J., Pouvreau, J.-B., Mouget, J.-L. et Pasetto, P. (2021). Electrochromic Properties and Electrochemical Behavior of Marennine, a Bioactive Blue-Green Pigment Produced by the Marine Diatom *Haslea ostrearia*. *Marine Drugs*, 19(4), 231. <https://doi.org/10.3390/md19040231>
- Friedman, M. (2016). Mushroom Polysaccharides: Chemistry and Antiobesity, Antidiabetes, Anticancer, and Antibiotic Properties in Cells, Rodents, and Humans. *Foods*, 5(4), 80. <https://doi.org/10.3390/foods5040080>
- Gabed, N., Verret, F., Peticca, A., Kryvoruchko, I., Gastineau, R., Bosson, O., Séveno, J., Davidovich, O. I., Davidovich, N. A., Witkowski, A., Kristoffersen, J. B., Benali, A., Ioannou, E., Koutsaviti, A., Roussis, V., Gâteau, H., Phimmaha, S., Leignel, V., Badawi, M., ... Mouget, J.-L. (2022). What Was Old Is New Again: The Pennate Diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon) Simonsen in the Multi-Omic Age. *Marine Drugs*, 20(4), 234. <https://doi.org/10.3390/md20040234>
- Gaillon, B. (1820). Des huîtres vertes, et des causes de cette coloration. *J. de Physique, de Chimie, d'histoire Naturelle et des Arts*, 91, 222-225.
- Gang, Y., Eom, T.-Y., Marasinghe, S. D., Lee, Y., Jo, E. et Oh, C. (2021). Optimising the DPPH Assay for Cell-Free Marine Microorganism Supernatants. *Marine Drugs*, 19(5). <https://doi.org/10.3390/md19050256>

- Garcia, L. G. S., de Melo Guedes, G. M., Fonseca, X. M. Q. C., Pereira-Neto, W. A., Castelo-Branco, D. S. C. M., Sidrim, J. J. C., de Aguiar Cordeiro, R., Rocha, M. F. G., Vieira, R. S. et Brilhante, R. S. N. (2020). Antifungal activity of different molecular weight chitosans against planktonic cells and biofilm of *Sporothrix brasiliensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, *143*, 341-348. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.031>
- Gargouch, N., Touchard, R., Marec, H., Luc Mouget, J., Pruvost, J. et Massé, A. (2022). Submerged membrane photobioreactor for the cultivation of *Haslea ostrearia* and the continuous extraction of extracellular marennine. *Bioresource Technology*, *350*, 126922. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126922>
- Gastineau, R. (2011). *Biodiversité, reproduction et phylogénie des diatomées bleues du genre Haslea et valorisation de leurs pigments de type marennine* [Thèse, Université du Maine]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00690700>
- Gastineau, R., Hansen, G., Davidovich, N. A., Davidovich, O. I., Bardeau, J.-F., Kaczmarska, I., Ehrman, J. M., Leignel, V., Hardivillier, Y., Jacquette, B., Poulin, M., Moraçais, M., Fleurence, J. et Mouget, J.-L. (2016). A new blue-pigmented hasleoid diatom, *Haslea provincialis*, from the Mediterranean Sea. *European Journal of Phycology*, *51*(2), 156-170. <https://doi.org/10.1080/09670262.2015.1110861>
- Gastineau, R., Hansen, G., Poulin, M., Lemieux, C., Turmel, M., Bardeau, J.-F., Leignel, V., Hardivillier, Y., Moraçais, M., Fleurence, J., Gaudin, P., Méléder, V., Cox, E. J., Davidovich, N. A., Davidovich, O. I., Witkowski, A., Kaczmarska, I., Ehrman, J. M., Soler Onís, E., ... Mouget, J.-L. (2021). *Haslea silbo*, A Novel Cosmopolitan Species of Blue Diatoms. *Biology*, *10*(4), 328. <https://doi.org/10.3390/biology10040328>
- Gastineau, R., Pouvreau, J.-B., Hellio, C., Moraçais, M., Fleurence, J., Gaudin, P., Bourgougnon, N. et Mouget, J.-L. (2012). Biological Activities of Purified Marennine, the Blue Pigment Responsible for the Greening of Oysters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(14), 3599-3605. <https://doi.org/10.1021/jf205004x>
- Gastineau, R., Prasetya, F., Falaise, C., Cognie, B., Decottignies, P., Moraçais, M., Méléder, V., Davidovich, N. A., Turcotte, F., Tremblay, R., Pasetto, P., Dittmer, J., Bardeau, J.-F., Pouvreau, J.-B. et Mouget, J.-L. (2018). Marennine-Like Pigments: Blue Diatom or Green Oyster Cult? <https://doi.org/10.1002/9783527801718.ch16>

- 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., Jacquette, B., Leignel, V., Hardivillier, Y., Marcotte, I., Bourgougnon, N., Tremblay, R., ... Mouget, J.-L. (2014). Marennine, Promising Blue Pigments from a Widespread *Haslea* Diatom Species Complex. *Marine Drugs*, 12(6), 3161-3189. <https://doi.org/10.3390/md12063161>
- Gaudin, P., Lebeau, T. et Robert, J.-M. (2006). Microalgal cell immobilization for the long-term storage of the marine diatom *Haslea ostrearia*. *Journal of Applied Phycology*, 18(2), 175-184. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9092-0>
- Ge, Y., Duan, Y., Fang, G., Zhang, Y. et Wang, S. (2009). Polysaccharides from fruit calyx of *Physalis alkekengi* var. *francheti*: Isolation, purification, structural features and antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, 77(2), 188-193. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.12.020>
- Geider, R., Piatt, T. et Raven, J. (1986). Size dependence of growth and photosynthesis in diatoms: a synthesis. *Marine Ecology Progress Series*, 30, 93-104. <https://doi.org/10.3354/meps030093>
- Genard, B., Pernet, F., Lemarchand, K., Boudry, P., Moraga, D. et Tremblay, R. (2011). Physiological and biochemical changes associated with massive mortality events occurring in larvae of American oyster (*Crassostrea virginica*). *Aquatic Living Resources*, 24(3), 247-260. <https://doi.org/10.1051/alr/2011114>
- Gephart, J. A., Henriksson, P. J. G., Parker, R. W. R., Shepon, A., Gorospe, K. D., Bergman, K., Eshel, G., Golden, C. D., Halpern, B. S., Hornborg, S., Jonell, M., Metian, M., Mifflin, K., Newton, R., Tyedmers, P., Zhang, W., Ziegler, F. et Troell, M. (2021). Environmental performance of blue foods. *Nature*, 597(7876), 360-365. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03889-2>
- Ghobara, M. M., Ghobara, M. M., Mazumder, N., Vinayak, V., Reissig, L., Gebeshuber, I. C., Tiffany, M. A., Gordon, R. et Gordon, R. (2019). On Light and Diatoms: A Photonics and Photobiology Review. Dans *Diatoms: Fundamentals and Applications* (p. 129-189). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119370741.ch7>
- Gompertz, B. (1997). On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies. In a letter to Francis Baily, Esq. F. R. S. &c. By Benjamin Gompertz, Esq. F. R. S. *Abstracts of the Papers Printed in the Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 2, 252-253. <https://doi.org/10.1098/rspl.1815.0271>

- Gordon, R., Losic, D., Tiffany, M. A., Nagy, S. S. et Sterrenburg, F. A. S. (2009). The Glass Menagerie: diatoms for novel applications in nanotechnology. *Trends in Biotechnology*, 27(2), 116-127. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.003>
- Goss, R., Wilhelm, C. et Jakob, T. (2020). Chapter 13 - Photosynthesis in diatoms. Dans O. Konur (dir.), *Handbook of Algal Science, Technology and Medicine* (p. 217-229). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818305-2.00013-9>
- Gügi, B., Le Costaouec, T., Burel, C., Lerouge, P., Helbert, W. et Bardor, M. (2015). Diatom-Specific Oligosaccharide and Polysaccharide Structures Help to Unravel Biosynthetic Capabilities in Diatoms. *Marine Drugs*, 13(9), 5993-6018. <https://doi.org/10.3390/md13095993>
- Guillard, R. R. L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. Dans W. L. Smith et M. H. Chanley (dir.), *Culture of Marine Invertebrate Animals: Proceedings — 1st Conference on Culture of Marine Invertebrate Animals Greenport* (p. 29-60). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3
- Guiry, M. D. et Guiry, G. M. (2024). AlgaeBase. *World-wide electronic publication*. Récupéré le le 4 juin 2024 de <https://www.algaebase.org>
- He, Y., Hou, W., Thompson, M., Holovics, H., Hobson, T. et Jones, M. T. (2014). Size exclusion chromatography of polysaccharides with reverse phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1323, 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.11.010>
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. et Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- Hemalatha, A., Parthiban, C., Saranya, C., Girija, K. et Anantharaman, P. (2015). Evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of different solvent extracts of selected marine diatoms. *IJMS Vol.44(10) [October 2015]*. <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/34993>
- Hense, I. et Beckmann, A. (2015). A theoretical investigation of the diatom cell size reduction–restitution cycle. *Ecological Modelling*, 317, 66-82. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2015.09.003>
- Hessen, D. O. et Anderson, T. R. (2008). Excess carbon in aquatic organisms and ecosystems: Physiological, ecological, and evolutionary implications. *Limnology and Oceanography*, 53(4), 1685-1696. <https://doi.org/10.4319/lo.2008.53.4.1685>

- Hillebrand, H., Dürselen, C.-D., Kirschtel, D., Pollinger, U. et Zohary, T. (1999). Biovolume Calculation for Pelagic and Benthic Microalgae. *Journal of Phycology*, 35(2), 403-424. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x>
- Hosseini Abari, A., Amini Rourani, H., Ghasemi, S. M., Kim, H. et Kim, Y.-G. (2021). Investigation of antioxidant and anticancer activities of unsaturated oligogalacturonic acids produced by pectinase of *Streptomyces hydrogenans* YAM1. *Scientific Reports*, 11, 8491. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87804-9>
- Istomina, A., Yelovskaya, O., Chelomin, V., Karpenko, A. et Zvyagintsev, A. (2021). Antioxidant activity of Far Eastern bivalves in their natural habitat. *Marine Environmental Research*, 169, 105383. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105383>
- Jiang, H., Luan, Z., Fan, Z., Wu, X., Xu, Z., Zhou, T. et Wang, H. (2021). Antibacterial, Antibiofilm, and Antioxidant Activity of Polysaccharides Obtained from Fresh Sarcotesta of *Ginkgo biloba*: Bioactive Polysaccharide that Can Be Exploited as a Novel Biocontrol Agent. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2021, 5518403. <https://doi.org/10.1155/2021/5518403>
- Joux-Arab, L., Berthet, B. et Robert, J.-M. (2000). Do toxicity and accumulation of copper change during size reduction in the marine pennate diatom *Haslea ostrearia*? *Marine Biology*, 136(2), 323-330. <https://doi.org/10.1007/s002270050690>
- Jun, J.-Y., Jung, M.-J., Jeong, I.-H., Yamazaki, K., Kawai, Y. et Kim, B.-M. (2018). Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae against Dental Plaque Bacteria. *Marine Drugs*, 16(9), 301. <https://doi.org/10.3390/md16090301>
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K. et Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>
- Lamouroux, J.-V.-F. (1779-1825) A. du texte, Bory de Saint-Vincent, J.-B.-G.-M. (1778-1846) A. du texte et Eudes-Deslongchamps, J.-A. (1794-1867) A. du texte. (1827). Encyclopédie méthodique ou par ordre de matières. *Histoire naturelle des zoophytes, ou animaux rayonnés : faisant suite à L'histoire naturelle des vers de Bruguière. Tome Second* (vol. 2). Chez Mme Veuve Agasse Imprimeur-Libraire. 14 vol. <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k98270g>
- Laroche, C. (2022). Exopolysaccharides from Microalgae and Cyanobacteria: Diversity of Strains, Production Strategies, and Applications. *Marine Drugs*, 20(5), 336. <https://doi.org/10.3390/md20050336>

- Latasa, M. et Berdalet, E. (1994). Effect of nitrogen or phosphorus starvation on pigment composition of cultured *Heterocapsa* sp. *Journal of Plankton Research*, 16(1), 83-94. <https://doi.org/10.1093/plankt/16.1.83>
- Latour, J. C.-T., Bernier, S.-B., Doiron, K., Tremblay, R. et Lemarchand, K. (2023). Effect of marennine on the rearing medium and microbiota of *Mytilus edulis* larvae and its protective effect after exposure to the pathogenic *Vibrio splendidus*. *Journal of Applied Aquaculture*, 0(0), 1-21. <https://doi.org/10.1080/10454438.2023.2236096>
- Lattos, A., Papadopoulos, D. K., Feidantsis, K., Giantsis, I. A., Georgoulis, I., Karagiannis, D. et Michaelidis, B. (2023). Antioxidant Defense of *Mytilus galloprovincialis* Mussels Induced by Marine Heatwaves in Correlation with *Marteilia* Pathogen Presence. *Fishes*, 8(8), 408. <https://doi.org/10.3390/fishes8080408>
- Laurent, B. et Cognie, B. (2000). Revival capacity of diatoms in bivalve pseudofaeces and faeces. *Diatom Research*, 15, 11-17. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2000.9705483>
- Lebeau, T., Gaudin, P., Junter, G.-A., Mignot, L. et Robert, J.-M. (2000). Continuous marennin production by agar-entrapped *Haslea ostrearia* using a tubular photobioreactor with internal illumination. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(5), 634-640. <https://doi.org/10.1007/s002530000380>
- Lebeau, T., Gaudin, P., Moan, R. et Robert, J.-M. (2002). A new photobioreactor for continuous marennin production with a marine diatom: influence of the light intensity and the immobilised-cell matrix (alginate beads or agar layer). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2), 153-159. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-0993-9>
- Lebeau, T., Junter, G.-A., Jouenne, T. et Robert, J.-M. (1999). Marennine production by agar-entrapped *Haslea ostrearia* Simonsen. *Bioresource Technology*, 67(1), 13-17. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00096-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00096-6)
- Lebeau, T. et Robert, J.-M. (2003). Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: Current and putative products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(6), 624-632. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1177-3>
- Lépinay, A., Capiiaux, H., Turpin, V., Mondeguer, F. et Lebeau, T. (2016). Bacterial community structure of the marine diatom *Haslea ostrearia*. *Algal Research*, 16, 418-426. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.04.011>

- Lépinay, A., Turpin, V., Mondeguer, F., Grandet-Marchant, Q., Capiiaux, H., Baron, R. et Lebeau, T. (2018). First insight on interactions between bacteria and the marine diatom *Haslea ostrearia*: Algal growth and metabolomic fingerprinting. *Algal Research*, 31, 395-405. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.023>
- Liu, M., Liu, Y., Cao, M.-J., Liu, G.-M., Chen, Q., Sun, L. et Chen, H. (2017). Antibacterial activity and mechanisms of depolymerized fucoidans isolated from *Laminaria japonica*. *Carbohydrate Polymers*, 172, 294-305. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.060>
- Lovio-Fragoso, J. P., de Jesús-Campos, D., López-Elías, J. A., Medina-Juárez, L. Á., Fimbres-Olivarría, D. et Hayano-Kanashiro, C. (2021). Biochemical and Molecular Aspects of Phosphorus Limitation in Diatoms and Their Relationship with Biomolecule Accumulation. *Biology*, 10(7), 565. <https://doi.org/10.3390/biology10070565>
- Lu, W., Yang, Z., Chen, J., Wang, D. et Zhang, Y. (2021). Recent advances in antiviral activities and potential mechanisms of sulfated polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 272, 118526. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118526>
- Lu, X., Nan, F., Feng, J., Lv, J., Liu, Q., Liu, X. et Xie, S. (2020). Effects of Different Environmental Factors on the Growth and Bioactive Substance Accumulation of *Porphyridium purpureum*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(7), 2221. <https://doi.org/10.3390/ijerph17072221>
- Luis, P. (2018). Chapter 1 - Introduction. Dans P. Luis (dir.), *Fundamental Modelling of Membrane Systems* (p. 1-23). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813483-2.00001-0>
- Maher, S., Maher, S., Aw, M. S. et Losic, D. (2019). Diatom Silica for Biomedical Applications. Dans *Diatoms: Fundamentals and Applications* (p. 511-536). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119370741.ch20>
- Malyutina, A., Tang, J. et Pessia, A. (2023). drda: An R Package for Dose-Response Data Analysis Using Logistic Functions. *Journal of Statistical Software*, 106, 1-26. <https://doi.org/10.18637/jss.v106.i04>
- Martinho De Brito, M., Bundeleva, I., Marin, F., Vennin, E., Wilmotte, A., Plasseraud, L. et Visscher, P. T. (2023). Properties of exopolymeric substances (EPSs) produced during cyanobacterial growth: potential role in whiting events. *Biogeosciences*, 20(15), 3165-3183. <https://doi.org/10.5194/bg-20-3165-2023>
- Medlin, L. K. et Kaczmarek, I. (2004). Evolution of the diatoms: V. Morphological and cytological support for the major clades and a taxonomic revision. *Phycologia*, 43(3), 245-270. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-43-3-245.1>

- Megherbi, M., Herbreteau, B., Faure, R., Dessalces, G. et Grenier-Loustalot, M. -F. (2008). Solid Phase Extraction of Oligo- and Polysaccharides; Application to Maltodextrins and Honey Qualitative Analysis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 31(7), 1033-1046. <https://doi.org/10.1080/10826070801924915>
- Meng, S., Liu, H., Zhao, Q., Shen, N. et Zhang, M. (2019). Filtration Performances of Different Polysaccharides in Microfiltration Process. *Processes*, 7(12), 897. <https://doi.org/10.3390/pr7120897>
- Méresse, S., Gateau, H., Tirnan, T., Larrigaldie, V., Casse, N., Pasetto, P., Mouget, J.-L., Mortaud, S. et Fodil, M. (2023). *Haslea ostrearia* Pigment Marennine Affects Key Actors of Neuroinflammation and Decreases Cell Migration in Murine Neuroglial Cell Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5388. <https://doi.org/10.3390/ijms24065388>
- Mishra, A., Medhi, K., Malaviya, P. et Thakur, I. S. (2019). Omics approaches for microalgal applications: Prospects and challenges. *Bioresource Technology*, 291, 121890. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121890>
- Mitchell, P. H., Mitchell, P. H. et Barney, R. L. (1917). *The occurrence in Virginia of green-gilled oysters similar to those of Marennes*. Govt. print. off. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.42831>
- Morant-Manceau, A., Nguyen, T. L. N., Pradier, E. et Tremblin, G. (2007). Carbonic anhydrase activity and photosynthesis in marine diatoms. *European Journal of Phycology*, 42(3), 263-270. <https://doi.org/10.1080/09670260701425522>
- Moreau, J. (1969). La flore planctonique et benthique des claires à huîtres et l'évolution pigmentaire de *Navicula ostrearia* B. Communication présentée au Congrès International de la Mer 1969, Comité des Mollusques et Crustacés. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00009/11976/>
- Mouget, J.-L., Gastineau, R., Davidovich, O. I., Gaudin, P. et Davidovich, N. A. (2009). Light is a key factor in triggering sexual reproduction in the pennate diatom *Haslea ostrearia*. *FEMS microbiology ecology*, 69(2), 194-201. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00700.x>
- Mouget, J.-L., Rosa, P. et Tremblin, G. (2004). Acclimation of *Haslea ostrearia* to light of different spectral qualities – confirmation of 'chromatic adaptation' in diatoms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 75(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2004.04.002>

- Mouget, J.-L., Rosa, P., Vachoux, C. et Tremblin, G. (2005). Enhancement of marennine production by blue light in the diatom *Haslea ostrearia*. *Journal of Applied Phycology*, 17(5), 437-445. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-0561-7>
- Mouget, J.-L., Tremblin, G., Morant-Manceau, A., Morançais, M. et Robert, J.-M. (1999). Long-term photoacclimation of *Haslea ostrearia* (Bacillariophyta): effect of irradiance on growth rates, pigment content and photosynthesis. *European Journal of Phycology*, 34(2), 109-115. <https://doi.org/10.1080/09670269910001736162>
- Myklestad, S. et Haug, A. (1972). Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 9(2), 125-136. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(72\)90041-X](https://doi.org/10.1016/0022-0981(72)90041-X)
- Myklestad, S., Holm-Hansen, O., Vårum, K. M. et Volcani, B. E. (1989). Rate of release of extracellular amino acids and carbohydrates from the marine diatom *Chaetoceros affinis*. *Journal of Plankton Research*, 11(4), 763-773. <https://doi.org/10.1093/plankt/11.4.763>
- Nassiri, Y., Robert, J.-M., Rincé, Y. et Ginsburger-Vogel, T. (1998). The cytoplasmic fine structure of the diatom *Haslea ostrearia* (Bacillariophyceae) in relation to marennine production. *Phycologia*, 37(2), 84-91. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-37-2-84.1>
- Naylor, R. L., Hardy, R. W., Buschmann, A. H., Bush, S. R., Cao, L., Klinger, D. H., Little, D. C., Lubchenco, J., Shumway, S. E. et Troell, M. (2021). A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*, 591(7851), 551-563. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03308-6>
- Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Schaechter, M., Neidhardt, F. C. et Schaechter, M. (1994). *Physiologie de la cellule bactérienne: une approche moléculaire*. Masson.
- Neuville, D. (1974). *L'HETEROTROPHIE CHEZ LES DIATOMÉES DES CLAIRES OSTREICOLES*.
- Newsome, A. G., Culver, C. A. et van Breemen, R. B. (2014). Nature's Palette: The Search for Natural Blue Colorants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6498-6511. <https://doi.org/10.1021/jf501419q>
- Nghiem Xuan, R., Mouget, J. L., Turpin, V., Jaouen, P. et Pruvost, J. (2021). Optimization of the growth and marennine production by the diatom *Haslea ostrearia* in photobioreactor. *Algal Research*, 55, 102251. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102251>

- Nghiem Xuan, R., Safitri, I., Mouget, J. L., Pruvost, J., Turpin, V. et Jaouen, P. (2020). Design of an artificial culture medium to optimize *Haslea ostrearia* biomass and marennine production. *Algal Research*, 45, 101653. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101653>
- Nghiem-Xuan, R. (2019). *Optimisation de la culture d'Haslea ostrearia en photobioréacteur* [Thèse de doctorat, Nantes]. <http://www.theses.fr/2019NANT4015>
- Noriega, S. E. et Subramanian, A. (2011). Consequences of Neutralization on the Proliferation and Cytoskeletal Organization of Chondrocytes on Chitosan-Based Matrices. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2011, e809743. <https://doi.org/10.1155/2011/809743>
- Nur, M. M. A., Swaminathan, M. K., Boelen, P. et Buma, A. G. J. (2019). Sulfated exopolysaccharide production and nutrient removal by the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* growing on palm oil mill effluent. *Journal of Applied Phycology*, 31(4), 2335-2348. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01780-2>
- Obata, T., Fernie, A. R. et Nunes-Nesi, A. (2013). The Central Carbon and Energy Metabolism of Marine Diatoms. *Metabolites*, 3(2), 325-346. <https://doi.org/10.3390/metabo3020325>
- Oyanedel, D., Labreuche, Y., Bruto, M., Amraoui, H., Robino, E., Haffner, P., Rubio, T., Charrière, G. M., Le Roux, F. et Destoumieux-Garzón, D. (2020). *Vibrio splendidus* O-antigen structure: a trade-off between virulence to oysters and resistance to grazers. *Environmental Microbiology*, 22(10), 4264-4278. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14996>
- Paillard, C., Roux, F. L. et Borrego, J. J. (2004). Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquatic Living Resources*, 17(4), 477-498. <https://doi.org/10.1051/alr:2004054>
- Pakhomov, A. A., Pletneva, N. V., Balashova, T. A. et Martynov, V. I. (2006). Structure and reactivity of the chromophore of a GFP-like chromoprotein from *Condylactis gigantea*. *Biochemistry*, 45(23), 7256-7264. <https://doi.org/10.1021/bi060207q>
- Pan, X. et Vachet, R. W. (2022). Membrane Protein Structures and Interactions from Covalent Labeling Coupled with Mass Spectrometry. *Mass spectrometry reviews*, 41(1), 51-69. <https://doi.org/10.1002/mas.21667>
- Parkinson, J. et Gordon, R. (1999). Beyond micromachining: the potential of diatoms. *Trends in Biotechnology*, 17(5), 190-196. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(99\)01321-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01321-9)

- Patel, A., Gami, B., Patel, P. et Patel, B. (2017). Microalgae: Antiquity to era of integrated technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71, 535-547. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.081>
- Pedron, E., Gargouch, N., Mouget, J.-L., Tremblay, R., Deschênes, J.-S., Massé, A. et Gonçalves, O. (2023). Hybrid photobioreactor operation for the intensified production of *Haslea ostrearia* and marennine in function of strain variability. *Algal Research*, 103285. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103285>
- Peng, L., Fu, D., Chu, H., Wang, Z. et Qi, H. (2020). Biofuel production from microalgae: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 18(2), 285-297. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00939-0>
- Perera, I. A., Abinandan, S., Subashchandrabose, S. R., Venkateswarlu, K., Cole, N., Naidu, R. et Megharaj, M. (2022). Extracellular Polymeric Substances Drive Symbiotic Interactions in Bacterial–Microalgal Consortia. *Microbial Ecology*, 83(3), 596-607. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01772-1>
- Pérez-Sánchez, T., Mora-Sánchez, B. et Balcázar, J. L. (2018). Biological Approaches for Disease Control in Aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges. *Trends in Microbiology*, 26(11), 896-903. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.002>
- Permatasari, I., Prasetya, F. S., Arsad, S., Agung, M. U. K. et Mouget, J.-L. (2019). Antibacterial Activity of *Haslea ostrearia* Supernatant Adapted in Indonesia against Pathogenic Bacteria Relevant to Mariculture (*In-Vitro* Study). *Omni-Akuatika*, 15(1), 30-38. <https://doi.org/10.20884/1.oa.2019.15.1.626>
- Perron, N. R. et Brumaghim, J. L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53(2), 75-100. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9043-x>
- Petersen, Joh. C. G. (1914). “Grüne Austern” in Dänemark in 1911—1912. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 7(1), 39-41. <https://doi.org/10.1002/iroh.19140070103>
- Phan, H. T. T., Yoda, T., Chahal, B., Morita, M., Takagi, M. et Vestergaard, M. C. (2014). Structure-dependent interactions of polyphenols with a biomimetic membrane system. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1838(10), 2670-2677. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.07.001>
- Pierre, G., Zhao, J.-M., Orvain, F., Dupuy, C., Klein, G. L., Graber, M. et Maugard, T. (2014). Seasonal dynamics of extracellular polymeric substances (EPS) in surface sediments of a diatom-dominated intertidal mudflat (Marennes–Oléron, France). *Journal of Sea Research*, 92, 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2013.07.018>

- Polaczek, E., Stobiński, L., Mazurkiewicz, J., Tomasik, P., Kołoczek, H. et Lin, H. (2007). Interactions of anionic polysaccharides with carbon nanotubes. *Polimery*, 52(1), 34-38.
- Pouličková, A., Mann, D. G. et Mann, D. G. (2019). Diatom Sexual Reproduction and Life Cycles. Dans *Diatoms: Fundamentals and Applications* (p. 245-272). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119370741.ch11>
- Poulin, M. et Méléder, V. (2019, juillet). *Typification of the first recognized blue pigmented diatom, Haslea ostrearia (Bacillariophyceae)* [Text]. Meise Botanic Garden and Royal Botanical Society of Belgium. <https://www.ingentaconnect.com/content/botbel/plecevo/2019/00000152/00000002/art00025>
- Pouvreau, J.-B. (2006). *Purification et caractérisation du pigment bleu-vert « marennine » synthétisé par la diatomée marine Haslea ostrearia (Gaillon/Bory) Simonsen : propriétés physico-chimiques et activités biologiques.*
- Pouvreau, J.-B., Housson, E., Tallec, L. L., Morançais, M., Rincé, Y., Fleurence, J. et 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. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 352(1), 212-225. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.07.011>
- Pouvreau, J.-B., Michèle Morançais, Taran, F., Rosa, P., Laurent Dufossé, Fabienne Guérard, Pin, S., Fleurence, J. et Pondaven, P. (2008a). 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6278-6286. <https://doi.org/10.1021/jf073187n>
- Pouvreau, J.-B., Morançais, M., Fleury, F., Rosa, P., Thion, L., Cahingt, B., Zal, F., Fleurence, J. et Pondaven, P. (2006a). Preliminary characterisation of the blue-green pigment “marennine” from the marine tychopelagic diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *Journal of Applied Phycology*, 18(6), 757-767. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9087-x>
- Pouvreau, J.-B., Morançais, M., Massé, G., Rosa, P., Robert, J.-M., Fleurence, J. et Pondaven, P. (2006b). Purification of the blue-green pigment “marennine” from the marine tychopelagic diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *Journal of Applied Phycology*, 18(6), 769-781. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9088-9>

- Pouvreau, J.-B., Morançais, M., Pondaven, P., Fleurence, J., Guérard, F. et Dufossé, L. (2008b). Colorimetric study of marennine, a blue-green pigment from the diatom *Haslea ostrearia* responsible for natural greening of cultured oyster. (p. 174--177). 5th International Congress on Pigments in Food – Pigments in Food – For Quality and Health. <https://hal.univ-reunion.fr/hal-01187351>
- Prasetya, F. S. (2015). *Greening phenomenon in bivalve by marennine produced from Haslea ostrearia and its consequences on bivalve's integrated response* [Thèse, Université du Maine]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01279527>
- Prasetya, F. S., Comeau, L. A., Gastineau, R., Decottignies, P., Cognie, B., Morançais, M., Turcotte, F., Mouget, J.-L. et Tremblay, R. (2017a). Effect of marennine produced by the blue diatom *Haslea ostrearia* on behavioral, physiological and biochemical traits of juvenile *Mytilus edulis* and *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*, 467, 138-148. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.029>
- Prasetya, F. S., Decottignies, P., Barillé, L., Gastineau, R., Jacquette, B., Figiel, A., Morançais, M., Tremblay, R., Mouget, J.-L. et Cognie, B. (2017b). Cell size-based, passive selection of the blue diatom *Haslea ostrearia* by the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Molluscan Studies*, 83(2), 145-152. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyx012>
- Prasetya, F. S., Decottignies, P., Tremblay, R., Mouget, J.-L., Sunarto, S., Iskandar, I., Dhahiyat, Y. et Cognie, B. (2020a). Not only greening: The effects of marennine produced by *Haslea ostrearia* on physiological traits of three bivalve species. *Aquaculture Reports*, 18, 100546. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100546>
- Prasetya, F. S., Foret, M., Deschênes, J.-S., Gastineau, R., Mouget, J.-L. et Tremblay, R. (2022). Semi-continuous system for benthic diatom cultivation and marennine production. *Algal Research*, 62, 102633. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102633>
- Prasetya, F. S., Ramdhani, D. S., Mulyani, Y., Agung, M. U. K., Arsad, S. et Mouget, J.-L. (2021). Antioxidant activities of culture supernatant *Haslea ostrearia* adapted in Indonesia. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 14(1), 9.
- Prasetya, F. S., Safitri, I., Widowati, I., Cognie, B., Decottignies, P., Gastineau, R., Morançais, M., Windarto, E., Tremblay, R. et Mouget, J.-L. (2016). Does allelopathy affect co-culturing *Haslea ostrearia* with other microalgae relevant to aquaculture? *Journal of Applied Phycology*, 28(4), 2241-2254. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0779-y>

- Prasetya, F. S., Sunarto, S., Bachtiar, E., Agung, M. U. K., Nathanael, B., Pambudi, A. C., Lestari, A. D., Astuty, S. et Mouget, J.-L. (2020b). Effect of the blue pigment produced by the tropical diatom *Haslea nusantara* on marine organisms from different trophic levels and its bioactivity. *Aquaculture Reports*, *17*, 100389. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100389>
- Provasoli, L., McLaughlin, J. J. A. et Droop, M. R. (1957). The development of artificial media for marine algae. *Archiv für Mikrobiologie*, *25*(4), 392-428. <https://doi.org/10.1007/BF00446694>
- Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G. et Legrand, J. (2009). Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource Technology*, *100*(23), 5988-5995. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.004>
- Rahmawati, I. S., Kusumaningrum, H. D., Yuliana, N. D. et Sitanggang, A. B. (2023). A systematic review and meta-analysis of *in vitro* antibacterial activity of depolymerised polysaccharides. *International Journal of Food Science & Technology*, *58*(6), 2842-2856. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16423>
- Rani, V. (2017). Influence of Species, Geographic Location, Seasonal Variation and Extraction Method on the Fucoïdan Yield of the Brown Seaweeds of Gulf of Mannar, India. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *79*(01). <https://doi.org/10.4172/pharmaceutical-sciences.1000202>
- Rathnachalam, S., Menger, M. F. S. J. et Faraji, S. (2021). Influence of the Environment on Shaping the Absorption of Monomeric Infrared Fluorescent Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, *125*(9), 2231-2240. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c10466>
- Rech, M. (2004). *Effets de l'éclairage visible et ultraviolet sur la croissance et la photosynthèse de microalgues : incidences sur l'écophysiologie du phytoplancton des claires ostréicoles*. <http://www.theses.fr/2004LEMA1008/document>
- Rech, M. (2008). Carbon fixation and carbonic anhydrase activity in *Haslea ostrearia* (Bacillariophyceae) in relation to growth irradiance. *Photosynthetica*, *v. 46*(1), 56-62, 4398996. <https://doi.org/10.1007/s11099-008-0011-2>
- Ren, Y., Bai, Y., Zhang, Z., Cai, W. et Del Rio Flores, A. (2019). The Preparation and Structure Analysis Methods of Natural Polysaccharides of Plants and Fungi: A Review of Recent Development. *Molecules*, *24*(17), 3122. <https://doi.org/10.3390/molecules24173122>

- Rincé, Y., Lebeau, T. et Robert, J. M. (1999). Artificial cell-immobilization: a model simulating immobilization in natural environments? *Journal of Applied Phycology*, *11*(3), 263-271. <https://doi.org/10.1023/A:1008144307248>
- Ritchie, R. J. (2008). Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica*, *46*(1), 115-126. <https://doi.org/10.1007/s11099-008-0019-7>
- Robert, J.-M. (1973). La diatomée *Navicula ostrearia* Bory en baie de Bourgneuf. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, *37*(3), 363-368.
- Robert, J.-M. (1983). *Fertilité des eaux des claires ostréicoles et verdissement: utilisation de l'azote par les diatomées dominantes.*
- Robert, J.-M., Maestrini, S., Heral, M. et Zanette, Y. (1981). Production des micro-algues des claires ostréicoles en relation avec l'azote organique dissous excrété par les huîtres. Symposium International sur les lagunes côtières, SCOR/IABO/UNESCO - Proceedings International Symposium on coastal lagoones, SCOR/IABO/UNESCO. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/2946/>
- Robert, J.-M., Morançais, M., Pradier, E., Mouget, J.-L. et Tremblin, G. (2002). Extraction and quantitative analysis of the blue-green pigment "marennine" synthesized by the diatom *Haslea ostrearia*. *Journal of Applied Phycology*, *14*(4), 299-305. <https://doi.org/10.1023/A:1021184532581>
- Roberts, K., Granum, E., Leegood, R. C. et Raven, J. A. (2007). C3 and C4 Pathways of Photosynthetic Carbon Assimilation in Marine Diatoms Are under Genetic, Not Environmental, Control. *Plant Physiology*, *145*(1), 230-235. <https://doi.org/10.1104/pp.107.102616>
- Roeselers, G., van Loosdrecht, M. C. M. et Muyzer, G. (2007). Heterotrophic Pioneers Facilitate Phototrophic Biofilm Development. *Microbial Ecology*, *54*(3), 578-585. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9238-x>
- Rossignol, N., Jaouen, P., Robert, J.-M. et Quéméneur, F. (2000a). Production of exocellular pigment by the marine diatom *Haslea ostrearia* Simonsen in a photobioreactor equipped with immersed ultrafiltration membranes. *Bioresource Technology*, *73*(2), 197-200. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00171-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00171-6)
- Rossignol, N., Lebeau, T., Jaouen, P. et Robert, J. M. (2000b). Comparison of two membrane – photobioreactors, with free or immobilized cells, for the production of pigments by a marine diatom. *Bioprocess Engineering*, *23*(5), 495-501. <https://doi.org/10.1007/s004499900186>

- Round, F. E., Crawford, R. M. et Mann, D. G. (1990). *Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge University Press.
- Rozi, P., Abuduwaili, A., Mutailifu, P., Gao, Y., Rakhmanberdieva, R., Aisa, H. A. et Yili, A. (2019). Sequential extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Fritillaria pallidiflora* Schrenk. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.029>
- Ruggiero, M. V., Kooistra, W. H. C. F., Piredda, R., Sarno, D., Zampicinini, G., Zingone, A. et Montesor, M. (2022). Temporal changes of genetic structure and diversity in a marine diatom genus discovered via metabarcoding. *Environmental DNA*, 4(4), 763-775. <https://doi.org/10.1002/edn3.288>
- Sabater, S. (2009). Diatoms. Dans G. E. Likens (dir.), *Encyclopedia of Inland Waters* (p. 149-156). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012370626-3.00135-6>
- Sanches-Fernandes, G. M. M., Sá-Correia, I. et Costa, R. (2022). Vibriosis Outbreaks in Aquaculture: Addressing Environmental and Public Health Concerns and Preventive Therapies Using Gilthead Seabream Farming as a Model System. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.904815>
- Sanniyasi, E., Patrick, A. P. R., Rajagopalan, K., Gopal, R. K. et Damodharan, R. (2022). Characterization and in vitro anticancer potential of exopolysaccharide extracted from a freshwater diatom *Nitzschia palea* (Kütz.) W.Sm. 1856. *Scientific Reports*, 12(1), 22114. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24662-z>
- Savio, S., Farrotti, S., Di Giulio, A., De Santis, S., Ellwood, N. T. W., Ceschin, S. et Congestri, R. (2022). Functionalization of Frustules of the Diatom *Staurosirella pinnata* for Nickel (Ni) Adsorption From Contaminated Aqueous Solutions. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmars.2022.889832>
- Sayem, S. A., Manzo, E., Ciavatta, L., Tramice, A., Cordone, A., Zanfardino, A., De Felice, M. et Varcamonti, M. (2011). Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 74. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-74>
- Scarsini, M., Marchand, J., Manoylov, K. M. et Schoefs, B. (2019). Photosynthesis in Diatoms. Dans *Diatoms: Fundamentals and Applications* (p. 191-211). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119370741.ch8>

- Schaich, K. M., Tian, X. et Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, *14*, 111-125. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.043>
- Schubert, H., Tremblin, G., Robert, J.-M., Sagert, S. et Rincé, Y. (1995). *In-Vivo* Fluorescence Measurement of Photosynthesis of *Haslea Ostrearia* Simonsen in Relation to Marennine Content. *Diatom Research*, *10*(2), 341-349. <https://doi.org/10.1080/0269249X.1995.9705354>
- Seveno, J., Car, A., Sirjacobs, D., Fullgrabe, L., Dupčić Radić, I., Lejeune, P., Leignel, V. et Mouget, J.-L. (2023). Benthic Diatom Blooms of Blue *Haslea spp.* in the Mediterranean Sea. *Marine Drugs*, *21*(11), 583. <https://doi.org/10.3390/md21110583>
- Sharpe, S. C., Koester, J. A., Loebel, M., Cockshutt, A. M., Campbell, D. A., Irwin, A. J. et Finkel, Z. V. (2012). Influence of Cell Size and DNA Content on Growth Rate and Photosystem II Function in Cryptic Species of *Ditylum brightwellii*. *PLOS ONE*, *7*(12), e52916. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052916>
- Shimamura, T., Sumikura, Y., Yamazaki, T., Tada, A., Kashiwagi, T., Ishikawa, H., Matsui, T., Sugimoto, N., Akiyama, H. et Ukeda, H. (2014). Applicability of the DPPH Assay for Evaluating the Antioxidant Capacity of Food Additives – Inter-laboratory Evaluation Study –. *Analytical Sciences*, *30*(7), 717-721. <https://doi.org/10.2116/analsci.30.717>
- Shnyukova, E. I. et Zolotariova, Y. K. (2015). Diatom Exopolysaccharides: a Review. *International Journal on Algae*, *17*(1). <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v17.i1.50>
- Simonsen, R. (1974). The diatom plankton of the Indian Ocean Expedition of R/V « Meteor » 1964-1965. *Meteor Forschungsergebnisse: Reihe D, Biologie*, *19*, 1-107.
- Soletchnik, P., Le Moine, O., Gouletquer, P., Geairon, P., Razet, D., Fauray, N., Fouché, D. et Robert, S. (2001). Optimisation of the traditional Pacific cupped oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) culture on the French Atlantic coastline: autumnal fattening in semi-closed ponds. *Aquaculture*, *199*(1), 73-91. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00554-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00554-3)
- Spaulding, S. A., Potapova, M. G., Bishop, I. W., Lee, S. S., Gasperak, T. S., Jovanoska, E., Furey, P. C. et Edlund, M. B. (2021). *Diatoms.org*: supporting taxonomists, connecting communities. *Diatom Research*, *36*(4), 291-304. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2021.2006790>

- Staats, N., Stal, L., Winder, B. et Mur, L. (2000). Oxygenic photosynthesis as driving process in exopolysaccharide production of benthic diatoms. *Marine Ecology-progress Series - MAR ECOL-PROGR SER*, 193, 261-269. <https://doi.org/10.3354/meps193261>
- Sun, H., Qi, D., Xu, J., Juan, S. et Zhe, C. (2011). Fractionation of polysaccharides from rapeseed by ultrafiltration: Effect of molecular pore size and operation conditions on the membrane performance. *Separation and Purification Technology - SEP PURIF TECHNOL*, 80, 670-676. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.06.038>
- Tanabe, M., Ueno, Y., Yokono, M., Shen, J.-R., Nagao, R. et Akimoto, S. (2020). Changes in excitation relaxation of diatoms in response to fluctuating light, probed by fluorescence spectroscopies. *Photosynthesis Research*, 146(1), 143-150. <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00720-3>
- Tardy-Laporte, C., Arnold, A. A., Genard, B., Gastineau, R., Morancais, M., Mouget, J.-L., Tremblay, R. et Marcotte, I. (2013). A 2H solid-state NMR study of the effect of antimicrobial agents on intact *Escherichia coli* without mutating. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1828(2), 614-622. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.09.011>
- Thessen, A. E., Bowers, H. A. et Stoecker, D. K. (2009). Intra- and interspecies differences in growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia* while using different nitrogen sources. *Harmful Algae*, 8(5), 792-810. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.01.003>
- Thiviyanathan, V. A., Ker, P. J., Hoon Tang, S. G., Amin, E. PP., Yee, W., Hannan, M. A., Jamaludin, Z., Nghiem, L. D. et Indra Mahlia, T. M. (2024). Microalgae biomass and biomolecule quantification: Optical techniques, challenges and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 189, 113926. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2023.113926>
- Tiwari, S., Tiwari, S., Singh, M., Singh, A. et Prasad, S. M. (2017). Generation Mechanisms of Reactive Oxygen Species in the Plant Cell. Dans *Reactive Oxygen Species in Plants* (p. 1-22). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119324928.ch1>
- Tjørve, K. M. C. et Tjørve, E. (2017). The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. *PLOS ONE*, 12(6), e0178691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178691>
- Tong, C. Y., Honda, K. et Derek, C. J. C. (2023). A review on microalgal-bacterial co-culture: The multifaceted role of beneficial bacteria towards enhancement of microalgal metabolite production. *Environmental Research*, 228, 115872. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115872>

- Tremblin, G., Cannuel, R., Mouget, J.-L., Rech, M. et Robert, J.-M. (2000). Change in light quality due to a blue-green pigment, marennine, released in oyster-ponds: effect on growth and photosynthesis in two diatoms, *Haslea ostrearia* and *Skeletonema costatum*. *Journal of Applied Phycology*, 12(6), 557-566. <https://doi.org/10.1023/A:1026502713075>
- Tsoraev, G. V., Protasova, E. A., Klimanova, E. A., Ryzhykau, Y. L., Kuklin, A. I., Semenov, Y. S., Ge, B., Li, W., Qin, S., Friedrich, T., Sluchanko, N. N. et Maksimov, E. G. (2022). Anti-Stokes fluorescence excitation reveals conformational mobility of the C-phycoerythrin chromophores. *Structural Dynamics*, 9(5), 054701. <https://doi.org/10.1063/4.0000164>
- Tuke. (1662, 17 décembre). *The History of the Generation, and Ordering of the Green Oysters, commonly called Colnchester Oysters*. https://makingscience.royalsociety.org/items/ms_215_10/the-history-of-the-generation-and-ordering-of-the-green-oysters-commonly-called-colnchester-oysters-by-coll-tuke
- Turcotte, F., Mouget, J.-L., Genard, B., Lemarchand, K., Deschênes, J.-S. et Tremblay, R. (2016). Prophylactic effect of *Haslea ostrearia* culture supernatant containing the pigment marennine to stabilize bivalve hatchery production. *Aquatic Living Resources*, 29(4), 401. <https://doi.org/10.1051/alr/2016032>
- Turpin, D. H. et Harrison, P. J. (1980). Cell Size Manipulation in Natural Marine, Planktonic, Diatom Communities. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(7), 1193-1195. <https://doi.org/10.1139/f80-152>
- Turpin, V. (1999). *Étude des événements physicochimiques et biologiques présidant à la prolifération d'Haslea ostrearia (Simonsen) dans les claires ostréicoles de la région de Marennes-Oléron : implications dans la maîtrise du verdissement* [Université de Nantes]. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00034/14560/>
- Turpin, V., Robert, J.-M. et Gouletquer, P. (1999). Limiting nutrients of oyster pond seawaters in the Marennes-Oléron region for *Haslea ostrearia*: applications to the mass production of the diatom in mesocosm experiments. *Aquatic Living Resources*, 12(5), 335-342. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(99\)00114-X](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(99)00114-X)
- Turpin, V., Robert, J.-M., Gouletquer, P., Massé, G. et Rosa, P. (2001). Oyster greening by outdoor mass culture of the diatom *Haslea ostrearia* Simonsen in enriched seawater. *Aquaculture Research*, 32(10), 801-809. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00615.x>

- Underwood, G. J. C., Boulcott, M., Raines, C. A. et Waldron, K. (2004). Environmental Effects on Exopolymer Production by Marine Benthic Diatoms: Dynamics, Changes in Composition, and Pathways of Production1. *Journal of Phycology*, 40(2), 293-304. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.03076.x>
- UNICEF. (2022). *Places and Spaces: Environments and children's well-being*. <https://www.unicef-irc.org/places-and-spaces>
- Urbani, R., Magaletti, E., Sist, P. et Cicero, A. M. (2005). Extracellular carbohydrates released by the marine diatoms *Cylindrotheca closterium*, *Thalassiosira pseudonana* and *Skeletonema costatum*: Effect of P-depletion and growth status. *Science of The Total Environment*, 353(1), 300-306. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.09.026>
- Urbani, R., Sist, P., Pletikapić, G., Radić, T. M., Svetličić, V. et Žutic, V. (2012). *Diatom Polysaccharides: Extracellular Production, Isolation and Molecular Characterization*. *The Complex World of Polysaccharides*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/51251>
- Vandanjon, L., Jaouen, P., Rossignol, N., Quéméneur, F. et Robert, J.-M. (1999). Concentration and desalting by membrane processes of a natural pigment produced by the marine diatom *Haslea ostrearia* Simonsen. Dans R. Osinga, J. Tramper, J. G. Burgess et R. H. Wijffels (dir.), *Progress in Industrial Microbiology* (vol. 35, p. 393-402). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(99\)80132-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(99)80132-5)
- Vunduk, J., Wan-Mohtar, W. A. A. Q. I., Mohamad, S. A., Abd Halim, N. H., Mohd Dzomir, A. Z., Žižak, Ž. et Klaus, A. (2019). Polysaccharides of *Pleurotus flabellatus* strain Mynuk produced by submerged fermentation as a promising novel tool against adhesion and biofilm formation of foodborne pathogens. *LWT*, 112, 108221. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.119>
- Walsh, D. J., Livinghouse, T., Goeres, D. M., Mettler, M. et Stewart, P. S. (2019). Antimicrobial Activity of Naturally Occurring Phenols and Derivatives Against Biofilm and Planktonic Bacteria. *Frontiers in Chemistry*, 7, 477956. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00653>
- Wang, J., Kan, L., Nie, S., Chen, H., Cui, S. W., Phillips, A. O., Phillips, G. O., Li, Y. et Xie, M. (2015). A comparison of chemical composition, bioactive components and antioxidant activity of natural and cultured *Cordyceps sinensis*. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 2-7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.109>
- Wang, J.-K. et Seibert, M. (2017). Prospects for commercial production of diatoms. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0699-y>

- Wang, Z., Sun, Q., Zhang, H., Wang, J., Fu, Q., Qiao, H. et Wang, Q. (2021). Insight into antibacterial mechanism of polysaccharides: A review. *LWT*, *150*, 111929. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111929>
- Wanner, U. et Egli, T. (1990). Dynamics of microbial growth and cell composition in batch culture. *FEMS Microbiology Letters*, *75*(1), 19-43. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(90\)90521-Q](https://doi.org/10.1016/0378-1097(90)90521-Q)
- Williams, R. B. (1964). Division Rates of Salt Marsh Diatoms in Relation to Salinity and Cell Size. *Ecology*, *45*(4), 877-880. <https://doi.org/10.2307/1934940>
- Wotton, R. S. (2004). The utiquity and many roles of exopolymers (EPS) in aquatic systems. *Scientia Marina*, *68*(S1), 13-21. <https://doi.org/10.3989/scimar.2004.68s113>
- Xiao, R. et Zheng, Y. (2016). Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnology Advances*, *34*(7), 1225-1244. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.004>
- Xu, G.-Y., Liao, A.-M., Huang, J.-H., Zhang, J.-G., Thakur, K. et Wei, Z.-J. (2019). Evaluation of structural, functional, and anti-oxidant potential of differentially extracted polysaccharides from potatoes peels. *International Journal of Biological Macromolecules*, *129*, 778-785. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.074>
- Xu, J., Yue, R.-Q., Liu, J., Ho, H.-M., Yi, T., Chen, H.-B. et Han, Q.-B. (2014). Structural diversity requires individual optimization of ethanol concentration in polysaccharide precipitation. *International Journal of Biological Macromolecules*, *67*, 205-209. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.03.036>
- Yang, Y. et Nagata, T. (2021). Viral Production in Seawater Filtered Through 0.2- μ m Pore-Size Filters: A Hidden Biogeochemical Cycle in a Neglected Realm. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.774849>
- Yuan, H., Lan, P., He, Y., Li, C. et Ma, X. (2020). Effect of the Modifications on the Physicochemical and Biological Properties of β -Glucan—A Critical Review. *Molecules*, *25*(1), 57. <https://doi.org/10.3390/molecules25010057>
- Yusuf, M., Baroroh, U., Nuwarda, R. F., Prasetya, F. S., Ishmayana, S., Novianti, M. T., Tohari, T. R., Hardianto, A., Subroto, T., Mouget, J.-L. et Pasetto, P. (2023). Theoretical and Experimental Studies on the Evidence of 1,3- β -Glucan in Marennine of *Haslea ostrearia*. *Molecules*, *28*(15), 5625. <https://doi.org/10.3390/molecules28155625>

- Zayed, A., El-Aasr, M., Ibrahim, A.-R. S. et Ulber, R. (2020). Fucoidan Characterization: Determination of Purity and Physicochemical and Chemical Properties. *Marine Drugs*, 18(11), 571. <https://doi.org/10.3390/md18110571>
- Zeb, A. (2020). Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry*, 44(9), e13394. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13394>
- Zebiri, I., Jacquette, B., Francezon, N., Herbaut, M., Latigui, A., Bricaud, S., Tremblay, R., Pasetto, P., Mouget, J.-L. et Dittmer, J. (2023). The Polysaccharidic Nature of the Skeleton of Marennine as Determined by NMR Spectroscopy. *Marine Drugs*, 21(1), 42. <https://doi.org/10.3390/md21010042>
- Zhang, K., Huang, Y., Wu, Q., Guo, W., Chen, H., Zhang, W., Li, Y., Lu, Y., Wu, Q., Pan, W., Chen, L. et Chen, Y. (2022a). Antibacterial effect and mechanism against *Escherichia coli* of polysaccharides from *Armillariella tabescens* mycelia. *International Journal of Biological Macromolecules*, 207, 750-759. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.086>
- Zhang, S., Zhang, L., Xu, G., Li, F. et Li, X. (2022b). A review on biodiesel production from microalgae: Influencing parameters and recent advanced technologies. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.970028>
- Zhang, X. et Bishop, P. L. (2003). Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. *Chemosphere*, 50(1), 63-69. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00319-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00319-3)
- Zhang, Y., Wu, Y.-T., Zheng, W., Han, X.-X., Jiang, Y.-H., Hu, P.-L., Tang, Z.-X. et Shi, L.-E. (2017). The antibacterial activity and antibacterial mechanism of a polysaccharide from *Cordyceps cicadae*. *Journal of Functional Foods*, 38, 273-279. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.047>
- Zhao, P., Li, X., Wang, Y., Zhang, X., Jia, H., Guo, L., Huang, L. et Gao, W. (2020). Comparative studies on characterization, saccharide mapping and antiglycation activity of polysaccharides from different *Polygonatum ssp.* *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 186, 113243. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113243>
- Ziadi, M., Bouzaiene, T., M'Hir, S., Zaafouri, K., Mokhtar, F., Hamdi, M. et Boisset-Helbert, C. (2018). Evaluation of the Efficiency of Ethanol Precipitation and Ultrafiltration on the Purification and Characteristics of Exopolysaccharides Produced by Three Lactic Acid Bacteria. *BioMed Research International*, 2018, e1896240. <https://doi.org/10.1155/2018/1896240>

