

Thèse pour le doctorat de l'Université des Antilles
École doctorale Dynamique des environnements dans l'espace Caraïbes-
Amériques (ED 636)

Présentée par BEZIAT Naëma

**Caractérisation de symbiotes bactériens
colonisant les branchies de diverses
espèces de crabes de Guadeloupe**

Sous la direction de M. Olivier Gros, Professeur et M. Sébastien Duperron, professeur.

Thèse en Biologie

Soutenance : Le 16 Décembre 2022 à l'Université des Antilles

Composition du jury :

M. COMPERE Philippe

Mme CARO Audrey

M. GROS Olivier

M. DUPERRON Sébastien

Mme MARCELINO Isabel

Mme ZBINDEN Magalie

Rapporteur

Rapporteur

Directeur

Co-directeur

Examinatrice

Examinatrice

Remerciements

Comme le veut la tradition, je tiens tout d'abord à remercier les personnes qui m'ont accompagnée, soutenue, encouragée, ceux qui j'ai rencontré et qui m'ont reboostée sans même le savoir.

Avant tout merci à ma maman, qui me soutient depuis le début, depuis mon premier stage au laboratoire de Biologie Marine de fouillole, qui me pousse, me rassure et qui me dit qu'elle est fière de moi peu importe mes choix. Merci pour les plats préparés, les petit-déjeuners et déjeuners me facilitant beaucoup la vie, merci pour les petits cadeaux posés sur mon lit en deuspi voulant dire « Coucou je pense à toi », merci pour ta patience et ta confiance.

En second lieu je dois un énorme merci à mes directeurs de thèse, à M. Gros qui m'accepté en stage de troisième, en stage de licence, de master et de thèse (Haha). Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir transmis vos connaissances et votre savoir-faire. Merci surtout pour votre patience et votre disponibilité pour les nombreuses réunions au sujet de mes travaux et de mes doutes sur mes capacités à réaliser ma thèse (Haha). Merci pour les goûters de fin de stage et les petits gâteaux d'encouragements pendant les vacances d'été (:D). Aussi pour votre bonne humeur en tout temps et votre bienveillance pour toutes les fois où j'ai été malade ou déprimée ^^, pour toutes les fois où j'ai été en retard et ces fois où je ne suis pas venue. Votre sérieux et votre rigueur m'ont permis d'avancer efficacement et de ne pas trop me disperser dans les moments de doutes.

Merci à M. Duperron de m'avoir accueilli et formé au Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris. Merci aussi à Alison pour sa patience et ses explications. Cette expérience a été très enrichissante et m'a permis d'acquérir des compétences en bio-informatique, merci aussi à vous pour ces heures passées en visio-conférence afin de résoudre mes divers problèmes d'analyses et m'aiguiller dans la rédaction de ma thèse. Vos conseils ont été très précieux dans l'aboutissement de ma thèse. Merci à eux deux pour leurs corrections rapides et efficaces et pour leur implication auxquels cas je n'aurais pas eu d'article actuellement publié. Je vous souhaite à tous futurs doctorants d'avoir un ou des directeurs de thèse aussi pédagogues et dévoués à la réussite de leurs étudiants. C'est partir avec une base indéniable pour réussir.

Je tiens spécialement à remercier Suzanne Conjard, tout au long de la thèse nous nous sommes comprises et épaulées, merci pour toutes ces fois où tu m'as rassuré et m'a permis d'arrêter de culpabiliser (Haha) merci pour ton soutien, et toute ses conversations qu'on a eu

au déjeuner où pendant les moments où on n'arrivait pas à se concentrer. J'aurais vécu cette thèse différemment si on ne partageait pas le même bureau.

Merci à mon nouveau collègue (et ami :P) Paule-Emile pour sa bonne humeur, ses cris inattendus, ses pains au raisins déposés sur mon bureau le matin. Merci pour toutes les fois où tu n'écoutes pas quand je te parle et pour toutes les fois où tu te concentre pour reformuler mes phrases abracadabrantes. Merci pour ta gentillesse et ta bienveillance avant tout.

Je remercie particulièrement Axel, Alex, pour sa patience dans les moments compliqués pour moi, merci pour ton calme quand moi je pars dans tous les sens. Surtout merci pour les soirées passées à corriger mes fautes d'orthographe (J'en fais 100 par phrase, je suis dyslexique ok ?) merci pour les heures passées à lire les articles que je ne comprends pas pour me les expliquer ensuite (Haha). Les heures passées à reformuler mes phrases, à m'attendre. En gros merci pour l'aide et l'investissement, pour les encouragements, le soutien morale et ta confiance infaillible en mes capacités de « DOC-TEUR ».

Merci à mon infirmière préférée (ma sœur), à mes sœurs, à mon papa et nos diverses discussions sur la mangrove.

Merci à Rony la famille, ton appel a changé mon travail, je pense que sans cet appel je n'aurais pas vu le bout du tunnel, merci de m'avoir encouragé jusqu'à la fin. Merci à Cleo « ma go sûre » pour son soutien, sa disponibilité, ses mots encourageants, sa gentillesse en tout temps depuis qu'on se connaît. Merci aux amis qui prennent des nouvelles tous les jours, merci pour les discussions qui font sortir la tête de la thèse, merci à Juju pour ta présence en tout instant. Merci à Djami pour la relecture et le soutien, merci à Laulau, Lilou, Tita, à Jeejis qui envoie toujours des messages pile au bon moment. Merci aux moments précieux passés chez Netty et Dadan au moment où j'avais besoin de souffler.

Merci aux amis qui ont compris mon absence, à ceux qui n'ont pas compris aussi, à ceux qui soutiennent en silence on se sait.

Merci à la famille, qui croit en moi depuis toujours, et qui ne cesse de me répéter que je ne vais pas leur empêcher de manger des crabes (Haha). Merci à mon frère qui est toujours prêt à m'écouter, m'accueillir chez lui, ou m'accompagner partout depuis toujours. Lili, Océ, Léa je ne vous oublie pas, on se soutient on se comprends.

Je pense aussi à Adrien Grimonprez qui m'a accompagnée au labo tout au long de mes stages, merci pour les dilutions (Haha), les cônes, la glace (Haha), les rires. Merci pour ton temps et

tes explications. A Laura Coma que j'ai eu en stage, ce fut un plaisir de travailler avec toi, à Mélanie, Richard, Grégory, Emmanuel pour leur aide et participation à mes travaux.

Merci à Isaure et à Isabel Marcelino pour leur accueil à Pasteur ainsi qu'à Gerardo Cebrian pour son accompagnement.

Je remercie enfin les équipes du laboratoire de Biologie Marine et du C3Mag, merci cette bonne entente, votre sympathie, et votre disponibilité, pour l'entraide également mention spéciale à Christopher Cambrone et Etienne Bezault. Je remercie enfin la Région Guadeloupe et surtout Caribaea Initiative sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Merci particulièrement à M. Cézilly pour sa confiance, sa volonté de nous mettre en avant et de nous permettre de réussir. Son association Caribaea Initiative m'a permis de vivre une expérience enrichissante à Saint-domingue où j'ai pu présenter mes travaux à un congrès scientifique. Cette expérience m'a permis de rencontrer des personnes intéressantes, d'avoir aussi de nouveaux amis précieux tels que Jeffey et Lens, merci à eux pour leur bienveillance et leur gentillesse.

Merci à vous tous, qui m'avez accompagnée à votre façon pendant tout ce temps. Je n'oublierai pas.

Big goûter pour tout le monde !

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION | 13 |
| 1. LA SYMBIOSE | 14 |
| 1.1 DEFINITION..... | 14 |
| 1.2 LA SYMBIOSE, UN MOTEUR DE L'EVOLUTION | 15 |
| 1.3 LA QUESTION DE BENEFICE DANS LA SYMBIOSE | 23 |
| 1.4 UNE DEFINITION OPERATIONNELLE DE LA SYMBIOSE..... | 24 |
| 1.5 MODE DE TRANSMISSION..... | 26 |
| 2 ANATOMIE DES DECAPODA..... | 31 |
| 2.1 MORPHOLOGIE GENERALE DES DECAPODES..... | 31 |
| 2.2 MORPHOLOGIE DES BRACHYOURES..... | 33 |
| 2.3 MODE DE VIE DES CRABES EN MILIEU TROPICAL | 40 |
| 3 LA SYMBIOSE CHEZ LES CRUSTACES | 48 |
| 3.1 LA SYMBIOSE CHEZ LE MODELE RIMICARIS EXOCULATA..... | 49 |
| 3.2 LA SYMBIOSE CHEZ LES AUTRES ESPECES DE CREVETTES DU GENRE RIMICARIS..... | 53 |
| 3.3 LES GALATHEES DU GENRE KIWA, CONNU SOUS LE NOM DE « CRABE YETI » | 54 |
| 3.4 LE HOMARD, HOMARUS GAMMARUS ET SON ASSOCIATION BACTERIENNE SUR LES BRANCHIES..... | 56 |
| 3.5 LE CRABE A MITAINES CHINOIS ET SES ASSOCIATIONS BACTERIENNES | 58 |
| 4. CRABES DE MANGROVE : LES INGENIEURS DE L'ECOSYSTEME DE MANGROVE ASSOCIES A DES BACTERIES SYMBIOTIQUES | 59 |
| 4.1 ROLES DES EPIBIONTES SUR LA CARAPACE DU CRABE DE MANGROVE, LEPTUCA THAYERI | 59 |
| 4.2 SYMBIOSE CHEZ LES CRABES DE MANGROVE, UNE AIDE POUR LA TERRESTRIALISATION ? | 61 |
| CHAPITRE 2 : OBJECTIFS ET METHODOLOGIE..... | 62 |
| OBJECTIF DE LA THESE | 63 |
| UNE APPROCHE PLURI-DISCIPLINAIRE DE L'EXPLORATION DES SYMBIOSES..... | 64 |
| MATERIELS ET METHODES | 66 |
| 1. CARACTERISATION DES COMMUNAUTES BACTERIENNES..... | 66 |
| 1.1 COLLECTE DES ESPECES ARATUS PISONII & MINUCA RAPAX..... | 66 |
| 1.2 COLLECTES DES ESPECES CARDISOMA GUANHUMI, UCIDES CORDATUS, GECARCINUS LATERALIS, OCYPODE QUADRATA, PECNON GIBBESI, DISSODACTYLUS PRIMITIVUS..... | 68 |
| 2. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR L'OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE..... | 70 |

| | |
|--|----|
| 3. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR L'OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION... | 70 |
| 4. EXTRACTION D'ADN ET ANALYSE PCR | 71 |
| 5. ANALYSE METABARCODING PAR SEQUENÇAGE MASSIF DE LA REGION V4-V5 DU GENE CODANT L'ARNR 16S BACTERIEN..... | 73 |
| 5.1 ARATUS PISONII & MINUCA RAPAX..... | 73 |
| 5.2 LES AUTRES ESPECES DE CRABES, LES JUVENILES D'A. PISONII ET M. RAPAX ET LES ECHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX..... | 74 |
| 6. ANALYSES PHYLOGENETIQUES DES ASV DOMINANTS..... | 74 |
| 6.1 ARATUS PISONII & MINUCA RAPAX..... | 74 |
| 7. ANALYSE METABOLOMIQUE | 75 |

CHAPITRE 3 : CARACTERISATION DES ECTOSYMBIOTES BACTERIENS COLONISANT LES BRANCHIES DE DEUX CRABES DE MANGROVE..... 76

| | |
|--|----|
| SYNTHESE DU CHAPITRE 3 : CARACTERISATION DES ECTOSYMBIOTES BACTERIENS COLONISANT LES BRANCHIES DE DEUX CRABES DE MANGROVE..... | 77 |
|--|----|

CHAPITRE 4 : TRANSMISSION ENVIRONNEMENTALE DES SYMBIOTES BACTERIENS DES CRABES DE MANGROVE ARATUS PISONII ET MINUCA RAPAX. 90

| | |
|---|----|
| SYNTHESE DU CHAPITRE 4 : TRANSMISSION ENVIRONNEMENTALE DES SYMBIOTES BACTERIENS DES CRABES DE MANGROVE ARATUS PISONII ET MINUCA RAPAX. | 91 |
|---|----|

| | |
|----------------|----|
| ABSTRACT | 96 |
|----------------|----|

| | |
|----------------------|----|
| 1. INTRODUCTION..... | 97 |
|----------------------|----|

| | |
|-------------------------------|----|
| 2. MATERIALS AND METHODS..... | 99 |
|-------------------------------|----|

| | |
|---|----|
| 2.1 SAMPLING SITE AND CRAB COLLECTION | 99 |
|---|----|

| | |
|-------------------------|-----|
| 2.2 LARVAL CULTURE..... | 100 |
|-------------------------|-----|

| | |
|--|-----|
| 2.3 DNA EXTRACTION AND POLYMERASE CHAIN REACTION ANALYSES..... | 100 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| 2.4 COMPOSITION OF GILL-ASSOCIATED BACTERIAL COMMUNITIES BASED ON 16S rRNA-ENCODING GENE SEQUENCING..... | 101 |
|--|-----|

| | |
|------------------------------------|-----|
| 2.5 ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS | 102 |
|------------------------------------|-----|

| | |
|----------------|-----|
| 3.RESULTS..... | 103 |
|----------------|-----|

| | |
|---------------------------------------|-----|
| 3.1 ANALYSES OF GONADS AND EGGS | 104 |
|---------------------------------------|-----|

| | |
|---|-----|
| 3.2 ANALYSES ON WILD AND LAB-REARED LARVAL STAGES | 105 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| 3.3 BACTERIAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH WILD JUVENILES..... | 105 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| 3.4 COMPARISON WITH COMMUNITIES FROM TREE BARK, BURROW WATER, AND ADULT CRABS..... | 108 |
| 4 DISCUSSION..... | 110 |
| GILL EPIBIONTS ARE ENVIRONMENTALLY ACQUIRED | 110 |
| COMMUNITY SIMILARITIES BETWEEN JUVENILES AND ADULTS AS EVIDENCE FOR HOST-SYMBIONT FIDELITY..... | 111 |
| 5 CONCLUSION | 113 |

CHAPITRE 5 : ANALYSE METABOLOMIQUE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES ASSOCIEES AUX BRANCHIES DES CRABES DE MANGROVE, *A. PISONII* ET *M. RAPAX*..... 119

| | |
|--|-----|
| SYNTHESE DU CHAPITRE 5 : ANALYSE METABOLOMIQUE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES ASSOCIEES AUX BRANCHIES DES ESPECES DE MANGROVE <i>A. PISONII</i> ET <i>M. RAPAX</i> | 120 |
|--|-----|

CHAPITRE 6 : CARACTERISATION DES SYMBIOTES BACTERIENS ASSOCIES DIVERSES ESPECES DE CRABES DE MILIEUX MARIN, INTERTIDAL, ET TERRESTRE..... 132

| | |
|---|-----|
| 1. INTRODUCTION | 133 |
| 2. MATERIEL ET METHODES | 135 |
| 2.1 SITES DE COLLECTE | 135 |
| 2.3 MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE | 139 |
| 2.4 COMPOSITION DES COMMUNAUTES BACTERIENNES ASSOCIEES AUX BRANCHIES D'APRES LE SEQUENÇAGE DU GENE CODANT POUR L'ARNR 16S | 139 |
| 3. RESULTATS | 140 |
| 3.1 ANALYSE ULTRASTRUCTURALE..... | 140 |
| 3.2 DIVERSITE DES BACTERIES ASSOCIEES AUX BRANCHIES | 143 |
| 3.4 COMPARAISON DES ASV LES PLUS ABONDANTES ? | 150 |
| 4. DISCUSSION..... | 152 |
| CHAQUE ESPECE ABRITE UNE COMMUNAUTE BACTERIENNE SYMBIOTIQUE DES BRANCHIES QUI LUI EST PROPRE..... | 152 |
| DES LIENS ENTRE MODE DE VIE, FAMILLES DE CRABES ET SYMBIOSE ? | 152 |
| 5. CONCLUSION | 153 |

DISCUSSION GENERALE 154

| | |
|---|-----|
| 1. UNE ASSOCIATION REPANDUE CHEZ LES CRABES BRACHYOURS..... | 155 |
| 2. UN MODE DE TRANSMISSION ENVIRONNEMENTAL..... | 158 |
| 3. ROLE HYPOTHETIQUE DES SYMBIOTES DE BRANCHIES CHEZ LES CRABES | 161 |

| | |
|--|------------|
| 4. CONCLUSIONS | 164 |
| PERSPECTIVES DE RECHERCHE | 164 |

Table des figures

Introduction

| | |
|--|-----|
| Figure 1. <i>Codakia orbicularis</i> , bivalve symbiotique de la famille des Lucinidae (Worms)..... | 16 |
| Figure 2 <i>Acyrtosiphon pisum</i> | 199 |
| Figure 3. Vue dorsale d'un brachyoure | 311 |
| Figure 4. Vue latérale d'une crevette (Hobbs et Lodge, 2010)..... | 311 |
| Figure 5. Morphologie des maxilles (appendice buccales) et maxillipèdes..... | 32 |
| Figure 6. Morphologie d'un péréiopode (Hobbs et Lodge, 2010) | 32 |
| Figure 7. Appendices céphalothoraciques chez le crabe <i>Cancer pagurus</i> | 36 |
| Figure 8. Noms des branchies en fonction de leur emplacement sur l'appendice | 37 |
| Figure 9 Schéma explicatif sur une coupe de lamelle branchiale postérieur | 38 |
| Figure 10. Morphologie du céphalothorax de <i>Rimicaris exoculata</i> | 49 |
| Figure 11. Planche anatomique de <i>R. exoculata</i> | 49 |
| Figure 12. Schéma montrant les différents compartiments de la chambre branchiale abrité par les branchiostégistes. | 51 |
| Figure 13. Trichobranchie d' <i>Homarus gammarus</i> au stade juvénile et larvaire | 57 |
| Figure 14. Cycle de l'azote..... | 59 |
| Chapitre 2. | |
| Figure 15; Carte de la Guadeloupe montrant les sites de collections..... | 68 |
| Chapitre 3 | |
| Fig.1 Structural analysis of gill filaments from two mangrove crabs (SEM views)..... | 83 |
| Fig.2 Ultrastructural analysis of the gill cells with TEM..... | 83 |
| Fig.3 Percentage relative abundances of major bacterial classes in the two <i>Aratus pisonii</i> and two <i>Minuca rapax</i> specimens..... | 84 |
| Fig.4 Venn Diagram displaying the number of abundant (i.e.>1%) gill bacterial ASVs shared among the two <i>Aratus pisonii</i> and the two <i>Minuca rapax</i> specimens..... | 85 |
| Fig.5 Phylogenetic relationships of the 10 dominant ASVs occurring in <i>Aratus pisoni</i> and <i>Minuca rapax</i> | 86 |
| Chapitre 4 | |
| Figure 16. Island of Guadeloupe, Lesser Antilles..... | 99 |
| Figure 17. SEM images of eggs, gills after molt (adult) of <i>A. pisonii</i> | 104 |
| Figure 18. Larvae of <i>M. rapax</i> and <i>A. pisonii</i> species. | 105 |

| | |
|---|--------------------------------------|
| Figure 19. Venn Diagram between <i>A. pisonii</i> juvenile gill, <i>M. rapax</i> juvenile gill, burrow waters and Rhizophora mangle branches sample. | 107 |
| Figure 20. Barplot of showing the proportions of bacterial Phylum of the samples | 108 |
| Chapitre5 | |
| Fig.1 Sites of collection of the four studied crab species..... | 125 |
| Fig.2 Workflow diagram of the lyophilized crab gills analyzed by GCxGC-TOFMS..... | 125 |
| Fig.3 Ultrastructure of the gills..... | 126 |
| Fig.4 GCXGC-TOFMS contour plot of a derivatized crab gill sample..... | 127 |
| Fig.5 Scatter plots of secondary metabolites..... | 129 |
| Chapitre6 | |
| Figure 21. Carte de la Guadeloupe présentant les différents sites de récolte. | 135 |
| Figure 22. Surface de lamelles branchiales de diverses espèces de crabes..... | 142 |
| Figure 23. Schéma représentant les différents biotopes des crabes collectés..... | 144 |
| Figure 24. Barplot montrant les groupes bactériens dominants chez <i>Ucides cordatus</i> , <i>Eurytium limosum</i> et <i>Ocypode quadrata</i> | 146 |
| Figure 25. Barplot montrant les groupes bactériens dominants dans la communauté bactérienne des crabes <i>Cardisoma guanhumi</i> et <i>Dissodactylus primitivus</i> | 147 |
| Figure 26. A. Diagramme de venn | 151 |
| Figure 27. Schéma expliquant les réactions induites par l'activité des crabes violonistes dans le sédiment | Erreur ! Signet non défini. 6 |
| Figure 28. Schéma de colonisation par les bactéries du milieu au cours du cycle de vie des espèces <i>A. pisonii</i> et <i>M. rapax</i> | 161 |

Table des tableaux

Introduction

| | |
|---|----|
| Tableau 1. Récapitulatif de l'écologie de quelque espèces marines, terrestres et semi terrestres..... | 46 |
|---|----|

Chapitre 2

| | |
|--|----|
| Tableau 2. Récapitulatif des techniques utilisées sur chaque espèce..... | 69 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Tableau 3. Séquence des jeux d'amorces utilisées..... | 73 |
|---|----|

Chapitre 4

| | |
|---|-----|
| Tableau 4. Summary of the different analyses performed on the study samples | 103 |
|---|-----|

Chapitre 5

| | |
|--|-----|
| Table 1. Species studied and their location..... | 124 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| Table 2. Comparison among sample locations..... | 127 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| Table 3. Comparison among sample species..... | 127 |
|---|-----|

| | |
|--|-----|
| Table 4. Selected tentative secondary metabolites of crab gills..... | 128 |
|--|-----|

Chapitre 6

| | |
|--|-----|
| Tableau 5. Informations générales sur les espèces collectés. CW : Carapace width, largeur de carapace..... | 136 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| Tableau 6. Liste des différentes espèces étudiées au microscope électronique à balayage (MEB)..... | 140 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| Tableau 7. Résumé du nombre de reads après filtrage qualité et d'ASV obtenues pour chaque individu après analyse avec Qiime2..... | 144 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| Tableau 8; Noms et fréquences (en proportion des reads obtenues) des ASV dominantes chez chaque espèce de crabe, et similarité avec la séquence la plus proche dans la base de données GenBank..... | 148 |
|---|-----|

Liste des abbréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARNr : Acide ribonucléique ribosomal

ASV : Amplicon Sequence Variant

Bp : Base pair

CFB : Cythophaga, Flavobacterium-Bacteroides

CL : Carapace length , longueur de carapace

CO₂ : Dioxyde de carbone

CRD : Carbohydrate recognition domain

CRS : Comb-row setae

C-TUPA : Total useful peak area by class

CW : Carapace width

EDX : Energy-dispersive X-ray

EELS : Electron Energy Loss Spectroscopy

ESR : East Scotia Ridge

GC : Gas chromatography

MEB/SEM : Microscope électronique à balayage/ Scanning electron microscope

MET/TEM : Microscope électronique à transmission

mOsm : Milli-osmole

PASS : Pea Aphid Secondary Symbiont

PCR : Polymerase chain reaction

PSB : Phosphate Buffered Saline

ROS : Roseobacter

TPA : Total peak area

TOFMS : Time-of-flight mass spectrometry

Introduction

1. La symbiose

1.1 Définition

Depuis 150 ans les interactions entre organismes suscitent l'intérêt des scientifiques. Les premiers travaux sur les lichens (De Bary, 1879 ; Frank, 1877 selon Perru 2006) ont permis d'entamer la réflexion sur de nouvelles définitions concernant les interactions inter espèces. Les lichens qui étaient autrefois considérés comme des plantes sont en fait une association entre deux organismes complètement différents : un champignon et un organisme phototrophe. Entre les années 1870 et 1880, les interactions connues et étudiées concernaient surtout le parasitisme (Perru, 2006). C'est d'ailleurs à cette même époque que le terme « symbiose » a été introduit par Anton de Bary, défini comme le fait de « vivre ensemble » pour des individus d'espèces différentes (De Bary, 1879 selon Perru, 2006) inspiré par Albert- Bernhardt Frank. Cette nouvelle définition prend alors en compte tous types d'interactions.

De nos jours, il n'existe toujours pas de définition exacte de la symbiose commune à tous les chercheurs. Plusieurs auteurs donneront une définition de la symbiose autre que la définition originale de De Bary (Martin & Schwab, 2012). Il faudra alors préciser s'il s'agit de symbiose au sens large ou au sens strict. Smith et Douglas (1987) définissent la symbiose comme « des individus de différentes espèces formant des associations persistantes dont ils bénéficient tous ». En effet, dans le cas de la symbiose au sens strict, chacun des deux organismes bénéficie de l'interaction et ne peuvent pas vivre hors de cette interaction. Au sens large, la symbiose regroupe les interactions comme le parasitisme, le commensalisme et le mutualisme. Le parasitisme se traduit par une association étroite et durable entre deux organismes, l'un des deux, le parasite, dépend métaboliquement de l'hôte et lui est potentiellement nuisible (Krebs, 2009). Dans certains cas, le parasite peut être très peu dommageable à l'hôte et tend à ressembler donc au commensalisme. Le parasitisme a un impact dans l'évolution car il influence grandement la reproduction sexuée chez les hôtes infectés, de même que le cycle de vie et même l'aspect du parasite. L'attaque par les parasites peut induire une augmentation de l'effort de reproduction ou au contraire une réduction de cet effort (Forbes, 1993, revue)

Le commensalisme se traduit par une relation dans laquelle seul l'un des deux acteurs de la relation bénéficie de l'association sans porter préjudice à l'autre (Perru & Poreau, 2016). Selon la vision française, « mutualisme » correspond à une relation dans laquelle les deux acteurs s'apportent un bénéfice mutuel, cependant l'interaction n'est pas obligatoire (Laloy, 1906 ; Perru & Poreau, 2016). D'un point de vue anglo-saxon, le mutualisme souvent appelé « obligate mutualism » correspond à la symbiose au sens stricte du terme. Ceci a été décrit par exemple entre la guêpe *Ceratosolen solmsi* et la figue *Ficus hispida*, c'est une relation très intime où la guêpe sert de pollinisatrice au figuier, et le figuier représente un milieu de vie et de reproduction pour la guêpe (Xiao *et al.*, 2013), la guêpe ne peut se reproduire que dans une espèce de figuier spécifique (Xiao *et al.*, 2013). Ceci est également observé entre les bactéries du genre *Wolbachia* et la guêpe *Asobara tabida*, où la présence du symbiote est obligatoire pour la production des ovocytes chez la guêpe (Dedeine *et al.*, 2001).

La caractérisation d'une association se base donc sur l'évaluation des possibles coûts et bénéfices que tirent les deux organismes en interaction (Baeza, 2007), cependant les coûts et bénéfices peuvent être difficiles à identifier.

1.2 La symbiose, un moteur de l'évolution

La symbiose est considérée comme un des moteurs forts de l'évolution, en principe les associations symbiotiques permettent de réaliser de nouvelles fonctions métaboliques, par exemple la colonisation de certaines niches écologiques initialement toxiques comme il est supposé pour la Lucine vivant dans les herbiers *Thalassia testudinum*. Les lucines (bivalves) sont associées à des gammaprotéobactéries sulfo-oxydantes assurant leur nutrition. L'utilisation de H₂S présent dans le milieu par les bactéries pourrait être considéré comme un mécanisme de détoxification (Brissac, 2009 thèse), et sert aussi à la nutrition de l'hôte (Taylor & Glover, 2000).

La symbiose permet aussi l'utilisation des sources de composés inorganiques (sulfure, méthane) pour le développement de l'hôte, comme observé pour le vers tubicole *Riftia pachyptila*, la crevette *Rimicaris exoculata*, la palourde *Codakia orbicularis* (Fig.1), ou encore les moules des genres *Bathymodiolus* ou *Idas* (Dubilier *et al.*, 2008; Lechaire *et al.*, 2008). Des expériences ont montré que la taille du corps peut être plus importante, ou le développement peut être plus rapide chez un hôte hébergeant des symbiotes que chez un hôte dépourvu de symbiotes (Shin *et al.*, 2011). Dans certains cas la présence du symbiote est nécessaire pour la croissance et la survie de l'hôte. Par ailleurs, les symbiotes peuvent avoir un impact direct sur le succès de la reproduction de l'hôte. Les mouches tse-tse vectrices du parasite trypanosome sont aussi associées à deux organismes, le « mutualiste » *Wigglesworthia glossinidia* et le commensal *Sodalis glossinidius*. *Wigglesworthia glossinidia* est un symbiote obligatoire intracellulaire, lorsqu'il est éliminé par un traitement antibiotique chez les femelles, le taux de fécondité est réduit, il fournit aussi des vitamines essentielles à la mouche (Pais *et al.*, 2008).

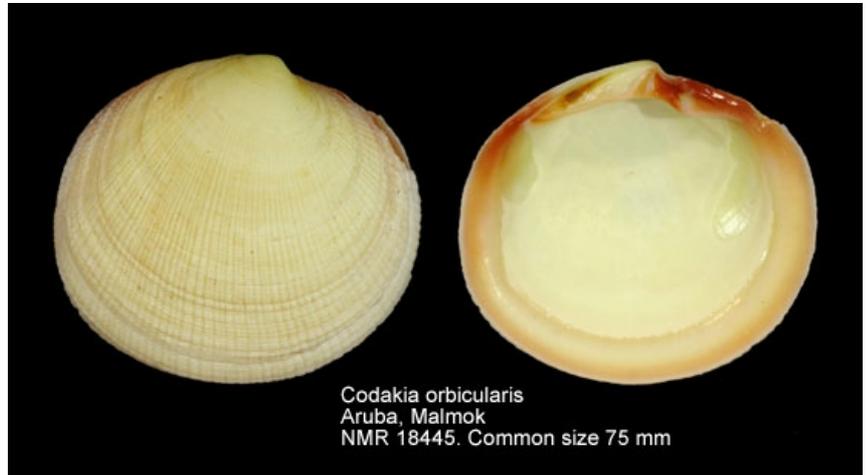


Figure 1. *Codakia orbicularis*, bivalve symbiotique de la famille des Lucinidae (Worms).

Dans les relations mutualistes, l'hôte et son symbiote forment souvent un lien étroit et durable, certains auteurs rapportent des événements de co-évolution, co-adaptation, ou encore co-spéciation.

La coévolution : La coévolution résulte d'une pression de sélection chez l'hôte et le symbiote amenant des changements. Leurs génomes deviennent complémentaires, et le succès de la symbiose est dépendant de cette complémentarité (Hoang *et al.*, 2022).

La co-spéciation : Corresponds à deux espèces qui se spécifient au même moment (Groussin *et al.*, 2020).

La co-adaptation : C'est un processus d'ajustement mutuel des traits chez l'hôte et le symbiote en raison de la pression de sélection exercée par l'hôte sur le symbiote et inversement (Wade, 2007).

La coévolution a été décrite pour de nombreux organismes. Les symbioses nutritives insectes/bactéries illustrent bien les notions de coévolution. Wilson & Duncan (2015) décrivent une coévolution claire entre des insectes et leurs symbiotes. Parfois des symbiotes vivant en associations subiront une

modification de leur génome, on parle de génome « fragmenté » en comparaison avec des organismes de la même espèce vivant en liberté. Les gènes éliminés correspondent à des gènes redondants ou inutiles pour le fonctionnement de la symbiose mais aussi quelquefois à des gènes essentiels (Moran & Bennett, 2014). La perte de gènes essentiels ou leur fragmentation, pourrait être un moyen de contrôle pour l'hôte (Wilson *et al.*, 2010). Le métabolisme des hôtes compense cette perte de gènes, rendant ainsi l'association obligatoire (Price *et al.*, 2014).

Les auteurs (Wilson & Duncan, 2015) indiquent que cette coévolution se définit par « trois signature », qu'ils ont nommés : collaboration, acquisition et contrainte.

Acyrtosiphon pisum est un puceron qui se nourrit de la sève du phloème, il est associé aux bactéries du genre *Buchnera* qui lui fournit des acides aminés essentiels pour son développement. Ce sont des symbiotes intracellulaires (présent dans des bactériocytes du tube digestif) transmis verticalement. C'est une association très ancienne datant de 150 Ma et obligatoire pour les deux acteurs de l'association. Cette symbiose est très étudiée et a servi de modèle pour expliquer les schémas de coévolution, en effet le génome fragmenté et réduit des bactéries est le résultat de cette coévolution. Cette symbiose a aussi servi de modèle pour décrire les symbioses fonctionnelles facultatives (Brinza *et al.*, 2009).

Parfois une collaboration entre hôte et symbiotes pour la réalisation de certaines voies métaboliques est nécessaire pour le développement de l'hôte. Les endosymbiotes *Buchnera* du puceron *Acyrtosiphon pisum* travaillent de concert avec leur hôte pour la synthèse du pantothénate (vitamine B5) (Price & Wilson, 2014). Cette vitamine est essentielle à la survie des pucerons *A. pisum* (Blow *et al.*, 2020). Les symbiotes du puceron *A. pisum* (Fig.2) ont perdu la capacité de produire la β -alanine nécessaire à

la production de pantothénate contrairement aux bactéries libres les plus proches d'un point de vue phylogénétique. Malgré cette perte, la production de pantothénate est toujours fonctionnelle grâce à la coopération de l'hôte (Price *et al.*, 2014). Wilson & Duncan (2015) expliquent que même s'il est commun que les mêmes pertes de gènes soient observées chez des insectes d'espèces différentes, cela est sûrement dû à une sélection aléatoire.

En ce qui concerne l'acquisition de gènes, ces derniers peuvent être acquis par duplication, transfert latéral ou encore par échange partiel ou total de symbiotes. Ces remaniements génomiques semblent être très observés et étudiés chez les insectes associés à des bactéries symbiotiques pour la nutrition. L'apparition de nouveaux gènes peut provenir d'une duplication d'un gène parental ; cette nouvelle copie peut subir des mutations donnant lieu à de nouvelles fonctions (Näsvalld *et al.*, 2012). Les insectes du sous-ordre ; Sternorrhyncha dépendent de leur endosymbiose obligatoire pour leur nutrition. Les endosymbiotes leur fournissent les acides aminés nécessaires à leur développement (Baumann, 2005). Au cours des temps évolutifs la maintenance de ces gènes dans le génome est favorisée par la sélection naturelle en raison de leur rôle dans la symbiose (Price *et al.*, 2011).

Des expansions de gènes (augmentation de la taille de la famille d'un gène) ont été observées chez les hôtes du sous ordre Sternorrhyncha ; cela est dû à de nombreuses sélections ayant favorisé le maintien de gènes paralogues (gènes issus de plusieurs copies provenant d'une duplication initiale et ayant évolué indépendamment) [Dahan *et al.*, 2015]. Dahan *et al.*, (2015) démontrent que les taux de duplication des transporteurs d'acides aminés sont 10 fois plus élevés chez les insectes en symbiose que chez leurs parents proches dépourvus de symbiotes. Chez l'insecte *A. pisum* les gènes des transporteurs sont dupliqués de nombreuses fois et donnent lieu à de nouveaux gènes par mutation impliquée dans le transport des



Figure 2 *Acyrtosiphon pisum*

acides aminés. Le génome de *A. pisum* possède un nombre élevé de transporteurs d'acides aminés (40) comparativement aux insectes présentant les mêmes types de transporteurs (Price *et al.*, 2011).

L'auteur affirme que ces expansions sont dues à la présence des endosymbiotes bactériens participant à la nutrition de l'hôte (Dahan *et al.*, 2015). Ceci est un exemple d'acquisition de gènes par duplication chez l'hôte en raison de l'association avec ses bactéries symbiotiques. Le transfert de gènes est aussi un moyen d'acquérir de nouveaux gènes. Nikoh *et al.*, (2010) ont mis en lumière le transfert de gènes entre un hôte ancestral et des bactéries. Cette étude a aussi été menée sur l'insecte *Acyrtosiphon pisum* en association avec les bactéries du genre *Buchnera*. Dans cette étude, les principaux gènes retrouvés chez l'hôte ne sont pas ceux du symbiote *Buchnera* mis à part deux pseudogènes et ils ne participent pas à la fonction métabolique des bactéries du genre *Buchnera*. La fonction de ces gènes n'est pas clairement identifiée mais ils faciliteraient l'association entre l'hôte et le symbiote (Nikoh *et al.*, 2010). Parmi les gènes retrouvés, certains sont issus de bactéries de l'ordre Rickettsiales (ex : *Wolbachia*). L'auteur suppose que ce transfert a pu avoir lieu ultérieurement lors d'une infection des Rickettsiales chez un ancêtre d'*A. pisum* (Nikoh *et al.*, 2010). Les mêmes faits sont observés dans la triple association entre la cochenille *Planococcus citri* et son symbiote bactérien *Tremblaya princeps* qui possède lui-même un endosymbiote bactérien, *Moranella endobia*. Des gènes provenant de diverses bactéries (facultatifs) seraient retrouvés dans le

génomique de la cochenille *P. citri* et seraient de surcroît utilisés pour la réalisation de certaines voies métaboliques par les trois acteurs de la relation (Husnik *et al.*, 2013). Certains gènes sont impliqués dans la synthèse d'acides aminés, de nutriments, ou dans la maintenance de la paroi des bactéries. Ces gènes acquis par transfert, semblent assurer les fonctions de gènes perdus chez les symbiotes actuelles (*T. princeps* ou *M. endobia*) ou compléter les voies de biosynthèse des gènes partiellement présents chez *M. endobia* (Husnik *et al.*, 2013).

Enfin, le remplacement partiel ou complet de la communauté symbiotique est une autre voie pour acquérir du matériel génétique nouveau. L'étude de Husnik & McCutcheon (2016) suggère que dans la symbiose tripartite de la cochenille *Planococcus citri*, la Gammaproteobacteria vivant dans le cytoplasme de la Betaproteobacteria *Tremblaya princeps* aurait été remplacée au cours des temps évolutifs.

Dans certains cas l'hôte va héberger un ou plusieurs autres symbiotes, qui lui sont facultatifs. Si le symbiote facultatif remplit les mêmes fonctions métaboliques que le symbiote obligatoire, celui-ci peut le remplacer entièrement (Wilson & Duncan, 2015). Ceci a été prouvé chez des pucerons associés à *Buchnera* (Koga *et al.*, 2003). Lors d'une double infection du puceron par son symbiote originel et un symbiote facultatif nommé PASS (Pea Aphid Secondary Symbiont), le symbiote facultatif a été capable d'éliminer et de remplacer le symbiote originel. Dans un premier temps cela aura un impact négatif sur la fitness de l'hôte, ce dernier n'ayant aucun contrôle sur le symbiote facultatif. Cependant au bout de quelques générations, PASS sera capable d'assurer les mêmes fonctions métaboliques que *Buchnera* toutefois de manière moins efficace (Koga *et al.*, 2003). N'ayant pas co-évolué avec l'hôte, les auteurs décrivent cette association comme étant instable et moins efficace (Koga *et al.*, 2003).

Selon Wilson et Duncan (2015), la contrainte est le dernier mécanisme participant à la coévolution. Selon eux les schémas de collaboration hôte/symbiotes sont établis indépendamment chez différentes lignées d'insectes en raison du répertoire de gènes de l'hôte. En effet, lorsque le symbiote possède un gène ayant la même fonction métabolique qu'un gène présent chez l'hôte, la pression de sélection sur le symbiote diminue concernant le maintien du dit gène (Wilson & Duncan, 2015). Ainsi le symbiote peut perdre le gène redondant sans dommage pour sa fitness (valeur adaptative), et la collaboration avec l'hôte s'établit. L'acquisition d'un gène par transfert, fonctionnellement similaire à celui présent chez le symbiote pourra entraîner la perte de ce gène chez le symbiote (Wilson & Duncan, 2015)

Ceci limite considérablement l'évolution des symbiotes, qui présentent en conséquence des génomes fragmentés comme évoqué précédemment. Ladite collaboration évoquée est alors forcée/obligatoire puisque le symbiote devient dépendant de son hôte pour la fonction qu'il a perdu (Wilson & Duncan, 2015).

Mis à part les processus de coévolution mis en lumière à travers l'étude des symbioses insectes/bactéries par (Wilson & Duncan, 2015), d'autres auteurs abordent la co-spéciation. Peek *et al.* (1998) ont rapporté des résultats prouvant qu'un hôte et son symbiote transmis strictement verticalement subissent des « événements cladogènes » de façon parallèle au même moment. La co-spéciation serait ainsi à l'origine de la congruence observée entre la phylogénie de l'hôte et celle du symbiote et aurait lieu de façon synchrone (Peek *et al.*, 1998; Groussin *et al.*, 2020).

Certains facteurs vont donc accentuer la dépendance vis-à-vis de l'hôte ou du symbiote ce qui va augmenter les chances de co-adaptation ou co-spéciation :

- Le mode de transmission, de parents aux descendants ou bien par acquisition depuis l'environnement
- La fonction que remplit le symbiote, plus ou moins importante pour la fitness (la valeur adaptative) de l'hôte
- La position du symbiote par rapport à l'hôte, à sa surface ou à l'intérieur même ses cellules

L'hôte montrera une réduction de sa fitness et une grande dépendance à son symbiote

Transmission verticale : Correspond à la transmission des symbiotes à la génération suivante par les gamètes (ovule, spermatozoïde). Il n'existe pas de phase aposymbiotique.

Transmission horizontale : Correspond à l'acquisition des symbiotes par les larves ou juvéniles via un individu de la même espèce ou d'une espèce différente.

Les symbiotes peuvent aussi être acquis par l'environnement, on parle alors de transmission environnementale. Les larves passent obligatoirement par une phase aposymbiotique.

lorsque celui-ci assure sa nutrition et est transmis verticalement (Fisher *et al.*, 2017).

De cette dépendance va découler la réduction du génome du symbiote et peut aussi mener à de l'intégration du symbiote par l'hôte. Le meilleur exemple est celui d'anciennes cellules bactériennes ayant été intégrées dans les cellules de l'hôte et qui ont fini par « évoluer » en mitochondries chez les eucaryotes (Kiers & West, 2015). Ces

événements sont plus souvent décrits dans les symbioses à transmission verticale qu'horizontale. En effet, même si les symbioses à transmission horizontale peuvent aussi montrer des signes de coévolution, par exemple la présence de cellules spécialisés pour les héberger (bacteriocytes) chez l'hôte, comme pour le bivalve tropical côtier *Codakia orbicularis*, le mode de transmission horizontal est un frein à l'intégration d'un symbiote par l'hôte. Ceci est dû au fait que l'hôte gère plusieurs génotypes (souches) de symbiotes proches, mais aussi que cela crée de la compétition entre symbiotes (Kiers & West 2015). Néanmoins Groussin *et al.* (2020) suggèrent que dans le cas d'une transmission environnementale, la co-spéciation peut avoir lieu si l'hôte a une grande spécificité de sélection des symbiotes ou a une grande dépendance vis-à-vis des fonctions métaboliques remplies par le symbiote.

Les auteurs s'accordent tout de même sur le fait que la co-évolution ne mène pas obligatoirement à la co-spéciation (Goussin *et al.*, 2020 ; Kiers & West, 2015).

L'étude de Shu *et al.* (2018) fait état d'un exemple de co-adaptation chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* et ses bactéries associées, dans cette étude *Burkholderia agricolaris* et *Burkholderia hayleyella*. Après traitement antibiotique des hôtes, ils sont réinfectés par *B. agricolaris* et *B. hayleyella*. Les résultats montrent que la fitness diminue pour tous les hôtes néanmoins, lorsque l'hôte initialement associé à *B. hayleyella* est réinfecté avec cette espèce,

il présente une meilleure résistance à l'infection et produit plus de spores viables. Selon les auteurs ces résultats montrent qu'une meilleure fitness dans cette expérience est signe d'une co-adaptation entre l'hôte et le symbiote *B. hayleyella*.

1.3 La question de bénéfice dans la symbiose

Même s'il est vrai que certaines interactions présentent un échange mutuel, il se pourrait souvent que la relation ne soit réellement avantageuse que pour l'hôte.

C'est pour cela que l'application de certaines définitions sont encore contestable à ce jour. Zook (2015) suggère que les définitions des symbioses initialement utilisés ne s'appliquent pas aux interactions tel qu'on les décrits aujourd'hui. En effet, concernant les symbioses dites mutualistes, donc à bénéfices réciproques, la plupart du temps les bénéfices tirés par l'hôte seront clairement identifiés. Cependant les bénéfices tirés par le symbiote sont souvent moins évidents. Pour le symbiote, les bénéfices mis en avant seront la protection que confère l'hôte ou encore l'échange de nutriments, ou l'accès amélioré aux substrats du symbiote. Dans le cas des coraux, le polype (l'hôte) confère aux symbiotes un abri ainsi que des composés inorganiques nécessaire à la photosynthèse (ex : azote) (Muscatine *et al.*, 1984; Bayer *et al.*, 2012).

L'argument avancé est que le symbiote évite la prédation et la compétition en vivant à l'intérieur de l'hôte (Garcia & Gerardo, 2014). Cependant l'hôte utilise la majeure partie du carbone photosynthétique produit par les zooxanthelles (70%) tout en inhibant le développement de l'algue (Tremblay *et al.*, 2013). La production de carbone serait d'ailleurs similaire à la production mesurée chez les formes libres de ces algues (Smilie, 1976 dans Muscatine & Porter, 1977). Ce mode de transfert correspond au milking (ou le fait de « traire » ses symbiotes) où le carbone organique est directement transféré à l'hôte (Sogin *et al.*, 2020). Dans d'autres cas on parle de « farming », où l'hôte cultive ses symbiotes en leur apportant de l'oxygène, du dioxygène ainsi que des sulfures dans le cas du vers tubicole *Riftia pachyptilla*, dans le but de les consommer par la suite par digestion cellulaire (Sogin *et al.*, 2020).

Dans certaines symbioses en cas de stress, les symbiotes peuvent aussi être consommés par l'hôte. L'expérience de stabulation menée avec le bivalve *Codakia orbicularis* montre qu'il digère ses symbiotes bactériens lorsqu'il n'y a aucune autre source de nourriture dans son environnement (Caro *et al.*, 2009). Ainsi l'argument selon lequel l'hôte confère un abri aux symbiotes peut-être fortement remis en question. Par ailleurs après la mort de l'hôte certains

symbiotes retournent à une vie libre dans le milieu naturel à l'image de ceux de *Riftia* (Klose *et al.*, 2015). L'établissement de la symbiose n'est avantageux que pour le bien-être de l'hôte. De surcroît, le symbiote à l'intérieur de son hôte peut faire face à de la compétition avec d'autres symbiotes d'espèces différentes ou de souches différentes récupérés par l'hôte (Garcia & Gerardo, 2014). Cette compétition peut mener à l'élimination des autres espèces/souches par une autre souche (Elliott *et al.*, 2009), ou impacter l'abondance d'un des symbiotes chez l'hôte (Oliver *et al.*, 2006). Le système immunitaire de l'hôte représente également une entrave au développement optimal des symbiotes.

Plusieurs études montrent qu'au cours des temps évolutifs, le génome du symbiote se voit souvent être considérablement réduit. Dans le cas où le symbiote est transmis de façon strictement verticale, il n'y a plus d'échange de gènes avec les bactéries libres de l'environnement. La taille de la population est considérablement réduite en raison du goulot d'étranglement subi par les symbiotes à chaque événement de reproduction. Cela conduit à des mutations et des nombreuses pertes de gènes, le symbiote n'est plus capable de se développer hors de la symbiose (Sloan & Moran, 2012; Nakabachi *et al.*, 2013; Wilson & Duncan, 2015).

Ces contres arguments visent à montrer que le bénéfice échangé n'est pas toujours équivalent ni symétrique entre les deux acteurs de la relation. Cela est peut-être dû au fait qu'il est plus difficile d'identifier l'impact (bénéfique) de l'hôte sur le symbiote ou tout simplement que la plupart du temps il n'y a pas de vrai bénéfice pour le symbiote. Cela peut être vu comme une forme d'esclavage sur le symbiote par l'hôte ou encore de parasitisme inversé.

1.4 Une définition opérationnelle de la symbiose

La symbiose est donc une interaction qui est difficile à définir et à décrire. Malgré les désaccords et les remises en question autour de la notion de symbiose, de nombreux auteurs ont essayé d'établir des critères objectifs et réalistes à mettre en œuvre pour décrire et identifier une symbiose.

Certains sont essentiels pour caractériser une association symbiotique selon Smith et Douglas (1987) : L'un des critères pris en compte concerne la taille des organismes, en effet l'association est toujours composée d'un « hôte », l'organisme le plus grand et du « symbiote » l'organisme le plus petit. La position du symbiote par rapport à l'hôte permet aussi de catégoriser la relation. Un symbiote peut être interne, il est alors qualifié

d'endosymbiote. Il peut être un endosymbiote intracellulaire (présent à l'intérieur des cellules de l'hôte). C'est le cas du symbiote du bivalve de la famille des Lucinidae, *Codakia orbicularis*. *Codakia* est retrouvée en milieu côtier et en eau peu profonde. Elle héberge à l'intérieur de bactériocytes (cellules spécialisées localisée dans l'épithélium de la branchie) des bactéries sulfo-oxydantes (Frenkiel & Mouëza, 1995). Il existe aussi des endosymbioses extracellulaires, dans ce cas le symbiote est à l'intérieur de l'hôte mais pas dans les cellules. Le bryozoaire *Bugula neritina* possède ainsi des symbiotes extracellulaires *Candidatus 'Endobugula sertula'*, dans les cordons funiculaires des adultes et dans le sinus palléal des larves (Sharp *et al.*, 2008). Concernant les ectosymbioses, le symbiote est présent à l'extérieur de l'hôte. C'est le cas chez le cilié marin *Zoothamnium niveum*. Cet organisme vit en colonie et est entièrement recouvert par des bactéries sulfo-oxydantes (Rinke *et al.*, 2006). Les Thyasiridae sont une autre famille de bivalves associées à des symbiotes chimio-autotrophes. En fonction du type de branchies, des bactéries sont présentes entre les microvillosités des cellules épithéliales des branchies dans ce cas, on parle mésosymbiose (Dufour, 2005).

Il est aussi important d'identifier la « nécessité de l'association » et son caractère durable. Le caractère facultatif ou obligatoire d'une association est un critère important à prendre en compte. Les symbioses obligatoires impliquent que l'hôte (généralement) ne puisse pas survivre sans le symbiote c'est le cas de *Zoothamnium niveum* cité plus haut (Rinke *et al.*, 2006) ou encore de la méduse du genre *Cassiopea* retrouvé en milieu côtier dans les mangroves et associé à des algues unicellulaires du genre *Symbiodinium*. Les méduses sont entièrement dépendantes des symbiotes pour leur nutrition et leur reproduction (Lampert, 2016). Dans d'autres cas l'association peut être facultative c'est le cas de *A. pisum* qui est associé à des symbiotes secondaires facultatifs en plus de son symbiote primaire obligatoire (McLean & Godfray, 2015). Hoyoux *et al.*, 2009 ont proposé 4 autres critères pour définir une symbiose : La présence des symbiotes chez tous les spécimens observés, leur présence systématique dans la même zone (ex : tube digestif), la qualité du tissu accueillant les symbiotes (non lésé) et dans le cas des symbioses nutritionnelles la nécessité de l'hôte à avoir des symbiotes vis-à-vis de son régime alimentaire (symbiotes digestifs) [Hoyoux *et al.*, 2009].

L'un des critères les plus importants à identifier concernant une symbiose outre ceux cités précédemment est l'identification du mode de transmission. Dans le paragraphe suivant nous évoqueront des exemples illustrant les différents modes de transmissions identifiés à ce jour.

1.5 Mode de transmission

Le mode de transmission correspond à la façon dont les symbiotes d'un hôte seront transmis de génération en génération. Comme évoqué précédemment, le mode de transmission peut avoir un rôle important concernant l'évolution de la relation hôte-symbiote. Il existe deux modes de transmission, la transmission verticale où les symbiotes sont transmis par la mère ou par les deux parents (Cary, 1994) à la descendance via les gamètes, et la transmission horizontale, comprenant un transfert de symbiotes inter- ou intra-espèces, dans lequel il existe un stade du cycle de l'hôte qui est dépourvu de symbiotes. Il peut exister également un stade du symbiote qui est retrouvé de façon libre dans l'environnement, on parle alors de transmission environnementale (Bright & Bulgheresi, 2010).

1.5.1 La transmission horizontale en milieu marin

La transmission horizontale est caractérisée par une phase aposymbiotique. Les gamètes ainsi que les larves pendant la phase pélagique seront dépourvus de symbiotes. Ceci a été démontré chez divers organismes. Les moules *Bathymodiolus* retrouvées au niveau des sources hydrothermales de la dorsale Medio-Atlantique sont associées à des endosymbiotes obligatoires, Won et al., (2003) supposent que les larves de la moule *Bathymodiolus* sont colonisées par les bactéries après le recrutement, et sont dépourvus de symbiotes durant la phase pélagique. Les bactéries s'installent premièrement dans tous les tissus épithéliaux, et lorsque la coquille atteint une certaine taille, ils se maintiennent dans les épithéliums branchiaux non ciliés nouvellement formés (Laming et al., 2018).

Ce même schéma est observé pour les vers tubicoles *Riftia pachyptila*, *Tevnia jerichonana*, *Oasisia alvinae*, des sources hydrothermales. Ces vers sont aussi associés à des bactéries endosymbiotiques, les larves sont aposymbiotiques jusqu'à leur installation sur un substrat. Cette installation marque début de l'infection ainsi qu'un ensemble de modifications physiques (métamorphose) pour l'accueil des symbiotes (Nussbaumer et al., 2006). Les larves fraîchement infectées mesuraient 250 µm tandis que les juvéniles mesurent environ 400 µm (Nussbaumer et al., 2006). En milieu côtier, la palourde *Codakia orbicularis* abrite une endosymbiose bactérienne, mais les larves de cette espèce sont aposymbiotiques. L'infection se fait après la métamorphose des larves en juvénile au contact des bactéries compétentes

présentes dans le sédiment (Gros *et al.*, 1998a). Les juvéniles colonisés mesuraient entre 250 μm à 2 mm (Gros *et al.*, 1998a).

Les crustacés ayant une transmission environnementale des symbiotes semblent suivre le même schéma. Les larves juste après éclosion de la crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata* sont aposymbiotiques, l'infection est réalisée au stade juvénile comme chez la lucine *C. orbicularis*. Les bactéries ectosymbiotiques retrouvées chez les adultes colonisent également la face interne des branchiostégites chez les juvéniles (Guri *et al.*, 2012).

Souvent en milieu marin, les derniers stades larvaires ou juvéniles récupèrent les bactéries compétentes à partir d'un stock de bactéries libres présentes dans l'environnement (Gros *et al.*, 2003; Petersen *et al.*, 2010), on parlera alors de transmission environnementale. La seiche *Euprymna scolopes* réalise une transmission environnementale un peu particulière. Les juvéniles sont infectés à partir du stock de bactéries compétentes *Vibrio fischeri* retrouvées dans la colonne d'eau quelques heures après l'éclosion (McFall-Ngai, 1994). La seiche possède un organe lumineux composé de champs ciliés conduisant à trois pores, ensuite à une antichambre, un goulot d'étranglement et enfin une crypte (Nyholm & McFall-Ngai, 2021). À l'aube, le goulot d'étranglement chez l'hôte s'élargit ce qui contribue à la libération de 70 à 95% des symbiotes des cryptes chaque jour (Nyholm & McFall-Ngai, 2021). Pour que l'infection soit un succès il faut que les symbiotes soient en quantité suffisante dans la colonne d'eau (McCann *et al.*, 2003), ainsi les juvéniles aposymbiotiques peuvent donc être en contact avec les bactéries compétentes relâchées dans le milieu.

Pour assurer la continuité de la relation hôte symbiote, l'hôte et le symbiote doivent entrer en contact, au bon moment. Les symbiotes peuvent entrer dans l'hôte par ingestion, par attraction chimique, et certains hôtes créent des courants pour maximiser les probabilités de rencontre entre le symbiote et le tissu accueillant celui-ci (Bulgheresi *et al.*, 2011).

Lors du contact entre les larves ou juvéniles aposymbiotiques et les symbiotes, l'hôte peut mettre en place des mécanismes pour la reconnaissance et la sélection des bactéries compétentes. Dans certains cas les hôtes produisent un mucus qui va permettre l'agrégation et la discrimination des bactéries de l'environnement.

Certains nématodes de la sous-famille des Stilbonematinae sont associés à des bactéries thiotrophes (Ott, 1997; Polz *et al.*, 1999; Dubilier *et al.*, 2008) ces bactéries sont positionnées sur la cuticule des nématodes et les recouvrent presque entièrement, seule la partie antérieure au niveau de la bouche et la région postérieure au niveau de l'anus sont dépourvus de

symbiotes (Ott *et al.*, 2004). Les symbiotes sont impliqués dans la nutrition de l'hôte et dans des processus de détoxification des sulfures (Ott *et al.*, 1991; Hentschel *et al.*, 1999). Chaque espèce de nématode sera associée à une souche spécifique de bactéries. Les hôtes sécrètent une protéine appelée Mermaid, c'est une lectine de type C. Les lectines sont des protéines possédant un domaine de reconnaissance des glucides spécifiques (CRD, carbohydrate recognition domain) [Gourdine & Smith-Ravin, 2007].

Elle est sécrétée par les organes sensoriels sub-cuticulaires du nématode, et sa présence sur la cuticule permet l'agrégation des symbiotes à la surface du nématode. Bulgheresi *et al.*, (2011) ont démontré que de petites variations dans la séquence protéique des CRDs sont à l'origine de la sélection spécifique des symbiotes pour chaque espèce. Trois remplacements d'acides aminés dans les séquences protéiques donnent naissance à des CRDs de type différent (DNT, GDA, DDA). Les expériences de Bulgheresi *et al.* 2011 ont utilisé des isoformes de la protéine Mermaid correspondant aux différents types de CRDs cités précédemment. L'isoforme nommé His-mermaid 2 induisait les plus grands agrégats de symbiotes de l'espèce de nématode *Laxus oneistus* tandis que l'isoforme His-mermaid 3 induisait de grands agrégats de *Stilbonema majum* (Bulgheresi *et al.*, 2011), montrant la spécificité de chaque type de CRD. Chez les vers tubicoles du genre *Riftia* des sources hydrothermales les spécimens adultes abritent les endosymbiotes dans le trophosome (organe spécialisé pour l'accueil des symbiotes), ils sont dépourvus de bouche et de tube digestif et dépendent complètement de leurs symbiotes pour assurer leur nutrition. Pour cette association, l'infection se fait au stade larvaire grâce à une substance sécrétée à la surface externe formant une couche muqueuse par les glandes pyriformes de l'animal (Nussbaumer *et al.*, 2006). Par la suite les symbiotes migrent dans les cellules mésodermiques qui formeront ensuite le trophosome. L'infection initie le développement du trophosome et par la suite engendra l'apoptose des cellules ayant participé à l'installation de la symbiose (cellules infectées par les symbiotes, cellules adjacentes non infectées de l'épiderme, du muscle, ainsi que du mésoderme non différencié) (Nussbaumer *et al.*, 2006). Le calamar *Euprymna scolopes* réalise quant à lui une sélection drastique des symbiotes *Vibrio fischeri* lui permettant de réaliser la bioluminescence. Le calamar possède un organe lumineux bilobé, chaque lobe étant doté de trois pores (Chaston & Goodrich-Blair, 2010). Ces pores donnent l'accès à six cryptes dans lesquelles se développent les bactéries spécifiques. Selon Nyholm *et al.*, (2000), un mucus (composé de chitobiose, un chimio-attracteur) sécrété par l'hôte permet une première sélection de

bactéries gram – sur un épithélium qui collecte les bactéries de l’environnement et les amène vers les pores ; les auteurs supposent que la présence de ces bactéries gram - induisent la production de mucus par le calamar (Nyholm & McFall-Ngai, 2021). Même si les bactéries gram + sont aussi capables d’induire la sécrétion de mucus, seules les gram - forment des agrégats grâce à leur membrane composée de lipopolysaccharides (Nyholm & McFall-Ngai, 2004). Par la suite les bactéries compétentes (*V. fischeri*) vont s’accumuler dans ce mucus pendant plusieurs heures (4-6h) et vont ensuite migrer vers les pores puis les cryptes. Seules une ou deux cellules bactériennes s’y introduisent et s’y reproduisent. L’épithélium qui a servi à trier les bactéries disparaît alors par apoptose, si bien que toutes les bactéries trouvées dans les cryptes descendront de cet inoculum initial (Nyholm & McFall-Ngai, 2004). Nyholm *et al.*, (2000) suggèrent que les symbiotes seraient capables de se détacher du mucus grâce à une protéine comme observé chez leur homologue *Vibrio cholerae*, cependant les molécules produites par les deux organismes dans cette interaction sont peu ou pas connues.

Chez la palourde *Codakia orbicularis*, une lectine de type-C a été identifiée (codakine), elle est similaire aux lectines retrouvées chez les nématodes marins, et elle pourrait avoir le même rôle selon Gourdine et Smith-Ravin (2007). Elle serait en effet impliquée dans le processus de reconnaissance des bactéries compétentes et/ou dans les processus de défense immunitaire (Gourdine et Smith-Ravin, 2007).

Ces mécanismes permettant la sélection des symbiotes n’ont pas encore été décrits chez les crustacés. Chez *Rimicaris exoculata* les bactéries représentant la communauté symbiotique sont retrouvées dès la première colonisation chez les juvéniles et tout au long du cycle de vie de la crevette (Guri *et al.*, 2012). Les auteurs supposent que les mécanismes de sélection pourraient être semblables à ceux décrits chez les nématodes marins (Guri *et al.*, 2012). Des gènes impliqués dans la reconnaissance des bactéries par l’hôte ainsi que des gènes codant pour des protéines impliquées dans l’attachement des bactéries sur l’hôte ont été identifiés (Le Bloa, 2016). Le Bloa, (2016) suggère que les gènes LuxR (facteur de transcription) associés au signal AI-2 (molécule d’auto-inducteur universel permettant la communication entre espèce) identifié dans la communauté symbiotique de la crevette *R. exoculata* pourraient être impliqués dans la colonisation du céphalothorax de la crevette.

En somme, les hôtes s’attachent et se reconnaissent grâce à la sécrétion de protéines qui permettent la liaison aux sucres de surface spécifiques sécrétés par les bactéries (Bright & Bulgheresi, 2010).

1.5.2 La transmission verticale

Dans le cas de la transmission verticale la continuité de la relation est assurée, en règle générale il n'existe pas de phase aposymbiotique, de plus il n'existe pas de compétition entre bactéries pour la colonisation du nouvel hôte (Bright & Bulgheresi, 2010). L'hôte est en permanence en présence du symbiote. Généralement les symbiotes sont transmis par les gamètes de la femelle (les ovocytes) [Bright & Bulgheresi, 2010]. Chez les invertébrés marins la transmission verticale a été décrite chez plusieurs d'hôte tel que des éponges, des vers ou des palourdes Vesicomidae ou Solemyidae (Cary & Giovannoni, 1993; Krueger *et al.*, 1996; Usher *et al.*, 2001; Bergin *et al.*, 2018). Dans la symbiose impliquant des clams (bivalves blancs) de suintements froids *Isorropodon bigoti* (Vesicomidae) et des bactéries, les symbiotes sont présents pendant tous les processus de gamétogénèse, dans les cellules germinales jusqu'à obtention d'œufs matures. Les symbiotes se retrouvent alors à l'intérieur de l'œuf (Szafranski *et al.*, 2014). Chez les crustacés la transmission verticale a été identifiée chez quelques organismes tels que l'amphipode *Gammarus roeselii* (Cormier *et al.*, 2021), et chez la daphnie *Daphnia magna*. Chez ce petit crustacé pélagique les bactéries sont retrouvées dans les œufs de cette espèce même si elles s'avèrent être inefficaces pour la protection de ceux-ci (Douglas, 2018; Mushegian *et al.*, 2018).

En règle générale la transmission verticale est synonyme de peu de diversité génétique pour le symbiote, en raison du goulot d'étranglement subi par les symbiotes lors du transfert. Won *et al.*, (2003) avancent que l'effet du goulot sur chaque génération pourrait conduire à l'existence d'un seul et unique phylotype au cours du temps. Cependant parfois une transmission horizontale peut avoir lieu de façon occasionnelle et ainsi apporter de la diversité (Bright & Bulgheresi, 2010). Cette transmission peut avoir lieu entre individus de la même espèce (intra-spécifique) ou à partir de l'environnement (Dubilier *et al.*, 2008). Les femelles de *A. pisum* peuvent s'accoupler avec différents mâles, dans cette symbiose les mâles transmettent également des symbiotes ce qui peut augmenter la diversité génétique de leur communauté symbiotique (Moran & Dunbar, 2006).

2 Anatomie des Decapoda

Decapoda est un ordre de la classe des Malacostracés, par définition les organismes appartenant à ce groupe possèdent 5 paires de pattes. Il regroupe une grande diversité d'espèces (environ 110 000) comprenant des organismes marins, d'eau douce et semi-aquatiques/semi-terrestres (Hobbs & Lodge, 2010). En raison de cette grande diversité les décapodes sont retrouvés dans de nombreux habitats, allant de l'eau de surface, dans les eaux souterraines, les grottes ou encore dans des terriers (Hobbs & Lodge, 2010) depuis le niveau de la mer jusqu' en très grande profondeur (Zbinden *et al.*, 2004; Goffredi *et al.*, 2008).

2.1 Morphologie générale des décapodes

La tête est composée de six métamères, la partie antérieure, l'acron, porte les yeux ainsi que le rostre. Les appendices de la tête comprennent les antennules, les antennes, les maxillules, les maxilles ainsi que les mandibules. La tête et thorax sont fusionnés et forment le

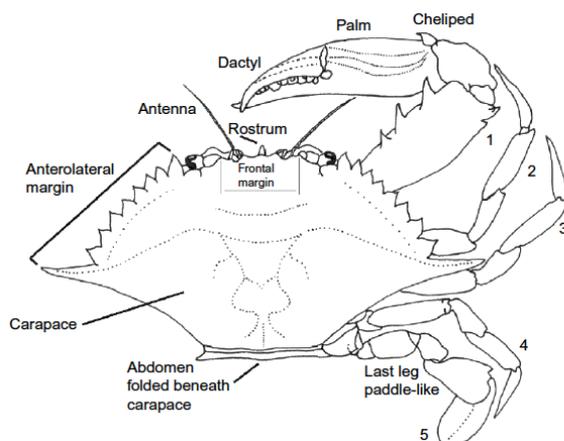


Figure 3. Vue dorsale d'un brachyoure (Hobbs et Lodge, 2010).
1,2,3,4,5 : Péréiopodes.

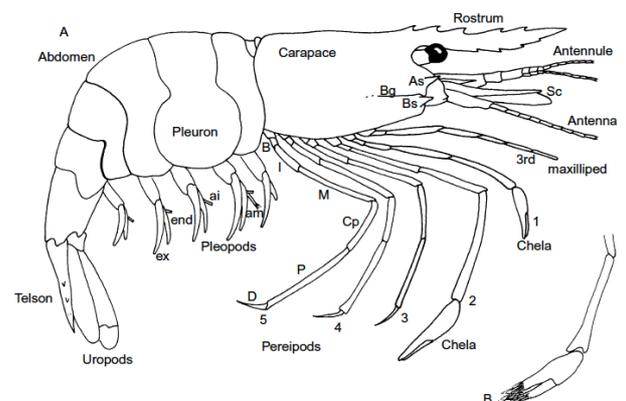


Figure 4. Vue latérale d'une crevette (Hobbs et Lodge, 2010).
1,2,3,4,5 : péréiopodes. Sc : Scaphocerites. As : épine antennaire. Bg : Sillon branchiostégial. Bs : épine branchiostégial. Ex : Exopode. End : Endopode. Ai : appendice interne. Péréiopode 5 : B : Base, I : Ischium, M : Mérus, Cp : Carpus, P : propodus, D : Dactylus.

céphalothorax. Le thorax ou le péréion est composé de 8 métamères qui portent 8 paires de péréiopodes : 3 maxillipèdes, 5 pattes locomotrices (Fig.3-4) et abrite la chambre branchiale (Hobbs & Lodge, 2010). L'abdomen ou le pléon est segmenté et constitué de 6 métamères il porte les pattes nageuses chez les crevettes [Fig.3] (Hobbs & Lodge, 2010).

Les appendices sont biramés et peuvent être modifiés pour réaliser diverses fonctions comme des fonctions sensorielles (antennules, antennes), la nutrition (mandibules, maxilles, maxillules, maxillipèdes [Fig.5]), la préhension (pinces), la marche (pattes locomotrices), le nettoyage, l'accouplement (appendices copulateurs), la nage (appendices de l'abdomen chez la crevette par exemple) etc. (Hobbs & Lodge, 2010). Généralement ces appendices biramés

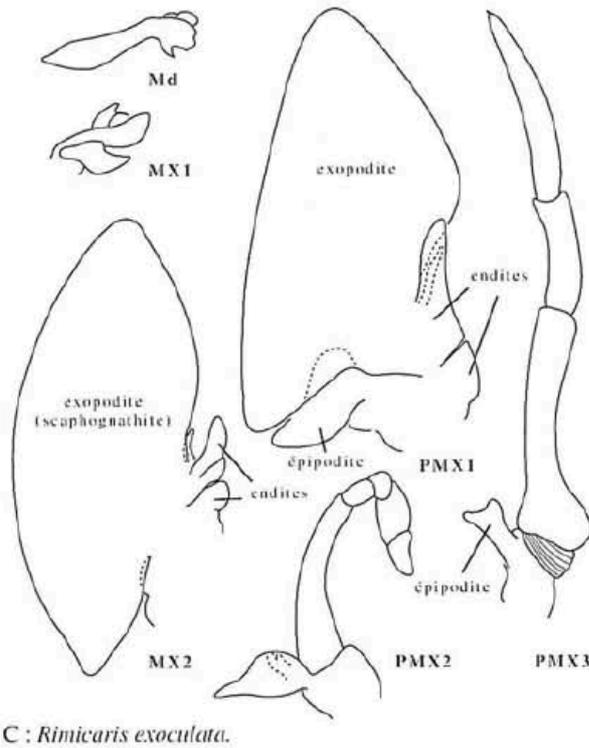


Figure 5. Morphologie des maxilles (appendice buccales) et maxillipèdes (appendices du thorax) (Segonzac, 1993). Md : mandibule, Mx1-2 : Maxille 1, Maxilles 2, Pmx1-3 : Maxillipèdes 1 à 3.

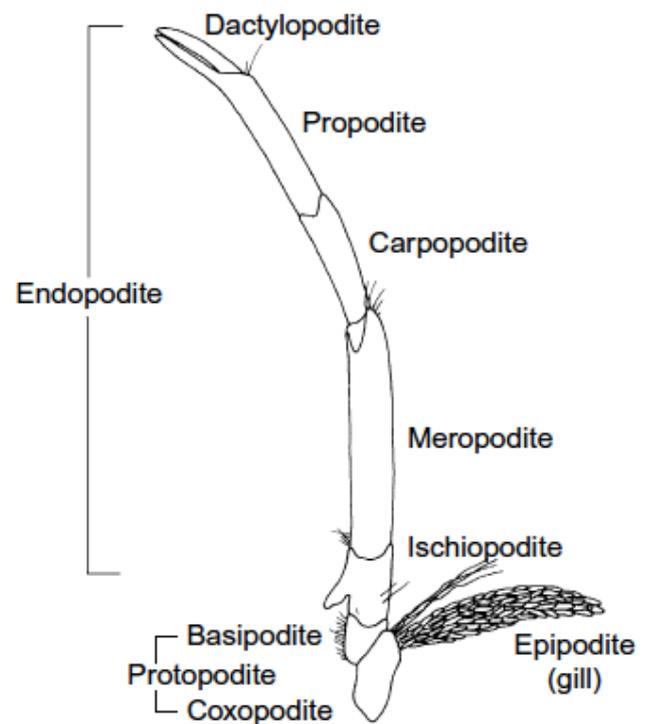


Figure 6. Morphologie d'un péréiopode (Hobbs et Lodge, 2010)

sont en forme de Y. Chaque appendice est composé d'une base appelée protopodite comprenant elle-même deux articulations appelées le coxopodite (coxa) et le basiopodite(base) [Fig.6]. Cette protopodite porte un endopodite composé de 5 podomères et d'une exopodite en position latérale pouvant être segmentée (Hobbs & Lodge, 2010). Cela comprend les appendices du thorax : antenne, antennule située à l'avant de l'animal, les pièces buccales : mandibule, 1^{ère} et 2^{ème} maxille. L'exopodite de la 2^{ème} maxille est appelé scaphognathite. Les trois premiers appendices du thorax correspondent aux maxillipèdes qui servent à la nutrition, par la suite viennent les 5 autres péréiopodes (pattes marcheuses) [fig.3]. Les pléiopodes (pattes abdominales) ainsi que les uropodes présents entourent le telson (Hobbs & Lodge, 2010).

2.2 Morphologie des brachyoures

Les brachyoures représentent le groupe le plus diversifié des décapodes. Ils se différencient des autres crustacés décapodes de par leur morphologie. Leurs caractéristiques morphologiques sont à l'origine de cette diversification. Ceci leur permet également de coloniser divers habitats, on les qualifie de « vrais crabes ». Le plus petit crabe mature, *Neorhynchoplax minima* mesure 1,4mm en termes de largeur de carapace tandis que l'espèce la plus grande *Macrocheira kaempferi* (crabe-araignée géant du Japon) atteint une taille de carapace de 40cm ou de 3,8m en prenant en compte l'envergure des pattes (Davie *et al.*, 2015).

La carapace peut avoir des formes très variées (ovale, circulaire, triangulaire, hexagonale, trapézoïdale etc...). Ces carapaces sont lisses, rugueuses, ou granuleuses et recouvertes d'ornements tel que des épines. Les pinces peuvent être massives ou réduites, parfois asymétriques (crabes violonistes), les péréiopodes peuvent être plats, larges, ou encore en échasses selon Davie *et al.*, (2015). Il existe un dimorphisme sexuel chez les brachyoures où les mâles sont généralement plus gros que les femelles, sauf dans les familles Pinnotheroidea et Cryptochiroidea où la femelle est plus grosse et le mâle minuscule (Davie *et al.*, 2015).

La « carcinisation » serait à l'origine du succès et de la diversité taxonomique des brachyoures. Ce terme correspond au fait que ces organismes « adoptent » une forme de crabe due à la réduction de leur pléon (abdomen) par la taille et l'épaisseur (Davie *et al.*, 2015). Avoir un pléon réduit est un avantage vis-à-vis des prédateurs, car c'est l'endroit le plus exposé aux attaques, d'ailleurs il ne sert plus à la nage ou à échapper aux prédateurs, il est destiné à protéger les organes reproducteurs et les œufs (Davie *et al.*, 2015). Le céphalothorax subit aussi une modification, sa longueur est considérablement réduite, et ceci donne lieu à un corps plus compact et non plus allongé, avec une carapace comprimée dorso-ventralement. Cette carcinisation a entraîné plusieurs modifications : la modification de la bouche, une céphalisation (condensation céphalique du système nerveux), la régression des surfaces membraneuses, une calcification renforcée du céphalothorax, la fusion des métamères composant le pléon ainsi que la perte des uropodes biramés (paire d'appendices postérieurs portés par le dernier métamère de l'abdomen chez les homards par exemple) ou la modification de ces appendices chez certaines familles (Davie *et al.*, 2015). Le telson est

toujours présent et est porté par le métamère terminal du pléon. Par ailleurs le pléon est modifié chez la femelle afin de pouvoir accueillir et porter les œufs (Davie *et al.*, 2015).

La position des chélipèdes (patte modifiée en pinces) et des pattes marcheuses (péréiopodes des métamères 5-8) est différente chez les brachyours. Les chélipèdes sont placés transversalement à l'avant du corps ce qui permet de porter les aliments à la bouche. Les pattes marcheuses sont latérales (Davie *et al.*, 2015), ce qui permet un déplacement latéral rapide mais surtout une aisance de mouvement et la colonisation de différents types de milieux. Ces modifications représentent un avantage pour le mode de vie des crabes.

Chez les brachyours, les appendices céphalothoraciques sont les mêmes que chez les crustacés en général (fig.7). Au niveau de la tête, on retrouve une paire d'antennes, d'antennules, et les yeux ayant une fonction sensorielle, ainsi que les mandibules et deux maxilles qui sont des pièces buccales. La première maxille ne possède pas d'exopodite, la seconde maxille possède un exopodite (scaphognathite) [fig.7] large lui permettant de pomper l'eau dans la chambre branchiale (Davie *et al.*, 2015). Au niveau du thorax, ce sont des appendices biramés, les premiers sont les maxillipèdes, ceux-ci servent à la manipulation des aliments, ils possèdent un épipode (épipodite) sur le coxa de leur appendice (Davie *et al.*, 2015). Le premier maxillipède est le plus petit et permet de trier et d'apporter les aliments vers les mandibules, au même titre que le second maxillipède (Davie *et al.*, 2015). Celui-ci possède des soies spécialisées qui permettent le tri des aliments et des micro-organismes, ceci a été observé chez plusieurs espèces de crabes du genre *Uca* possédant des soies en forme de cuillère (Colpo & Negreiros-Franzoso, 2013). Le second et troisième maxillipède possèdent un endopode qui se divise en plusieurs parties à partir du coxa : Ischium, merus, carpus, propodus, dactylus (fig.7). L'ischium peut être différent en fonction des familles de crabes, il peut être fusionné avec le mérus selon Davie *et al.*, (2015). Certaines familles présentent ce qu'on appelle la « *crista dentata* », correspondant à une ou deux rangées de crête sur le bord de l'ischium. D'autres familles présentent seulement une rangée de crêtes tandis que chez d'autres la *crista dentata* est absente (Davie *et al.*, 2015). Viennent ensuite les 5 pattes locomotrices. L'extrémité de la première paire, appelée aussi chélipède, est modifiée par la présence d'une pince qu'on appelle « chela », c'est caractéristique propre aux crabes. Elle peut servir à la prise de nourriture, à la défense et à la parade nuptiale. Le chélipède se

compose d'un coxa, d'une la base et d'un ischium fusionné, d'un merus, d'un carpus, d'un propodus et d'un dactylus opposable. A la suite se trouvent les 4 paires de pattes marcheuses (Davie *et al.*, 2015). Ces pattes sont rattachées à une base interne appelée endophragme. La structure de l'endophragme va coordonner la marche et la direction principale de déplacement, c'est le « squelette » central ainsi que le support du système musculaire (Davie *et al.*, 2015). Les branchies sont par ailleurs « accrochées » sur cet endophragme.

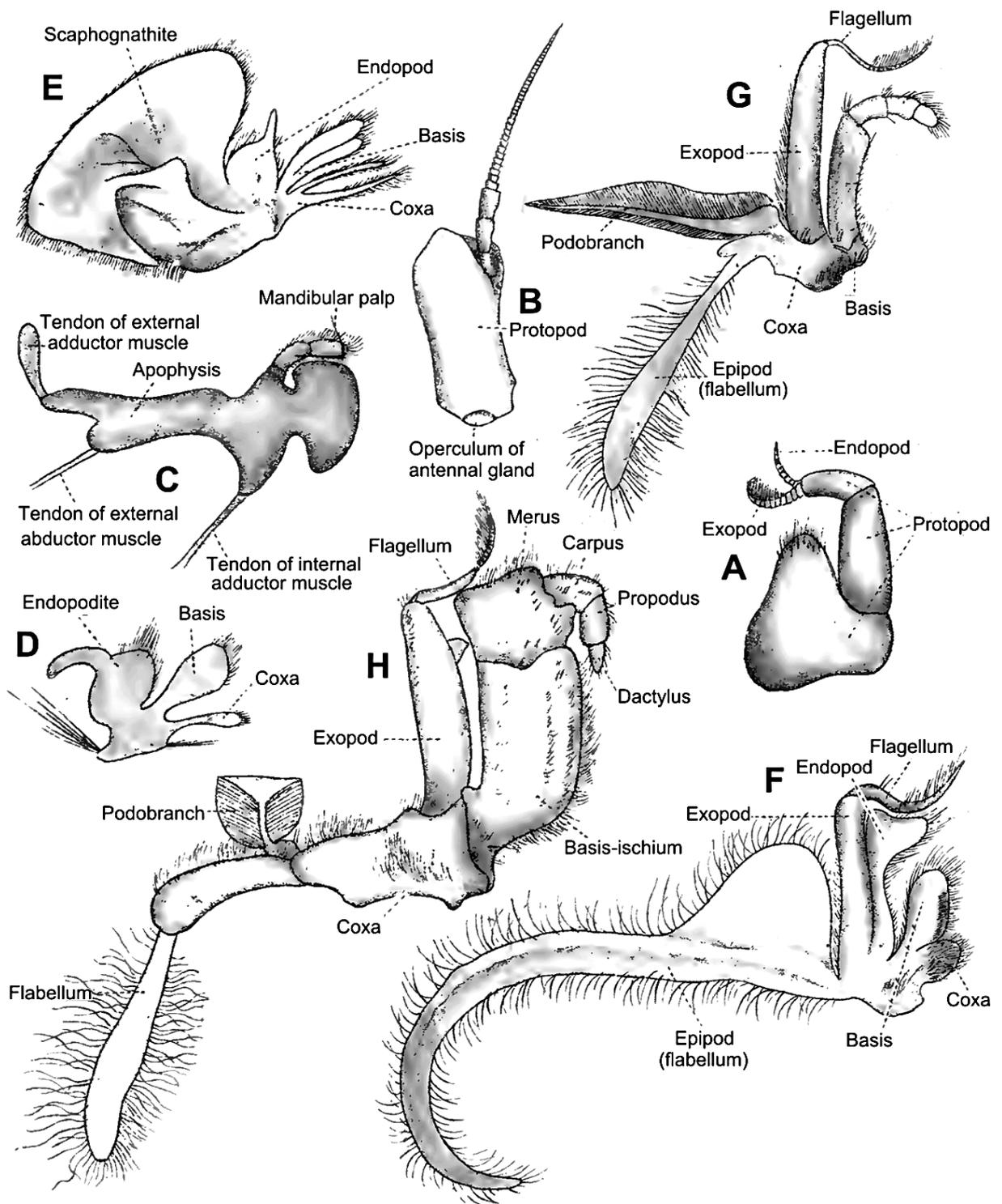


Figure 7. Appendices céphalothoraciques chez le crabe *Cancer pagurus*. A : Antennule, B : Antenne, C : Mandibule, D : 1^{ère} Maxille, E : 2^{ème} Maxille, F : 1^{ère} Maxillipède, G : 2^{ème} maxillipède, H : 3^{ème} maxillipède. Pearson, 1908 ; Davie *et al.*, 2015.

Structure et fonctions des branchies.

Les décapodes colonisent divers milieux, ils ont une haute capacité à s'adapter aux caractéristiques des différents habitats (Hobbs & Lodge, 2010). Outre leur fonction dans la respiration, les branchies sont aussi impliquées dans des processus d'osmorégulation, d'excrétion azotée, d'absorption de NaCl (Gilles & Pequeux, 1986 ; Freire *et al.*, 2008) et dans la stabilisation du pH de l'hémolymphe (Davie *et al.*, 2015). Il existe trois types de branchies chez les décapodes. Les trichobranches, qui sont composées d'un axe central d'où partent trois colonnes organisées en filaments (Dickson *et al.*, 1991). Les dendrobranchies, qui sont composées d'un axe central (rachis), de cet axe sont rattachées des branches secondaires. Ces branches secondaires sont subdivisées en forme de doigts ramifiés (Tavares & Martin, 2010). Les phyllobranchies, qui elles sont retrouvées chez les brachyours. Ce sont des branchies composées de lamelles branchiales ayant un aspect aplati (Davie *et al.*, 2015). Elles sont grandes à la base de la branchie et deviennent de plus en plus petites formant une pointe à l'extrémité de la branchie (Freire *et al.*, 2008).

En fonction de l'endroit de l'appendice du crabe sur lequel est fixée la branchie, elle sera appelée différemment :

- Les podobranches sont reliés au coxa (Fig.8)
- Les arthrobranchies à la membrane articulaire entre le coxa et le pleuron (Fig.8)
- Les pleurobranchies à la paroi pleurale du céphalothorax à la base de l'appendice (Fig.8)

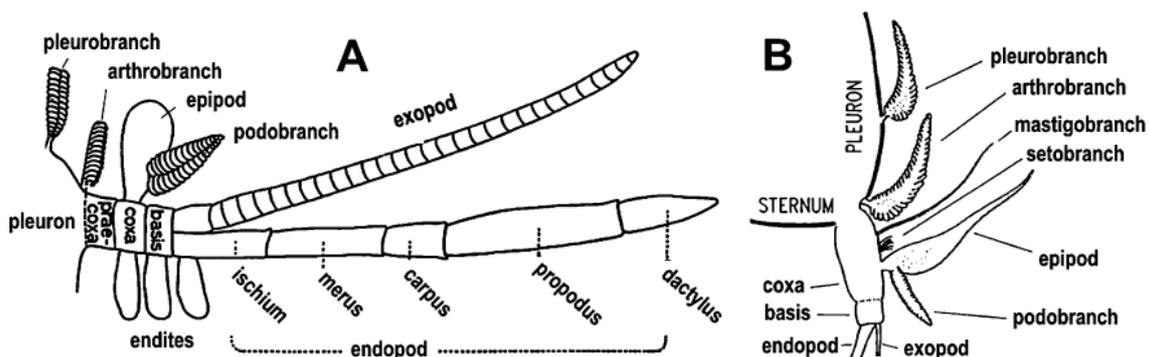


Figure 8. Noms des branchies en fonction de leur emplacement sur l'appendice ou le pleuron d'après Holthuis, 1993 (A) et Hong, 1988 (B).

Les branchies sont composées d'un sinus branchial afférent positionné dorsalement et un sinus branchial efférent positionné ventralement avec deux vaisseaux reliés par les lamelles branchiales. Les lamelles sont composées d'un épithélium simple (monostratifié) et recouvert de la cuticule (Freire *et al.*, 2008 ; Davie *et al.*, 2015). L'épithélium est composé de 4 types de cellules spécialisées :

- Les cellules **fines** formant un épithélium squameux de 1 à 5 μm d'épaisseur. Leur fonction principale concerne la respiration, mais elles peuvent jouer un rôle dans l'excrétion d'ammonium et l'absorption d'ions.
- Les cellules **épaisses**, ont une épaisseur de 10 à 20 μm et ont les caractéristiques des cellules permettant le transport d'ions. Leurs membranes apicales et basales sont repliées et forment des replis ou microvillosités.
- Les cellules **pilasters (cellules en pilastre)** ayant un rôle structurant. Elles pourraient tout de même intervenir également dans le transport des ions (Davie *et al.*, 2015).

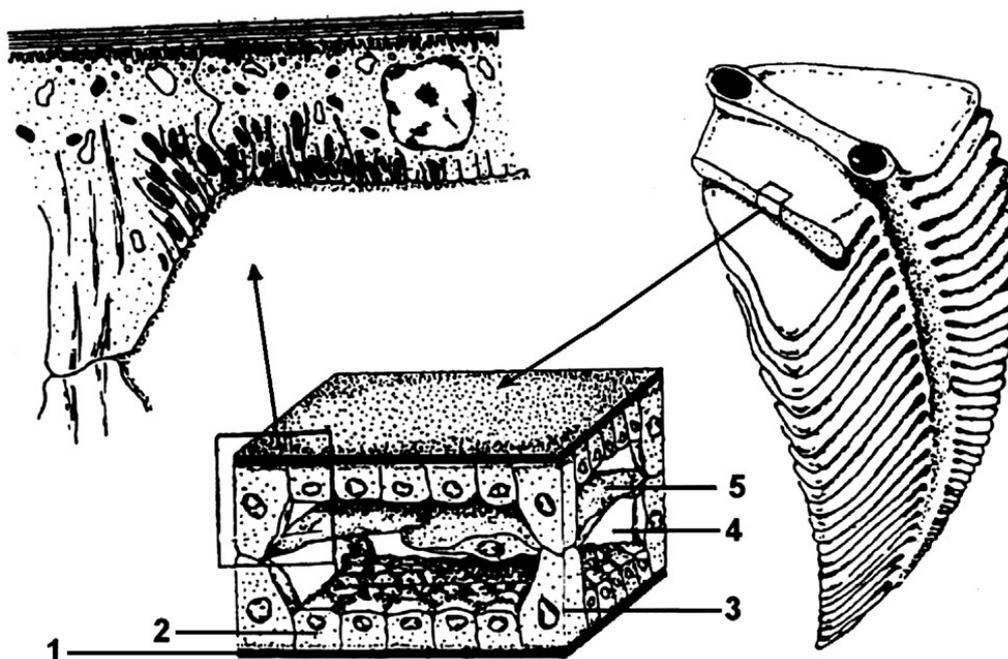


Figure 9 Schéma explicatif sur une coupe de lamelle branchiale postérieure. 1. Cuticule, 2. Présence de cellules épaisses. 3. Cellules en pilastre, 4. Espace hémolymphatique, 5. Septum cellulaire intralamellaire. Davie *et al.* 2015

L'espace hémolymphatique situé entre les couches de cellules épithéliales de la lamelle branchiale, comprend un septum de cellules intralamellaires qui sont soutenues par les cellules en pilastre (fig.9) (Freire *et al.*, 2008). Les fonctions respiratoires sont assurées par les

branchies antérieures et elles sont caractérisées par un épithélium composé de cellules fines (Freire *et al.*, 2008; Henry *et al.*, 2012). L'échange de gaz mais surtout l'excrétion de CO₂ se fait de manière diffusive (Aldridge et Cameron, 1979).

Les branchies servent aussi de site principal pour l'absorption des ions chez les organismes aquatiques (Drach, 1930). Les branchies postérieures sont responsables de la régulation des concentrations en ions (Gilles & Pequeux, 1986). L'absorption est réduite chez les organismes terrestres. De ce fait, les organismes terrestres retiennent les ions et l'eau en réduisant la perte par l'urine. Certains animaux faisant face à la déshydratation utilisent des stratégies comme la réabsorption des ions excrétés et la production d'urine hypo-osmotique par les glandes de l'antenne (glandes antennaires) [Wheatly, 1985 dans Davie *et al.*, 2015].

En raison de leur écologie, les crabes doivent s'adapter aux variations de la salinité. Certaines espèces peuvent vivre en eau douce et en eau salée, d'autres débutent leur cycle de vie en eau salée qu'elles terminent en eau douce. Pour ce faire il existe 2 stratégies : la régulation du volume intracellulaire isosmotique ou l'osmorégulation extracellulaire anisosmotique (Henry *et al.*, 2012). Dans le premier cas ces organismes seront appelés « osmoconformeur », la concentration osmotique et ionique de l'hémolymphe est légèrement supérieure à celle du milieu ambiant, cependant cette concentration change en fonction des fluctuations du milieu. En effet la concentration osmotique intracellulaire va être réduite par la libération d'ions K⁺ et d'autres molécules organiques (réduction de la taille des cellules), ceci engendre un gain d'eau et donc la dilution de l'hémolymphe (extracellulaire) et le gonflement des cellules pour palier à une perte de salinité dans l'environnement et rester isosmotique à celui-ci (Henry *et al.*, 2012). Dans le second cas les organismes sont appelés « osmoregulateurs », au contraire eux vont user de mécanismes pour maintenir stable l'osmolarité de l'hémolymphe en dépit des variations dans l'environnement (Henry *et al.*, 2012). Chez les osmoconformeurs les cellules fines sont présentes sur toute la surface branchiale espacées de quelques cellules en pilastre, et chez les osmorégulateurs les cellules épaisses et en pilastre sont présentes par patch (Freire *et al.*, 2008).

2.3 Mode de vie des crabes en milieu tropical

En milieu tropical, ils peuvent être observés dans les récifs coralliens, sur la plage faisant des terriers dans le sable, en arrière et en bordure de mangrove.

Les paragraphes suivants décrivent les habitudes de vie de quelques espèces de crabes retrouvées au niveau des récifs, sur la plage et dans les mangroves.

Comportement et alimentation

En pleine eau, au niveau des récifs coralliens, nous pouvons observer des crabes tel que *Percnon gibbesi* se cachant sous les oursins noirs. Le crabe *Stenorhynchus seticornis*, appelé crabe tour eiffel, ou encore le parasite d'oursin *Dissodactylus primitivus*.

Percnon gibbesi peut être associé avec l'oursin noir *Diadema antillarum* dans la Caraïbes. Hayes *et al.*, (1998) suggèrent tout de même que ce sont des associations aléatoires et que *Percnon gibbesi* peut être retrouvé non associé à l'oursin. *Percnon gibbesi* est le plus souvent retrouvé entre 2 et 7 m de profondeur mais il peut être observé jusqu'à 23 m de profondeur (Colin, 1978). Des études ont prouvé que cette espèce est essentiellement herbivore et se nourrit d'algues (Puccio *et al.*, 2006). Ce sont des crabes diurnes qui se nourrissent pendant la journée, et peuvent quitter la mer au cours de la nuit pendant de bref moment (Hartnoll, 1965).

Dissodactylus primitivus de la famille des Pinnotheridae est un petit crabe marin parasite des oursins *Meoma ventricosa*. Les petits crabes vivent entre les épines de l'hôte. D'ailleurs, ils se nourrissent des épines et téguments des oursins laissant apparaître des cicatrices sur l'oursin. Ils se nourrissent aussi des diatomées, et des restes de mue sont parfois retrouvés dans le contenu stomacal (Telford, 1982). de Bruyn *et al.*, (2009) a observé jusqu'à 18 crabes sur un oursin. Les mâles sont généralement plus petits que les femelles. Ils passent toute leur vie sur l'hôte, ils changent parfois d'hôte à la recherche de femelles pour l'accouplement (de Bruyn *et al.*, 2009).

Sur les plages, des crabes semi-terrestres peuvent être observés. Les crabes de la famille des Ocypodidae sont abondants dans ce milieu. Les crabes fantômes du genre *Ocypode* creusent des terriers profonds en forme de J ou L jusqu'à 90 cm pour l'espèce méditerranéenne (Tiralongo *et al.*, 2020) et 50 cm pour l'espèce tropicale (Wolcott, 1978). Ils sont nocturnes, et creusent des trous peu profonds au niveau du rivage. Au retour du jour, ils retournent vers les

terres pour s'abriter dans de nouveaux terriers (Wolcott, 1978). Ils sont décrits comme des charognards facultatifs (Wolcott, 1978) ou des prédateurs opportunistes et omnivores. Ils passent un certain temps à la recherche de nourriture, mais se nourrissent aussi d'animaux morts tel que des oiseaux, des balanes, sinon de restes de nourritures humaine, d'œufs et de nouveaux nés de tortues marines, de détritiques organiques (Trott, 1999), de crabes taupes et de petites palourdes (Wolcott, 1978). Dans l'étude de Wolcott (1978), les crustacés et les mollusques représentent ensemble 87% de la consommation de ce crabe. Les conditions de vie vont fortement impacter le mode de nutrition des crabes. Wolcott (1978) avance que lorsque *Ocypode quadrata* est le seul prédateur terrestre sur la plage et que celle-ci abonde de proies vivantes, il aura un comportement de prédateur, dans le cas contraire, il se comportera comme un opportuniste/charognard se jetant sur tout ce que renvoie la mer sur le rivage (Wolcott, 1978). Étant plus prédateurs qu'opportunistes, les crabes vont privilégier les animaux fraîchement morts ou ceux qui ne présentent pas un état de décomposition trop avancé (Trott, 1999). Au-delà du rivage mais toujours sur les plages, on observe des crabes terrestres de la famille des Gecarcinidae tel que *Gecarcinus lateralis* en Guadeloupe (Beziat, observation personnelle) ou *Gecarcinus quadratus* au Costa Rica (Lindquist *et al.*, 2009). Au Mexique cette espèce est observée dans la forêt caducifoliée (Capistrán-Barradas *et al.*, 2003). Son homologue du même genre *Gecarcinus rudicola* peut être retrouvée assez loin de la mer en haute altitude à la Dominique et en Jamaïque (Britton *et al.*, 1982; Hartnoll *et al.*, 2006). Selon (Capistrán-Barradas *et al.*, 2003), l'activité de ces crabes dépend de l'humidité du milieu, en raison de la déshydratation. Pour pallier cette déshydratation, les crabes vivent dans des terriers humides et profonds (Burggren *et al.*, 1988) et sont actifs entre 7h et 11h, et en soirée (Capistrán-Barradas *et al.*, 2003). Ils ont développé des « poumons » en plus des branchies en adaptation à la vie hors de l'eau (Burggren *et al.*, 1988). Ces crabes ont un régime alimentaire basé sur la consommation de matériel végétal. Celui-ci comprend la litière, les semis, ainsi que les

Les poumons chez les crabes terrestre correspondent en vérité à une chambre branchiale élargie. Ce « poumon » possède une cuticule ainsi une membrane respiratoire très fine et hautement vascularisée. Chez les organismes les plus terrestres la taille et la quantité des branchies diminue en présence des poumons branchiostegiales. Ces derniers améliorent la respiration aérienne et les branchies ont alors principalement un rôle osmorégulateur (Watson-zink, 2021 ; Farrely et Greenaway,1993).

graines. Ce comportement a un impact sur le recrutement des semis. Burggren *et al.*, 1988 ont démontré qu'en l'absence de crabe terrestre, la richesse spécifique des végétaux est 20 à 50 fois plus importante. *Cardisoma guanhumi* est une autre espèce de crabe terrestre de la famille des Gecarcinidae observée en région tropicale. Dans certains endroits, ce crabe est considéré comme un nuisible, cependant sur plusieurs îles *C. guanhumi* appelé crabe de terre ou crabe blanc en Guadeloupe, possède une valeur économique, étant largement consommé. Comme *G. lateralis*, *C. guanhumi* vit dans des terriers, qu'il creuse jusqu'à atteindre la nappe phréatique (pouvant aller jusqu'à 1,5 m de profondeur). Ces crabes utilisent l'eau du fond de leur terriers pour humidifier leur chambre branchiale (Herreid & Gifford, 1963). Ils se nourrissent essentiellement de végétaux, de feuilles, de fruits ou d'herbes. Ils peuvent avoir un comportement de collecte, ils ramènent la nourriture dans leurs terriers et repartent en quête d'autres éléments à manger (Herreid, 1963). Ils peuvent avoir une activité diurne ou nocturne, cela dépend directement de l'exposition au soleil (Herreid, 1963). Si présent en zone de mangrove, ils consomment les feuilles de palétuviers (rouge ou noir par exemple) ou bien se nourrissent d'algues filamenteuses comme observé pour les organismes vivant le long des berges des chenaux en Floride. Ils peuvent aussi avoir un comportement de charognards en se nourrissant d'animaux morts, notamment d'autres crabes terrestre morts (Herreid, 1963).

Dans l'habitat particulier de la mangrove, nous retrouvons plusieurs espèces de crabes, les familles les plus représentées en termes d'espèces sont les Sesarmidae, les Ocypodidae et les Grapsidae, d'après des observations dans les régions d'Inde et d'Afrique (Ngo-Massou *et al.*, 2018; Soundarapandian *et al.*, 2008) et dans les mangroves des régions Ouest-Atlantique (Brésil). Les Ocypodidae représentent la famille la plus abondante (Freitas *et al.*, 2021) même dans les mangroves naissantes comme en Guyane française (Aschenbroich *et al.*, 2016). *Ucides cordatus* est un crabe semi-terrestre de la famille des Ocypodidae. Il est présent en arrière et en bordure de mangrove. Comme *C. guanhumi*, il est consommé par la population locale (Diele *et al.*, 2005). *U. cordatus* vit aussi dans des terriers retrouvés généralement près des arbres. En fonction de l'endroit où ils se développent, ils peuvent avoir une activité diurne ou nocturne. Cette différence doit être liée aux conditions du milieu, principalement à la température (Wiedemeyer, 1997; Nordhaus *et al.*, 2009). En dehors de leur terriers, l'activité principale concerne la nutrition/la recherche de nourriture et le fouissage vis-à-vis du terrier (entretien, construction, fermeture ou ouverture de l'entrée du terrier) [Nordhaus *et al.*,

2009]. Dans l'étude de Nordhaus *et al.*, (2009), *U. cordatus* se nourrit principalement à partir du sédiment, la matière végétale fait aussi partie de son alimentation mais est moins importante. La source principale d'alimentation peut varier car selon l'étude de (Nordhaus & Wolff, 2007) mais le crabe reste tout de même principalement herbivore. La recherche, la collecte de nourriture sont liées aux phases lunaires ainsi qu'à la marée (Nordhaus *et al.*, 2009). En bordure de mangrove, on retrouve les célèbres crabes violonistes. Ils sont très étudiés et jouent un rôle essentiel dans les mangroves. Ils sont considérés comme les ingénieurs de cet écosystème en grande partie grâce à leur action de bioturbation. Ils consomment la litière et permettent de la remise en disponibilité de la matière organiques, ils recyclent donc les nutriments de la mangrove (Kristensen, 2008), ils aèrent le sédiment par leur activité de fouille (creusent des terriers) et réduisent la salinité des sols (Nagelkerken *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2009). Cette activité peut modifier les caractéristiques physico-chimiques du sédiment et impacter la composition de la communauté microbienne associée (Booth *et al.*, 2019). Les crabes violonistes sont caractérisés par un dimorphisme sexuel marqué, où le mâle possède une grosse pince et une autre beaucoup plus petite. Chez les mâles la grosse pince sert à la défense et à la séduction. Les crabe violonistes du genre *Uca* sont principalement diurnes, toutes leurs activités (l'alimentation, la fouille, les combat et l'accouplement) sont réalisées pendant la journée (Crane, 1975).

Les crabes violonistes se nourrissent à partir du sédiment. Ils récoltent le sédiment avec la petite pince si c'est un mâle, avec les deux pinces si c'est une femelle et ramènent le sédiment à la bouche. Les soies présentes sur les pièces buccales (second maxillipède) vont trier les particules organiques des particules inorganiques (Icely & Jones, 1978).

Les particules inorganiques s'accumulent dans la bouche, après le tri d'un certain nombre de portions de sédiments, 4 à 7 portions, une masse cohésive de sédiment est produite et laissée sur le sol (Crane, 1975). Ceci est appelé « feeding pellet » ou pellets d'alimentation (Crane, 1975). La présence de soies en forme de cuillère en grande quantité sur le mérus du second maxillipède permet un tri plus efficace du sédiment (Colpo & Negreiros-Fransozo, 2011). Ces crabes violonistes sont qualifiés de « filter-feeding crab » (Crane, 1975). Les crabes violonistes peuvent avoir des terriers allant de 16 à 75 cm de profondeur (Aspey, 1978). A marée haute, les crabes ferment leur terrier avec du sédiment, à marée basse ils émergent pour se nourrir (Christy et Salmon, 1991). Des tours de boues sont observées à l'entrée des terriers. Ces tours

servent d'abri aux crabes (Aspey, 1978). La plupart des activités sociales ont lieu en approche de la pleine lune ou de la nouvelle lune (Crane, 1975).

Le plus en bordure de mangrove, on retrouve *Aratus pisonii* grimpant sur les racines échasses ou branches du palétuvier rouge. Les femelles sont généralement plus petites que les mâles (Warner, 1967). En fonction de son milieu de vie (estuaire ou mangrove marine) le régime alimentaire de *A. pisonii* peut-être différent. Toutefois les individus retrouvés en mangrove sont considérés comme étant omnivore. Warner, (1977) les avaient décrits comme étant des herbivores se nourrissant de feuilles de palétuviers, cependant Diaz & Conde, (1988) les ont observés se nourrissant de chair de poisson, ou encore d'organismes fixés sur les racines de palétuviers.

Reproduction

Peu d'informations sont disponibles sur la reproduction des crabes *Percnon gibbesi* dans la Caraïbes. Les crabes du genre *Dissodactylus* sont associés aux oursins dollar retrouvés jusqu'à 50m de profondeur. Comme cité précédemment plusieurs crabes sont souvent observés sur un seul hôte, contrairement à d'autres crustacés ils ne forment pas de couple monogame, mais s'accouplent avec différents individus se trouvant proches d'eux. D'autant plus que ces crabes peuvent changer d'hôte dans le but de trouver un partenaire (Alves *et al.*, 2017). Ce comportement a été observé chez les mâles et les femelles sans œufs (de Bruyn *et al.*, 2009). Le développement larvaire de *D. primitivus* consiste en une prézoé, 3 stades zoés et 1 stade mégaloïpe (Pohle & Telford, 1983). Aucun stade larvaire n'est retrouvé sur l'oursin, seul le premier crabe après le stade mégaloïpe étant présent sur l'hôte, (de Bruyn *et al.*, 2009).

Sur la plage les femelles gravides du crabe fantôme *Ocypode quadrata* sont observées particulièrement pendant les mois de Février à Mai et d'Octobre à Novembre. L'étude de (Negreiros-Fransozo *et al.*, 2002) suggère que les femelles restent dans leur terrier le temps de la maturation des œufs et qu'elles sortent seulement au moment de pondre. Cette espèce présente 5 stades zoés et 1 stade mégaloïpe (Diaz & Costlow, 1972). Peu d'informations sont disponible sur l'accouplement et le moment de l'éclosion, toutefois Brooke, (1981) suggère que les crabes *Ocypode ceratophthalmus* creusent des terriers ainsi que des structures (pyramides) autour de leur terrier formant un chemin, pour attirer la femelle et s'accoupler. L'accouplement aurait lieu pendant la nuit, à ce moment l'entrée du terrier est fermée avec du sable (Brooke, 1981).

Malgré leur adaptation à la vie terrestre, les crabes de terre restent dépendants de l'eau pour leur reproduction. Pour *Cardisoma guanhumi* l'accouplement a été observé hors des terriers (Lutz & Austin, 1983). Les femelles grainées apparaissent entre les mois de Novembre et de Février (Shinozaki-Mendes *et al.*, 2013).

Les gamètes mâles (spermatozoïdes) sont transportés par la femelle jusqu'aux œufs, la fertilisation est interne puis les œufs fertilisés seront retrouvés à l'extérieur de la femelle (Gifford, 1962). Les femelles relâchent leurs œufs en eau de mer en fonction de la phase lunaire (Gifford, 1962), cela se produit généralement pendant la saison des pluies (Shinozaki-Mendes *et al.*, 2013) L'éclosion donne une larve zoé planctonique, qui aura 5 phases de développement chez *C. guanhumi* (Costlow Jr & Bookhout, 1968).

Dans l'écosystème de mangrove comme cité dans le paragraphe précédent on retrouve en majorité des espèces de la famille des Ocypodidae, Sesamidae et Grapsidae. Parmi eux, l'espèce *Ucides cordatus* se reproduit lors des saisons de pluies selon (Diele *et al.*, 2005). Ils se reproduisent plusieurs fois dans l'année entre les mois de Décembre et Avril. Comme *C. guanhumi*, les œufs fertilisés se retrouvent à l'extérieur de l'animal. Les femelles vont pondre en eau salée 1 à 2 jours avant la nouvelle lune ainsi que le jour de la nouvelle lune (Diele *et al.*, 2005). Il faut environ une trentaine de jours après le premier stade zoé pour obtenir la mégaloque. Cette espèce possède 6 stades zoés et 1 stade mégaloque, parfois seuls 5 stades zoés peuvent être observés, et la mégaloque est directement obtenue après le stade 5 (Rodrigues & Hebling, 1989).

Concernant les crabes les plus abondants en mangrove, à savoir les crabes violonistes (Melo, 1996; Castiglioni & Negreiros-Franozo, 2005) l'accouplement est réalisé dans les terriers des mâles en approche de la pleine lune ou de la nouvelle lune (Crane, 1975). Il agite sa grosse pince dans le but d'attirer les femelles dans son terrier. Celui-ci bouche l'entrée du terrier avec du sédiment pendant 1 à 3 jours le temps de l'accouplement. Une fois les œufs fertilisés, les femelles peuvent rester 2 semaines dans leur terrier avant l'éclosion des œufs dans l'eau de mer (Christy & Salmon, 1991). Comme observé précédemment pour les autres espèces, la reproduction peut avoir lieu plusieurs fois dans l'année. L'espèce *Uca rapax*, maintenant appelé *Minuca rapax*, se reproduit toute l'année, les femelles gravides sont présentes en abondance aux mois d'Octobre et de Mars dans le lagon Itaipu du sud du Brésil (Costa & Soares-Gomes, 2009). Le développement larvaire des crabes violonistes n'est étudié que pour certaines espèces du genre *Uca*, il peut être différent d'une espèce à l'autre. Il peut y avoir 4

à 6 stades zoés chez les espèces *U. uruguayensis*, *U. mordax*, *U. burgersi*, et *U. vocator* (Negreiros-Fransozo *et al.*, 2009). Chez *Uca tangeri* et *U. pugilator* 5 stades zoés et 1 stade mégalope ont été identifiés (Herrnkind, 1968; Rodriguez & Jones, 1993).

Les femelles *A. pisonii* (Sesarmidae) se reproduisent toute l'année, elles sont toutefois plus abondantes au mois de Novembre. L'accouplement a lieu sur les racines de palétuviers à quelques centimètres au-dessus de la mer. Warner 1967 a observé une migration des femelles vers le bord de la mangrove quand les œufs sont prêts à éclore, il semblerait que la migration commence à la fin de la période d'incubation des œufs.

Selon Díaz & Conde (1989), les pontes sont asynchrones, étant donné que les femelles pondent toute l'année, toutefois Warner, (1967) avance que les pontes ont lieu à la pleine lune ainsi qu'à la nouvelle lune, les femelles descendent dans l'eau la tête la première et secouent leur corps entier jusqu'à ce que toutes les larves soient relâchées (Warner, 1967). Il existe 4 stades zoés et un stade mégalope (Cuesta *et al.*, 2006) il faut environ un mois pour obtenir une mégalope.

Tableau 1. Récapitulatif de l'écologie de quelques espèces marines, terrestres et semi terrestres.

| Espèce | Habitat | Alimentation et comportement | Reproduction |
|--|--|--|--|
|  <p><i>Dissodactylus primitivus</i></p> | Pleine eau, parasite de l'oursin <i>Meoma ventricosa</i> | Se nourrit d'épines et du tégument de l'oursin, diatomés | Possède une pré zoé, 3 stades zoé et un stade mégalope |
|  <p><i>Ocypode quadrata</i></p> | Vit dans des terriers en forme de J ou L en bord de plage | Nocturne, Omnivore principalement, charognard facultative, se nourrit de mollusques et d'animaux morts | Se reproduit de Février à Mai et d'Octobre à Novembre Possède 5 stades zoé, 1 stade mégalope |

| | | | |
|--|---|--|---|
|  <p>Crabes du genre <i>Cardisoma</i> (<i>Cardisoma guanhumi</i> en photo)</p> | <p>Vit dans les forêts ou marais dans de terrier profond et humide</p> | <p>Actif en fonction de l'ensoleillement peut être nocturne ou diurne, Herbivore, charognard facultatifs</p> | <p>Accouplement observé hors des terriers de Novembre à Février, ponte en eau de mer, selon la phase lunaire. Possède 5 stades zoés et 1 stade mégalo</p> |
|  <p><i>Ucidès cordatus</i></p> | <p>En arrière mangrove dans des terriers aux pieds des arbres</p> | <p>Diurne ou nocturne, se nourrit à partir du sédiment ou de la matière végétale</p> | <p>Reproduction en saison de pluie de Décembre à Avril. Ponte en eau de mer avant et à la Nouvelle lune/ Possède 6 stades zoés et 1 stade mégalo.</p> |
|  <p>Crabe du genre <i>Uca/Minuca</i> (<i>Minuca rapax</i> en photo)</p> | <p>En bord de mangrove dans des terriers</p> | <p>Diurne, s'alimente à partir du sédiment.</p> | <p>S'accouple dans les terriers tout au long de l'année. Ponte en eau de mer. Possède 4 à 6 stades + 1 mégalo zoés en fonction de l'espèce de crabe</p> |
|  <p><i>Aratus pisonii</i></p> | <p>Crabe arboricole vivant en mangrove sur les branches et racines de palétuviers</p> | <p>Omnivore, diurne</p> | <p>Reproduction toute l'année, Ponte à la pleine lune et à la nouvelle lune. Possède 4 stades zoés et 1 stade mégalo</p> |

3 La symbiose chez les crustacés

Les crustacés représentent les invertébrés marins les plus diversifiés (Siddall, 2004). Ils présentent une diversité importante en termes de formes, de couleurs et ont établi plusieurs façons de se nourrir, de se reproduire et de communiquer (Davie *et al.*, 2015 ; Baeza, 2015). Ils sont retrouvés dans les milieux tempérés, subtropical à tropical, dans les milieux polaires, dans les milieux côtiers peu profonds, dans les récifs, les milieux profonds, et très profonds. Aussi, leur implication dans des interactions symbiotiques est largement documentée dans la littérature. Selon Baeza (2015, revue), de nombreuses espèces de crustacés vivent en symbiose, au sens large du terme, avec d'autres invertébrés comme les éponges (Soledade *et al.*, 2017), les coraux (Castro, 1988), les mollusques, les échinodermes (Castro, 1971), et les ascidies (Baeza, 2015). Souvent dans ces symbioses, le crustacé sera le « symbiote » de la relation, c'est-à-dire l'organisme de plus petite taille. Ces interactions apportent au symbiote la protection contre le stress environnemental ou contre les ennemis naturels, ajouté à cela l'hôte représente une source de nourriture pour ces crustacés (Baeza, 2015).

Dans d'autres cas, la carapace des crustacés sert de substrat d'accueil pour de nombreux épibiontes. Des arthropodes, des polychètes ainsi que des cnidaires, des bactéries etc... peuvent coloniser la carapace des crustacés (Fernandez-Leborans, 2010, Overview). Les bactéries et les diatomées sécrètent des polysaccharides permettant l'adhésion aux surfaces. D'autres protozoaires ou de plus gros organismes sécrètent des glycoprotéines ou encore des mucopolysaccharides (Becker *et al.*, 2000).

Chez les crustacés des systèmes d'anti encrassement existent, permettant ainsi de se débarrassés d'autres organismes se développant sur leur carapace ou branchies. Chez le brachyoure *Geothelphusa dehaani* les soies sérulées présentes sur les épipodites des maxillipèdes sont responsable du nettoyage des phyllobranchies (Batang & Suzuki, 2003).

Les interactions dans lesquelles les crustacés sont hôtes sont plus rares, ou moins connues. Quelques cas d'interactions entre bactéries et crustacés sont décrits au niveau des sources hydrothermales, au niveau de récifs coralliens, et quelques associations sont décrites en milieu côtier (Apremont *et al.*, 2018 ; Lindquist *et al.*, 2005 ; Booth, 2018). Des crabes et des crevettes sont souvent associés à des épibiontes bactériens présents sur leur carapace ou céphalothorax, en général le rôle de ces associations reste encore flou, même si un rôle nutritionnel est soupçonné. Ces associations seront décrites dans un premier temps, ensuite

nous aborderons les symbioses chez les crustacés où les bactéries se développent sur les branchies.

3.1 La symbiose chez le modèle *Rimicaris exoculata*

Les premières symbioses décrites entre crustacés et bactéries, où l'hôte est le crustacé, concernent le plus souvent des organismes vivant au niveau des sources hydrothermales. Par ailleurs les groupes bactériens retrouvés chez les différents hôtes de sources hydrothermales sont souvent étroitement apparentés (Goffredi *et al.*, 2008 ; Petersen *et al.*, 2010 ; Methou *et al.*, 2022) même parfois avec ceux n'étant pas des crustacés, parmi eux l'escargot *Crysmallon squamiferum* (Goffredi *et al.*, 2004). Les bactéries associées sont chimiosynthétiques et souvent attachées à l'exosquelette de l'animal dans le cas des crustacés. La symbiose bactérienne chez l'espèce *R. exoculata* est l'interaction la mieux étudiée chez les crustacés. Les parties suivantes décriront ces associations et permettront la comparaison aux autres symbioses bactériennes chez les crustacés.

3.1.1 Anatomie de l'hôte

La crevette hydrothermale *Rimicaris exoculata* peut-être retrouvée jusqu'à 3 480m de profondeur au niveau de la dorsale Médio-Atlantique. Une communauté entière de ces crevettes formant des essaims très denses est présente autour des fumeurs noirs, qui relâchent un fluide très chaud, acide, riche en sulfure et en métaux. La crevette possède des caractères morphologiques avantageux pour l'accueil des symbiotes.

Elle présente une capacité à accueillir une grande quantité des bactéries en raison des modifications morphologiques de sa cavité branchiale et de certains appendices. En comparaison avec l'espèce non symbiotique *Alvinocaris makensis* se développant aussi au niveau des sources hydrothermales, Casanova *et al.*, (1993) décrit des pièces anatomiques beaucoup plus grandes chez *Rimicaris exoculata*. Les exopodites du premier maxillipède et de la maxille sont hypertrophiés et représentent 2/3 de la longueur de la carapace. Ces appendices sont recouverts de soies sur lesquelles se développent les bactéries. La carapace

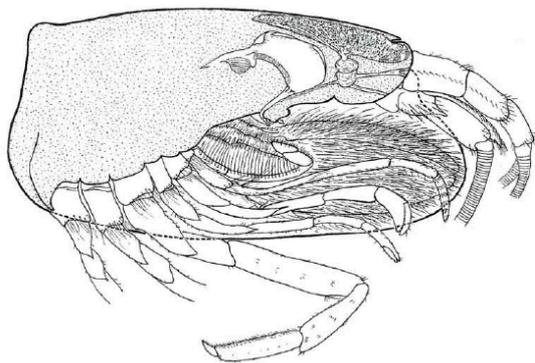


Figure 10. Morphologie du céphalothorax de *Rimicaris exoculata*, Segonzac 1993, Carapace agrandie recouvrant en partie les péréopodes et les pièces buccales.

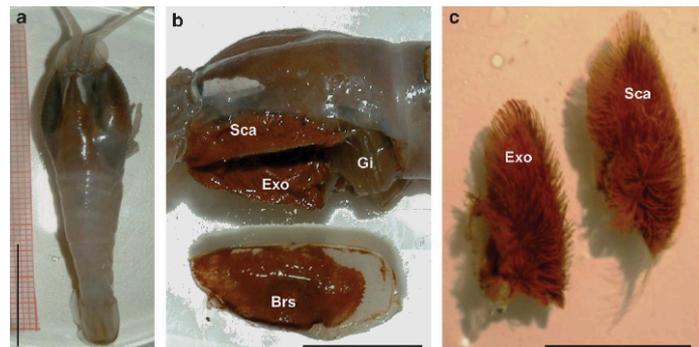


Figure 11 Planche anatomique de *R. exoculata*. a) Vue dorsale d'une crevette entière de l'espèce *Rimicaris exoculata*, échelle : 1cm b) Vue latérale de la carapace, avec la branchiostégite disséquée laissant apparaître la scaphognathite (Sca) et l'exopodite (Exo), échelle : 500 mm. c) L'exopodite et la scaphognathite disséqués montrant les soies sur lesquelles se trouvent les bactéries ainsi que des dépôts d'oxyde de fer, échelle : 100 µm. Ponsard *et al.* 2013

(branchiostégites) elle-même est aussi agrandie et couvre en partie les péréopodes, formant une vaste cavité branchiale (Fig.10) qui abrite également des bactéries symbiotiques principalement sur sa face interne et dans la région antérieure. Le mouvement des scaphognathites peut être responsable d'un développement moins important dans la région postérieure de la carapace.

Les bactéries se développent aux endroits protégés et alimentés par le courant d'eau généré par les scaphognathites des maxilles, ce qui représente un apport en composés chimiques provenant du milieu extérieur à l'hôte, dont se nourrissent les bactéries symbiotiques.

La région buccale de *R. exoculata* est réduite, certains éléments de la bouche sont réduits tels que les mandibules, les épines serrulées initialement présentes sur la maxille de la bouche ont disparu et le volume stomacal est réduit. Il y a de nombreuses différences anatomiques entre les espèces symbiotiques et les espèces proches non symbiotiques colonisant les sources hydrothermales. Ces modifications ont un lien direct avec la présence des symbiotes chez *R. exoculata*. Les cavités branchiales hypertrophiées représentent un support pour l'accueil

d'une grande quantité des bactéries diversifiées, et ces bactéries sont impliquées dans la nutrition de l'hôte, ce qui explique la diminution de la région buccale (Casanova *et al.*, 1993). L'auteur suggère qu'il pourrait y avoir des « échanges transcuticulaires » via l'hémolymphe servant à nourrir l'hôte (Casanova *et al.*, 1993), ceci a été confirmé par Ponsard *et al.*, (2013).

3.1.2 Communautés bactériennes de la cavité branchiale

Rimicaris exoculata possède une communauté bactérienne composée de bacilles de longueurs variables (Casanova *et al.*, 1993) et de bactéries filamenteuses de différentes épaisseurs. Zbinden *et al.*, (2008) a identifié trois types de filaments, deux fins et un épais. Seul un des morphotypes filamenteux accumule des granules dans les cellules. L'un des granules correspond à du fer et du phosphore et le second correspond à du soufre élémentaire et contient des traces de fer. L'autrice suggère que les granules servent de réservoirs d'énergie pour des composés comme le fer, le soufre ou le phosphore (Zbinden *et al.*, 2008). La communauté est diversifiée, on y retrouve des bactéries chimiotrophes des groupes Campylobacterota, Gamma-, Zeta-, Deltaproteobacteria, et des Desulfobulbaceae (Zbinden *et al.*, 2008 ; Zbinden & Cambon-Bonavita, 2020). Ces bactéries seraient capables d'utiliser le soufre, le méthane, ou le fer comme source pour produire de l'énergie (Zbinden *et al.*, 2008). Une couleur foncée voir noire (Gebruk *et al.*, 1993) ou plutôt marron couleur rouille peut être observée sur la carapace (fig.11). La variation de la couleur est due au processus de mue (Corbari *et al.*, 2008), après celle-ci la colonisation bactérienne se fait progressivement. Le développement de la communauté bactérienne entraîne aussi une accumulation graduelle de dépôts, les individus passe donc d'une couleur translucide puis à une couleur rouge foncé (rouille) enfin de processus (Zbinden et Cambon-Bonavita, 2020). Les bactéries chimiosynthétiques ferro-oxydantes participeraient en grande partie aux dépôts de fer dans la cavité branchiale (Corbari *et al.*, 2008). Dans cette cavité Zbinden *et al.*, (2004) ont identifié trois compartiments différents, la zone antéro-ventrale caractérisée par peu de dépôts et de bactéries (1, fig.12), la zone postérieure face aux branchies (2, fig.12) est caractérisée par une absence de dépôts, par ailleurs, les branchies sont aussi dépourvues de bactéries, enfin la zone antéro-dorsale est caractérisée par une croute dense de couleur rouille (oxyde de fer) et ainsi qu'à un tapis bactérien important (3, fig.12). Cette dernière forme un microenvironnement favorable à la formation des oxydes de fer par les bactéries (Zbinden *et al.*, 2004).

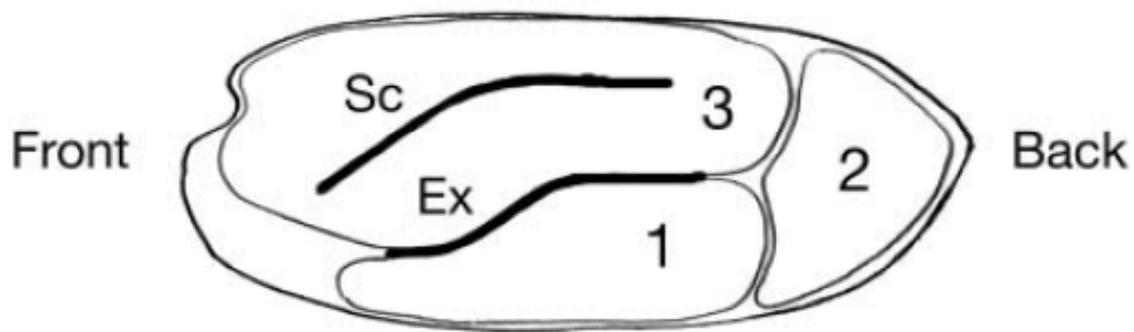


Figure 12. Schéma montrant les différents compartiments de la chambre branchiale abrité par les branchiostégistes. 1. Zone antéro-ventrale, 2. Zone postérieure face aux branchies. 3 Zone antéro-dorsale, Zbinden *et al.*, 2004.

3.1.3 Rôle hypothétique des symbiotes de la cavité branchiale

Gebruk *et al.*, 1993 ont émis l'hypothèse que les bactéries présentes chez les crevettes hydrothermales servaient de nourriture, et que la crevette les prélevait directement grâce à ses chélipèdes. Cette hypothèse a été réfutée par Zbinden *et al.* (2004), selon qui aucune trace de broutage ou grattage n'a été observée sur la communauté bactérienne. Au contraire, ils proposent que le rôle de nutrition des symbiotes passe par un transfert de matières organiques dissoutes à travers l'épiderme de la crevette. Cette théorie sera plus tard démontrée par Ponsard *et al.* (2013). Les expérimentations de marquages des crevettes hydrothermales et leurs bactéries associées au ^{14}C -bicarbonate, -acetate, ^{13}C -bicarbonate et ^3H -lysine ont démontré une forte incorporation par les bactéries ectosymbiotiques (Ponsard *et al.*, 2013). Les molécules marquées ont aussi été incorporées par les tissus tégumentaires de la crevette. Ces premiers résultats confirment la relation mutualiste entre la crevette et les symbiotes bactériens. L'activité chimiosynthétique de la communauté bactérienne permet ainsi le développement de la crevette, grâce au carbone transféré par les bactéries. En retour par leur nage et le mouvement de leurs scaphognathites, les crevettes assurent l'apport en composés chimiques (Ponsard *et al.*, 2013).

Les auteurs supposent que les Campylobacterota fixent le carbone via l'oxydation du soufre, comme les gamma-protéobactéries qui seraient aussi capables d'utiliser le méthane, les Deltaproteobacteria utiliseraient quant à elles l'hydrogène pour la réduction du sulfate.

Les filaments bactériens épais étaient marqués par toutes les molécules, ils ont montré un marquage plus important que les bactéries filamenteuses plus fines et les bactéries en forme

de bâtonnets. Les auteurs suggèrent que les bactéries seraient capables de s'adapter aux changements dans leur environnement en utilisant plusieurs voies métaboliques (Zbinden et Cambon-Bonavita, 2020)

3.2 La symbiose chez les autres espèces de crevettes du genre *Rimicaris*

Le genre *Rimicaris* comprend 10 espèces, parmi ces espèces seules 4 ont été décrites en associations avec des symbiotes : *R. exoculata*, *R. chacei* anciennement *Chorocaris chacei*, *R. hybisae* ainsi que *R. karei*.

R. hybisae est présente au niveau des sources hydrothermales de la dorsale Cayman dans le bassin des Caraïbes. Cette crevette présente des caractéristiques morphologiques similaires à *R. exoculata* et *R. chacei*. Elle diffère par la présence d'un organe dorsal à quatre lobes ainsi qu'une carapace hypertrophiée (Nye *et al.*, 2012).

Rimicaris chacei est présente au niveau des sources hydrothermales de la dorsale Médio-Atlantique cependant elle est en abondance moindre que son homologue *R. exoculata* (Apremont *et al.*, 2018). La symbiose étudiée chez *R. exoculata* est similaire à celle décrite chez *R. chacei*. *R. chacei* ne présente pas de céphalothorax hypertrophié comme observé chez *R. exoculata* et *R. hybisae* cependant les symbiotes sont présentes sur la partie interne du céphalothorax et dans les zones buccales, les soies appelées « bactériophores » sont aussi recouvertes de bactéries filamenteuses (Casanova *et al.*, 1993 ; Segonzac *et al.*, 1993 ; Apremont *et al.*, 2018). La surface interne des branchiostégites est moins importante que chez *R. exoculata*, de ce fait la crevette a une capacité d'accueil moins importante pour les symbiotes. Six morphotypes bactériens sont observés pour cette espèce : trois bactéries filamenteuses (un large, deux fins), deux en formes de bâtonnets (long et fin, petit et épais) et une bactérie en forme de coccobacille. Cette dernière correspond à une bactérie méthanotrophe selon Apremont *et al.*, (2018).

La communauté bactérienne retrouvée sur le céphalothorax est essentiellement composée de Campylobacterota et de Gammaproteobacteria, les bactéries sont aussi associées des dépôts d'oxyde de fer et de sulfures comme observé chez son homologue *R. exoculata* (Apremont *et al.*, 2018). Par ailleurs la communauté bactérienne chez *R. chacei* est étroitement reliée à la communauté bactérienne de *R. exoculata* (Apremont *et al.*, 2018). Tandis que *R. exoculata* repose entièrement sur l'activité de ses bactéries pour son

développement, *R. chacei* possèdent une morphologie qui suggère un régime mixotrophe (Apremont *et al.*, 2018). Les mandibules et chélipèdes sont de tailles normales (Casanova *et al.*, 1993), permettant les activités de collecte, de broyage, et d'ingestion. La présence de matières organiques a été reportée dans l'estomac (Casanova *et al.*, 1993 ; Segonzac *et al.*, 1993 ; Apremont *et al.*, 2018), par ailleurs le volume stomacal est plus important chez *R. chacei* ce qui laisse supposer une activité digestive plus importante (Casanova *et al.*, 1993). Tout de même, la présence des symbiotes sur les branchiostégites, qui présentent une fine cuticule à l'instar de *R. exoculata*, suggère le transfert de molécules organiques comme décrit chez *R. exoculata* (Apremont *et al.*, 2018 ; Ponsard *et al.*, 2013). Tous ces éléments suggèrent un régime mixotrophe pour *Rimicaris chacei*.

Les crevettes *R. hybisae* et *R. karei* présentent les mêmes caractéristiques que leurs homologues précédemment cités. Les bactéries se développent sur les branchiostégites et les scaphognatithes des crevettes du genre *Rimicaris*. Chez *R. hybisae* les bactéries sont impliquées dans la nutrition de l'hôte (Streit *et al.*, 2015). Chez *R. karei* étant donné les similitudes claires avec la symbiote de *R. exoculata*, Methou *et al.*, 2022 suggèrent que les symbiotes présents dans le céphalothorax pourraient être impliqués dans les mêmes processus métaboliques que les symbiotes de *R. exoculata* (Ponsard *et al.*, 2013).

3.3 Les galathées du genre *Kiwa*, connu sous le nom de « Crabe Yéti »

À ce jour quatre espèces ont été décrites en association avec des bactéries filamenteuses : *Kiwa hirsuta*, appelé le « Crabe Yéti » (Infra-ordre : Anomura) et *Kiwa puravida*, deux « crabes » de la famille des Kiwaidae. Les crustacés du genre *Kiwa* ne sont pas de vrais crabes, ce sont des galathées malgré leur surnom de « Crabe Yéti ». Contrairement aux crabes l'abdomen n'est pas comprimé dorso-ventralement mais est replié sous le thorax.

Kiwa hirsuta vit au niveau des sources hydrothermales de la dorsale Pacifique-Antarctique à 2228m de profondeur (Goffredi *et al.*, 2008). Le corps (carapace) de cette galathée est recouverte de nombreuses soies. Ces soies se composent de chitine (partie externe) et de protéine fibrillaire (partie interne). Sur la partie externe de ces soies sont attachées en nombre important des bactéries filamenteuses de différents diamètres. Les groupes bactériens dominants correspondent à des Campylobacterota, des Gammaproteobacteria ainsi que des Bacteroidota. *Kiwa hirsuta* possède une communauté bactérienne

chimiosynthétique capable de réaliser la fixation de carbone, cependant ceci n'a pas encore été démontré dans la littérature. Il se pourrait que la galathée cultive ces bactéries pour s'en nourrir.

Kiwa puravida a été collecté au niveau d'une source de méthane à 1000 m de profondeur dans le Pacifique-Est (Costa-Rica), il se développe dans un environnement différent de *K. hirsuta*. Tout de même, il est associé à des bactéries filamenteuses, elles sont retrouvées sur de nombreuses parties de son exosquelette, les chélicères (pinces), les péréopodes (pattes marcheuses), le sternum, les pièces buccales, la carapace abdominale postérieure ainsi que sur les antennes (Thurber *et al.*, 2011 ; Goffredi *et al.*, 2014). Les bactéries retrouvées correspondent à des Campylobacterota en majorité, des Delta-, Gammaproteobacteria ainsi que des Bacteroidota sont également présentes dans la communauté bactérienne du crabe (Thurber *et al.*, 2011). En fonction de la partie du corps colonisée par les bactéries, la diversité microbienne varie (Goffredi *et al.*, 2014), cela peut être dû au comportement de la galathée, ou encore aux facteurs physico-chimiques liés à l'environnement (Goffredi *et al.*, 2014 ; Petersen *et al.*, 2009).

Les Campylobacterota observées chez *K. puravida* sont similaires à celles retrouvées chez *R. exoculata* (Thurber *et al.*, 2011). Cette similarité entre bactéries de différent hôte pourrait être dû au fait que les symbiotes soient naturellement présents dans le milieu de vie de ces hôtes. Ils sont ubiquistes et colonisent les substrats qui sont disponibles (Szafranski *et al.*, 2015).

Thurber *et al.*, (2011) suggère que la galathée cultive les bactéries présentes sur ses pinces pour s'en nourrir. En effet aucun comportement de chasse, ou de prédation n'a été observé. Il agite ses pinces aux niveaux des rejets de méthane ce qui permettrait aux bactéries d'utiliser cette source pour se développer. En effet, l'analyse isotopique du carbone suggère que les bactéries utilisent le sulfure et possiblement le méthane comme source pour la production primaire et transfèrent le carbone produit aux galathées. L'analyse réalisée sur les acides gras des galathées suggère qu'elles consomment également les bactéries présentes sur leur carapace. Les bactéries seraient la source de nourriture principale de l'hôte, de plus la présence de bactérie dans l'estomac et dans la bouche a été reportée (Thurber *et al.*, 2011). Les soies spécialisées sur le 3^{ème} maxillipède (pièces buccales) tendent aussi à confirmer cette hypothèse. Ces soies appelées CRS (comb-row setae, comb-row = rangée de peigne)

permettent de gratter les bactéries présentes sur les différents appendices et de les transférer à la bouche (Thurber *et al.*, 2011).

Le mouvement des pinces permet l'accès à l'oxygène pour les bactéries et augmente ainsi leur activité. Cette interaction est qualifiée de mutualiste.

Les juvéniles de *Kiwa puravida* possèdent une communauté plus diverse que celle des adultes, tout de même toutes les bactéries qu'on retrouve chez l'adulte sont aussi présentes chez les juvéniles (Goffredi *et al.*, 2014). Des bactéries sont retrouvées sur les œufs, la diversité analysée est la plus grande observée parmi tous les stades de vie. La communauté de base retrouvée chez l'adulte est déjà présente, on observe un basculement entre l'abondance des Gammaproteobacteria (majoritaires chez les œufs) et les Campylobacterota (majoritaires chez les adultes). Ceci est également observé chez la crevette *R. exoculata* (Guri *et al.*, 2012 ; Goffredi *et al.*, 2014).

Une autre espèce du genre *Kiwa* est présente au niveau de la dorsale Scotia à l'Est (ESR, East Scotia Ridge) dans l'Océan Austral. Les crabes *Kiwa sp.* sont présents à 2 400m de profondeur, cette espèce est taxonomiquement très proche de *Kiwa hirsuta* présente sur la dorsale Pacifique-Antarctique. Les auteurs rapportent que deux types de soies recouvrent le corps de l'animal (Rogers *et al.*, 2012) et sont, elles aussi associées à des bactéries filamenteuses. La communauté est dominée par des Campylobacterota et des Gammaproteobacteria (Zwirgmaier *et al.*, 2014).

Cette découverte suggère que cette association est commune pour les crustacés du genre *Kiwa*.

Récemment des associations symbiotiques ont été décrites chez des crustacés de milieu côtiers, peu profonds. Ce sont des ectosymbiotes présents cette fois au niveau des branchies de plusieurs espèces de crabes brachyours et d'un homard. Ce phénomène a été observé chez des crabes de divers milieux et de diverses familles. Le rôle de ces associations est encore inconnu.

3.4 Le homard, Homarus gammarus et son association bactérienne sur les branchies
Homarus gammarus est un homard européen. Contrairement à *Rimicaris*, dans cette relation cette fois les bactéries sont présentes sur les branchies. A l'instar des crevettes hydrothermales, les branchies sont abritées dans le céphalothorax, protégées par les branchiostégites (Middlemiss *et al.*, 2015). Elles sont appelées trichobranhies et sont séparés

par des épipodites ; le filament branchial correspond à expansion de section ovale étant reliés à un axe central pour former la branchie [Fig.13] (Middlemiss *et al.*, 2015). Des soies serrulées sont également rattachées aux épipodites qui sont associés elles-mêmes aux péréiopodes et aux maxillipèdes (non montré sur la figure) (Middlemiss *et al.*, 2015).

Pendant les premières phases du développement larvaire, les branchies et les épipodites sont déjà présentes, dès le stade zoé I. A ce stade les épipodites ne sont pas encore entre les « filament branchiaux » (GF, gill filament) (Middlemiss *et al.*, 2015). La taille est relativement plus petite chez les adultes, de ce fait les branchies n'occupent pas encore toute la cavité branchiale (Middlemiss *et al.*, 2015). La taille augmentera progressivement au cours des différents stades. Au stade zoé III, les épipodites prendront place entre les filaments branchiaux comme chez l'adulte, c'est aussi à ce stade qu'apparaissent les soies serrulées associées. Après le passage au stade mégaloïde (stade III -> IV) la colonisation bactérienne

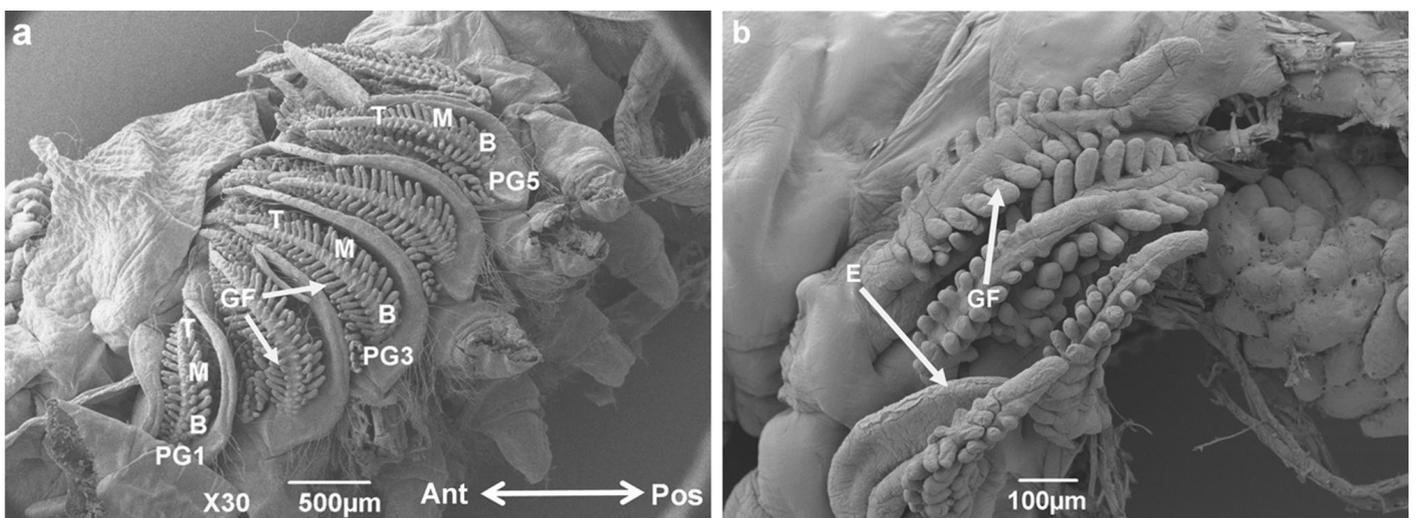


Figure 13. Trichobranchie d'*Homarus gammarus* au stade juvénile (a) et larvaire (b). E : Epipodite, GF : Filament branchial, PG : Podobranchie, T : Top, M : Milieu, B : Bas. (Middlemiss, *et al.*, 2015)

commence progressivement, à partir du 10^{ème} jour (Middlemiss *et al.*, 2015).

Des bactéries filamenteuses, en formes de bâtonnets ou des cocci sont présents sur les branchies du homard, les bactéries en forme de cocci étant majoritaires (Middlemiss *et al.*, 2015). Le passage du stade mégaloïde (stade IV) à juvénile (stade V) réduit à néant l'effort de colonisation bactérienne et donnera un hôte mué complètement aposymbiotique. Les auteurs affirment que les soies pourraient ralentir la colonisation bactérienne avant la prochaine mue. Les auteurs pensent que la prolifération des bactéries sur les branchies pourrait être néfaste pour le homard, et que cela serait un possible moyen pour l'hôte de contrôler la population bactérienne (Middlemiss *et al.*, 2015). Lors de l'étude de Middlemiss *et al.*, (2015),

seuls les larves et juvéniles ont été observés. Aucune analyse phylogénétique n'a été réalisée sur ces bactéries qui demeurent donc non identifiées.

Il se pourrait que les adultes présentent la même colonisation et que cette association ne soit pas aléatoire. Cependant c'est la seule étude relatant cette association sur l'espèce *Homarus gammarus*.

La colonisation des branchies par des bactéries a été recensée sur plusieurs espèces de crustacés d'eau peu profondes, notamment « le crabe chinois » ou « chinese mitten crab » ou encore certains crabes de la famille des Ocypodidae, Sesarmidae, Portunidae etc (Zhang *et al.*, 2016 ; Booth, 2018).

3.5 Le crabe à mitaines chinois et ses associations bactériennes

Eriocheir sinensis, crabe chinois à mitaines, est un crabe euryhalin, s'accouplant et réalisant sa période larvaire en eau salée (Rudnick *et al.*, 2005). C'est un brachyoure (Infra-ordre) appartenant à la Super-famille des Grapsoidea et à la famille des Varunidae (H. Milne Edwards, 1853). Ces crabes présentent une communauté bactérienne au niveau des branchies et de l'intestin (Zhang *et al.*, 2016). Les analyses phylogénétiques révèlent que les branchies sont dominées par les bactéries des groupes suivants : Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidota et Firmicutes (Zhang *et al.*, 2016). Le tube digestif présente une communauté différente, avec une majorité de Tenericutes, Bacteroidota, Proteobacteria, Firmicutes et CKC4. Les échantillons d'eau prélevés dans le milieu de vie de ces crabes sont dominés par des Proteobacteria, Bacteroidota, Actinobacteria et cyanobactéries (Zhang *et al.*, 2016). Certains groupes sont retrouvés à la fois dans les échantillons de branchies, d'intestins et d'eau environnementale, cependant leurs abondances y sont différentes, et chaque type d'échantillon possède une communauté spécifique (Zhang *et al.*, 2016).

L'étude de Ma *et al.*, (2021) a également démontré que les communautés bactériennes diffèrent davantage entre types de tissus analysés qu'en fonction du sexe des crabes, ou de leur régime alimentaire. La diversité microbienne étant plus importante dans l'eau que dans les branchies du crabe, il est suggéré que l'hôte « sélectionne » une communauté spécifique à partir des stocks de bactéries présents dans l'environnement (Zhang *et al.*, 2016). Ce phénomène a été observé chez les calamars (Nyholm *et al.*, 2000), ainsi que les amphibiens (Walke *et al.*, 2014). Les amphibiens possèdent un microbiote associé à leur peau, Walke *et*

al., (2014) suggèrent que l'amphibien sélectionne certaines bactéries rares de l'environnement pour constituer la communauté microbienne de sa peau. Ces études démontrent que l'établissement de la symbiose n'est pas aléatoire et dépend plus de l'hôte, l'environnement à une faible influence sur la composition de la communauté.

Ceci a également été observé chez les poissons, la communauté microbienne de l'intestin est corrélée à la phylogénie de l'hôte plutôt qu'à l'environnement (Roeselers *et al.*, 2011 ; Sullam *et al.*, 2012), et la communauté d'une même espèce peut rester similaire malgré des différences d'habitat (Sullam *et al.*, 2012).

4. Crabs de mangrove : Les ingénieurs de l'écosystème de mangrove associés à des bactéries symbiotiques

4.1 Roles des épibiontes sur la carapace du crabe de mangrove, *Leptuca thayeri*

Dans l'écosystème particulier de mangrove les crabes en règle générale ont une fonction essentielle, outre leur activité de fouille qui « renouvelle » les éléments essentiels, ils possèdent sur leur carapace une communauté bactérienne, qui fixe l'azote atmosphérique (N_2) (Zilius *et al.*, 2020). Les bactéries présentes sur la carapace réalisent toutes les voies métaboliques du cycle de l'azote [fig.14] (Zilius *et al.*, 2020).

Les processus principalement réalisés sont la fixation du diazote ainsi que l'oxydation d'ammonium/méthane, à part ces deux processus, les bactéries réalisent la réduction du nitrate en nitrite, la réduction/assimilation des nitrites en ammonium, des nitrites en oxyde nitrique, la réduction des oxydes nitriques en oxyde nitreux et l'oxyde nitreux réduit en

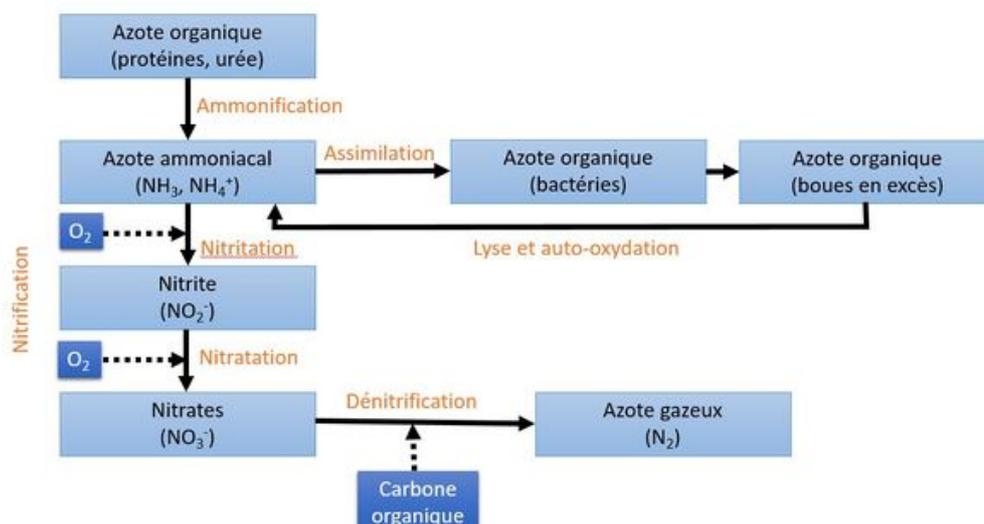


Figure 14. Cycle de l'azote

diazote (Zilius *et al.*, 2020). Les responsables de ces processus pourraient être les Alphaproteobacteria représentant 24% de la communauté de la carapace, les cyanobactéries représentant 20%, les Bacteroidota représentant 9%, les Actinobacteria 6% et les Chloroflexi et Gammaproteobacteria 2% chacun (Zilius *et al.*, 2020).

Les auteurs supposent l'existence d'une sélection des bactéries se développant sur la carapace qui pourraient provenir des parois des terriers des crabes (Zilius *et al.*, 2020). Le consortium de bactéries à la fois fixe le diazote atmosphérique et le libère dans le milieu, connu pour être pauvre en azote (Reef *et al.*, 2010). Les processus de nitrification sont limités (passage de l'ion ammonium jusqu'au nitrate) les bactéries nitrifiantes représentent une faible portion du biofilm (Zilius *et al.*, 2020). Les processus de dénitrification (passage des nitrates à l'azote atmosphériques) sont plus importants malgré les faibles concentrations de nitrate retrouvées dans le milieu (eau de l'environnement). Les auteurs supposent qu'il existe une forte compétition entre les dénitrificateurs et les autres bactéries pour l'utilisation de l'azote (Zilius *et al.*, 2020). Toutefois les auteurs suggèrent que le mix des processus d'assimilation et de dissimilation permettent de réduire les pertes d'azotes et alimente en conséquence un stock d'azote disponible sous forme dissoute et particulaire.

Ces réactions sont principalement réalisées dans des conditions pauvres en oxygène, la nitrogénase responsable de la fixation d'azote nécessitant des concentrations très faibles en oxygène. Les mouvements du crabe dans le sédiment qui peut être gorgé d'eau ou non, et les différences d'exposition à l'oxygène dans le milieu, n'empêchent pas la continuité des réactions (Marchant *et al.*, 2017).

Outre l'activité de leurs bactéries, les crabes excrètent de l'ammonium dans le milieu en tant que déchet du métabolisme. C'est un processus typique chez crustacés décapodes (Weihrauch *et al.*, 2017), toutefois dans ce cas de figure l'ammonium excrété pourrait être produit à 46% par les bactéries ammonifiantes de la carapace (Zilius *et al.*, 2020).

Cette activité a un grand impact dans l'écosystème de mangrove. L'azote étant un élément limitant dans cet écosystème les crabes permettent la biodisponibilité de cet élément dans le réseau trophique de la mangrove. Ils assimilent ou excrètent l'azote dans le milieu (Zilius *et al.*, 2020).

4.2 Symbiose chez les crabes de mangrove, une aide pour la terrestrialisation ?

Les travaux de Jenny Booth (2018) ont mis en lumière la présence de bactéries sur les branchies de plusieurs espèces de crabe de mangrove en Afrique du Sud et en Arabie Saoudite. Les familles étudiées comprennent les Dotillidae, Grapsidae, Ocypodidae, Portunidae et Sesarmidae. La communauté de la plupart des espèces de crabe étudiées est dominée par des Alphaproteobacteria et des Acidimicrobiia, cependant chaque espèce présente une communauté spécifique. Les bactéries sont en formes de bâtonnets et de cocci sur toutes espèces étudiées.

La spectroscopie de Raman a permis d'identifier des caroténoïdes sur les branchies des crabes associés aux bactéries. Les bactéries sont à l'origine de la production de ce composé chez les crabes (Booth, 2018), et seule une espèce, exclusivement marine ne montre pas la production de caroténoïdes. L'autrice suggère ainsi que la présence des bactéries sur l'organe lié à la respiration chez les crabes pourrait avoir un rôle contre le stress oxydatif et permettrait ainsi d'aider les crabes à la terrestrialisation, c'est à dire l'adaptation à un mode de vie terrestre et non aquatique.

Cette étude montre que la présence de bactéries chez sur les branchies des crabes est répandu, en effet les crabes terrestres, semi-terrestres/marins, et exclusivement marins sont concernés par cette association. De plus chaque espèce de crabe présente une communauté spécifique. Cependant les mêmes groupes bactériens y sont identifiés, suggérant ainsi une association non aléatoire qui est par ailleurs observée dans deux mangroves géographiquement distinctes en Afrique et en Asie. Cette association est encore très peu étudiée malgré le rôle important des crabes dans ce type d'écosystème.

Chapitre 2 : Objectifs et Méthodologie

Objectif de la thèse

L'objectif de la thèse était d'identifier si des associations entre crabes et bactéries existent dans les mangroves de Guadeloupe et si tel est le cas, de caractériser la relation de la façon la plus complète possible. Le premier objectif était de connaître la composition de la communauté bactérienne. Quels morphotypes bactériens qui s'y développent ? Quels groupes bactériens sont présents dans l'association. Ces communautés ont été comparées à ce qui a été observé précédemment en Afrique et en Asie. Un second objectif était de déterminer le mode de transmission des bactéries à la génération suivante par la mise en place d'un système de culture larvaire ainsi que par la collecte de larves directement dans le milieu naturel.

Enfin, nous avons aussi cherché à connaître les possibles échanges entre les crabes et leur bactéries associées.

L'ensemble de ces analyses ont été réalisées sur deux espèces de crabes principalement : *Aratus pisonii* et *Minuca rapax*, car d'un point de vue technique ce sont des crabes faciles à attraper et à manipuler, de plus ils sont abondants en mangrove et sont retrouvés dans le même périmètre. Par la suite, nous avons étendu la caractérisation à des espèces ayant différents styles de vie : terrestre, semi-marin/terrestre, marin. Un total de 13 espèces de crabes a été observé : *Aratus pisonii*, *Minuca rapax*, *Ocypode quadrata*, *Eurytium limosum*, *Ucides cordatus*, *Gecarcinus lateralis*, *Cardisoma guanhumi*, *Dissodactylus primitivus*, *Percnon gibbesi*, *Stenorhynchus seticornis*, *Callinectes sapidus*, *Callinectes sp.*, et un crabe que l'on n'a pas identifié appartenant à la famille des Mythracidae.

Les chapitres 3 et 4 porteront sur la caractérisation de la symbiose chez les espèces *A. pisonii* et *M. rapax*, nous avons étudié la communauté bactérienne des branchies et nous avons déterminé le mode de transmission des symbiotes pour ces deux espèces. Afin d'approfondir nos connaissances sur cette association, dans le chapitre 5 nous nous sommes tournés vers l'identification des métabolites secondaires retrouvés chez quatre espèces venant de biotopes différents *A. pisonii*, *M. rapax*, *U. cordatus*, et *P. gibbesi*. Enfin, le chapitre 6 étant la recherche autres crabes de Guadeloupe concernant la composition de la communauté bactérienne d'un point de vue ultrastructural et phylogénétique.

L'ensemble de ces travaux constitue la première étude des associations entre crabes de mangrove et bactéries dans la zone Caraïbe.

Une approche pluri-disciplinaire de l'exploration des symbioses

L'étude des symbioses s'appuie sur diverses techniques de laboratoire. Pour caractériser une symbiose d'un point de vue morphologique, ce sont des techniques de microscopie électronique qui sont utilisées. Au de-là des informations sur la morphologie obtenue par le microscope électronique à balayage (MEB ou SEM en anglais), ce type d'équipement associé à des accessoires tel que l'EDX (energy-dispersive X-ray) peut permettre de connaître la composition chimique, la structure cristalline et le comportement électrique à la surface d'un échantillon (Vernon-Parry, 2000). Plusieurs auteurs ont utilisé la microscopie électronique à balayage pour étudier la crevette *Rimicaris exoculata*. Après dissection des branchiostégites (cuticules) et des parties de la bouche, l'observation au MEB a permis de voir la colonisation des bactéries sur ces pièces et l'ampleur de la colonisation (tapis bactérien, patch de bactéries). Cela a aussi permis de distinguer les morphotypes présents et de caractériser les dépôts de minéraux qui y sont associés (Zbinden *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 2010). Zbinden *et al.*, (2004) a aussi utilisé la microscopie électronique à transmission, cette technique s'utilise sur des coupes ultra fines du tissu (incluse en résine) que l'on veut observer. Dans l'étude de Gloter *et al.*, 2003, le microscope électronique à transmission (MET ou TEM en anglais) a été utilisé pour étudier les minéraux associés à la crevette *R. exoculata*, la technique utilisée est nommée : Electron Energy Loss Spectroscopy (EELS). Dans d'autres études, l'utilisation du MET a permis de savoir que la symbiose est interne (endosymbiose) ou externe (ectosymbiose/épibiose), et intra- ou extracellulaire. Par exemple dans l'étude de Gros & Gaill (2007), l'utilisation du MET a permis de définir la symbiose entre des moules du genre *Idas* (Mytilidae) et des bactéries ; sur les clichés les bactéries sont présentes entre les microvisosillés des cellules épithéliales mais ne sont pas dans les cellules (Gros *et al.*, 2007). Elle est définie comme étant une symbiose extracellulaire ou mésosymbiose. Dans l'étude de Mira & Moran (2002) le TEM tend à confirmer la transmission verticale des symbiotes de *Acyrtosiphon pisum* à la génération suivante. Les symbiotes sont présents dans les bactériocytes de l'embryon ainsi que dans les œufs. Ces techniques apportent donc des

informations concernant la caractérisation d'une symbiose. Cependant ces informations concernent uniquement l'ultrastructure de l'association, la microscopie ne permet pas d'identifier les bactéries ou de caractériser les échanges entre l'hôte et le symbiote.

Pour ce faire il faudra avoir recours à d'autres techniques. Pour identifier les membres de la communauté bactérienne colonisant un hôte les auteurs peuvent avoir recours à l'analyse par métabarcoding basée sur le séquençage à haut débit et l'analyse comparative d'un gène marqueur bactérien, celui codant pour l'ARNr 16S. Ceci permet d'identifier tous les organismes bactériens présents dans un échantillon. Cela permet de savoir si l'hôte est colonisé par un ou plusieurs symbiotes. Cette technique a été utilisée sur les crustacés associés à des bâtonnets et/ou à des bactéries filamenteuses, permettant de savoir que l'hôte est colonisé par différents groupes de bactéries, réalisant des fonctions métaboliques différentes (Zhang *et al.*, 2016; Methou *et al.*, 2022). Par exemple chez *Rimicaris exoculata*, les gammaprotéobactéries sont les méthanotrophes de la communauté bactérienne (Zbinden *et al.*, 2008). Cette technique permet d'identifier des taxons bactériens éventuellement associés à des groupes fonctionnels mais ne prouve pas que les interactions métaboliques ont effectivement lieu. Ce n'est pas suffisant pour savoir quels échanges existent entre les organismes en symbiose. Pour analyser cet aspect de la symbiose, des techniques de marquages isotopiques peuvent permettre de savoir si le symbiote transfère des éléments à l'hôte, ceci a été démontré dans l'étude de (Ponsard *et al.*, 2013). Dans cette étude le ^{13}C , ^{14}C et le ^3H sont utilisés pour repérer l'intégration par les symbiotes et le transfert à l'hôte. Dans l'étude de (Streit *et al.*, 2015) le marquage isotopique a permis d'identifier les différentes sources de carbone transférées à la crevette. Les résultats montrent que les acides gras retrouvés dans les tissus de la crevette *R. hybisae* correspondent aux acides gras des bactéries symbiotiques associées aux crevettes, une petite fraction d'acides gras identifiés serait d'origine photosynthétique. L'utilisation des isotopes ici avait pour but d'identifier l'alimentation de *R. hybisae* et plus généralement de savoir si les symbiotes participent au développement de l'hôte (Ponsard *et al.*, 2013; Streit *et al.*, 2015). Cependant dans les symbioses où la bactérie confère une protection à l'hôte, ce type d'analyse est inadéquate. Dans le cas de la *A. pisum*, la bactérie *Hamiltonella defensa* confère une protection contre certains parasites (guêpes) [McLean & Godfray, 2015]. Dans ce type de cas l'hôte est traité avec des antibiotiques dans le but de supprimer le symbiote, par la suite les effets du parasite sont observés et comparés entre l'hôte dépourvu de son symbiote et l'hôte avec son

symbiote. Cette technique permet simplement de savoir que le symbiote agit sur les parasites cependant les substances qui agissent sur le parasite ne peuvent pas être identifiées de cette façon. Pour répondre à ces interrogations sur la nature des échanges, des techniques de métabolomique peuvent être employées. Cela consiste à identifier en masse les métabolites d'un échantillon biologique. Les métabolites découlent des réactions chimiques qui ont eu lieu dans un organisme (Jobard *et al.*, 2010). Cela permet donc de savoir ce qui est produit dans le complexe biologique analysé. Dans l'étude de Koehler *et al.*, (2013) des techniques de métabolomiques ont été testées sur les cocons des guêpes *Philanthus triangulus*, ceci a permis de voir la variation de la quantité d'antibiotiques sur les cocons au cours du temps. Les auteurs en ont déduit que les antibiotiques sont sécrétés pendant 2 semaines après la création du cocon et résistent plusieurs mois à la surface de ceux-ci, ce qui a un impact positif sur la survie des larves. La métabolomique peut aussi permettre de caractériser une interaction symbiotique. Cependant dans la plupart des cas lorsqu'un complexe de plusieurs organismes est étudié via la métabolomique, la technique ne permet d'identifier que les composés, sans pouvoir nécessairement établir quel organisme est à l'origine de la production des métabolites identifiés, d'autant que certains métabolites pourraient être acquis dans l'environnement auquel est exposé l'échantillon testé.

Ces différentes approches, allant de la microscopie à la biologie moléculaire et à l'analyse métabolomique, ont été appliquées aux crabes de mangrove pour caractériser leurs associations symbiotiques.

Matériels et Méthodes

1. Caractérisation des communautés bactériennes

*1.1 Collecte des espèces *Aratus pisonii* & *Minuca rapax**

Trente individus adultes de chaque espèce ont été récoltés manuellement pendant une année entière. 12 femelles et 18 males de l'espèce *A. pisonii* (longueur de carapace, [CL] = $21,48 \pm 3,4$ mm) ainsi que 9 femelles et 21 males de l'espèce *M. rapax* (longueur de carapace, [CL] = $20 \pm 1,4$ mm). Les crabes ont été collectés en bordure de la mangrove, sur le sédiment entre les racines des palétuviers rouges (*Rhizophora mangle*) pour l'espèce *M. rapax*, et directement

sur les branches ou/et racines des palétuviers rouges. Les échantillons ont été collectés sur deux sites principaux "Manche à Eau" et "Rivière Salée" (situés à 16°16'22°N/61°33'22°W" et 16°15'11°N/61°32'58°W), et trois sites secondaires ("Canal des Rotours" : 16°21'12°N/61°29'34°W, "Marina du Gosier" : 16°13'06°N/61°31'20°W, et "Sablière" 16°14'2°N/61°33'06°W). Les dissections ont été réalisées au laboratoire, après une anesthésie à froid, en utilisant des pinces pour ouvrir la carapace. Les filaments branchiaux ont été récupérés dans la cavité branchiale, et placés soit directement dans la solution fixatrice, soit utilisés pour l'extraction d'ADN.

Conformément à l'article 17, paragraphe 2, du Protocole de Nagoya sur l'accès et le partage des avantages, un permis d'échantillonnage a été délivré et publié sous le numéro APA 2298730.

Sur le site « Manche à Eau » des juvéniles de chaque espèce ont été capturés à main nue sur le sédiment.

Sur le site « Manche à Eau » plusieurs stades de larves zoés ont été récoltés avec un filet à plancton d'une maille de 200µm passé près des racines de mangrove depuis un petit bateau à 2 nœuds. La collection a été réalisée pendant la période de ponte d'*Aratus pisonii*, les larves ont été triées en fonction de taille de leur carapace, du rostre et de l'épine dorsale.

Parmi les adultes collectés, les femelles grainées des espèces d'*A. pisonii* et de *M. rapax* ont été mises dans un bac à sec avec un accès à de l'eau de mer pour encourager la ponte. Les femelles pondent au cours de la nuit suivant la capture et les larves zoés sont récupérées et sont placées en culture.

Toujours sur le site « Manche à Eau » des échantillons d'eau de terrier de l'espèce *M. rapax* et de surface de palétuvier *Rhizophora mangle* ont été collectés.

1.1.2 Culture de larves d'*Aratus pisonii* et de *M. rapax*

Des femelles des deux espèces ont été récupérées sur le terrain à deux périodes différentes et mises dans un système pour induire la ponte. Les femelles sont dans un bac à sec, avec un accès à de l'eau douce et avec un accès à l'eau de mer pour la ponte. Les femelles pondent la nuit suivant leur capture. Les larves sont récupérées à l'aide de seringues de 50mL et sont placées dans un cylindroconique contenant 4L d'eau de mer à une salinité de 34.6 g.L⁻¹. L'eau

de mer est filtrée à 1,2 μm et est doucement oxygénée. Elle est changée tous les jours et les larves zoés sont nourries avec des *Artemia nauplii*, tous les deux jours.

1.2 Collectes des espèces Cardisoma guanhumi, Ucides cordatus, Gecarcinus lateralis, Ocypode quadrata, Pecnon gibbesi, Dissodactylus primitivus...

De nombreux crabes ont été collectés manuellement pendant 2 ans dans différents biotopes (fig.15). Au total 14 espèces ont été collectées et observées. Tous les crabes étudiés font partie du groupe des Brachyours et possèdent donc des branchies du type phyllobranchies. Environ 5 individus par espèces ont été collectés. Les branchies ont été extraites de la cavité branchiale après un passage au froid en guise d'anesthésie. Les branchies ont été utilisées pour de l'extraction d'ADN ainsi que pour les observations au microscope électronique à balayage. Toutes les espèces (au minimum 3 individus par espèces) ont été observées au Microscope Électronique à Balayage (MEB), certaines ont été envoyées pour une analyse métabarcoding de la région variable V4-V5 du gène codant pour l'ARNr 16s. Pour l'analyse métabarcoding l'ADN de deux individus par espèce a été envoyé.

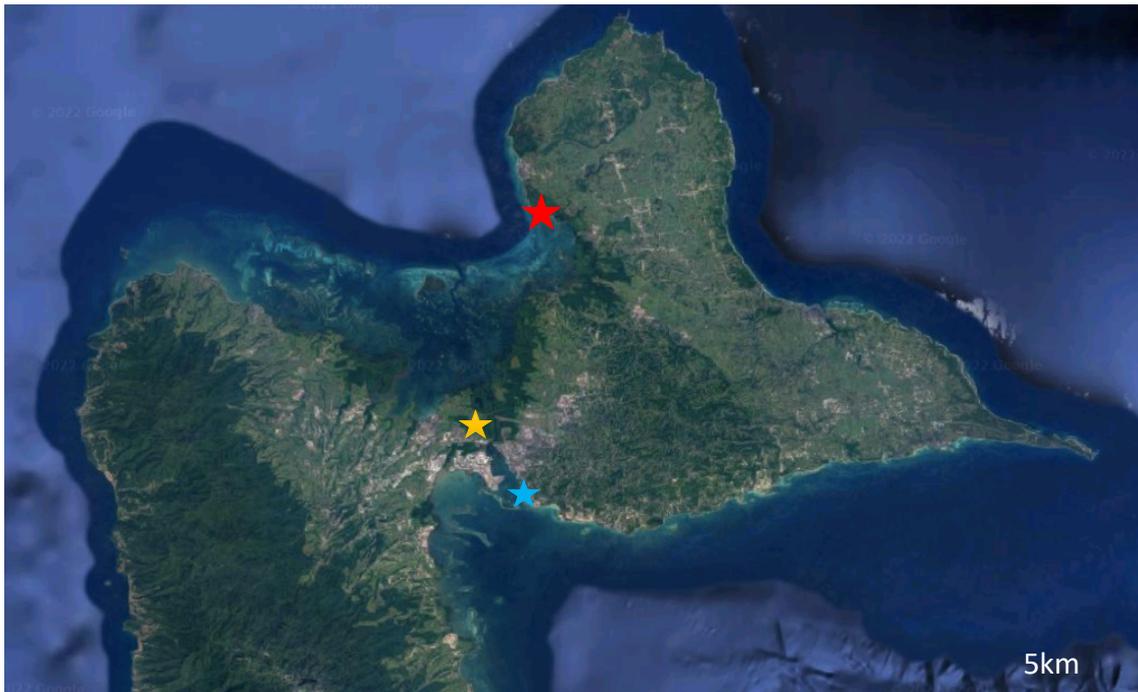


Figure15. Carte de la Guadeloupe montrant les sites de récolte. Etoile rouge : Port-Louis, étoile jaune : Manche-à-Eau, étoile bleu : La marina

Tableau 2. Récapitulatif des techniques utilisées sur chaque espèce

| Espèces observé | Famille | Type de crabe | Biotope | Type d'analyse réalisé |
|---------------------|--------------|---------------|-------------|-------------------------|
| <i>C. guanhumii</i> | Gecarcinidae | Terrestre | Marais | MEB, ★ Métabarcoding |
| <i>G. lateralis</i> | Gecarcinidae | Terrestre | Plage | ★ MEB |
| <i>U. cordatus</i> | Ocypodidae | Terrestre | Mangrove | MEB, ★ Métabarcoding |
| <i>E. limosum</i> | Panopeidae | Semi-marin | Mangrove | MEB, ★ Métabarcoding |
| <i>A. pisonii</i> | Sesamidae | Semi-marin | Mangrove | MEB, ★ Métabarcoding |
| <i>G. cruentata</i> | Grapsidae | Semi-marin | Bord de mer | ★ MEB |

| | | | | |
|------------------------|---------------|------------|-------------|-------------------------|
| <i>M. rapax</i> | Ocypodidae | Semi-marin | Mangrove | MEB, ★ Métabarcoding |
| <i>O. quadrata</i> | Ocypodidae | Semi-marin | Plage | MEB, ★ Métabarcoding |
| <i>Callinectes sp.</i> | Portunidae | Marin | Sargasse | ★ MEB |
| <i>C. sapidus</i> | Portunidae | Marin | Bord de mer | ★ MEB |
| <i>D. primitivus</i> | Pinnotheridae | Marin | Mer | MEB ★ Métabarcoding |
| <i>P. gibbesi</i> | Percnidae | Marin | Mer | ★ MEB |
| <i>S. seticornis</i> | Inachoididae | Marin | Mer | ★ MEB |
| Crabe inconnu | NA | Marin | Mer | ★ MEB |

2. Préparation des échantillons pour l'observation au microscope électronique à balayage.

Après la dissection, les branchies récupérées ont été fixées dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% et de PBS à 0,8x (320 mOsm) à 4°C (pH 7,2). Par la suite les échantillons sont déshydratés dans des solutions de concentration croissante d'acétone (30°, 50°, 70°, 95° et trois fois 100°). Les échantillons sont passés ensuite au point critique, cette étape est réalisée à 31°C et 74 bars, elle consiste à passer de l'acétone liquide au CO₂ liquide puis gazeux pour obtenir des échantillons secs en évitant les problèmes de tension superficielle. Ensuite ces échantillons sont recouverts d'or par pulvérisation cathodique avant d'être observés au microscope électronique à balayage FEI Quanta 250 à 20 kV.

3. Préparation des échantillons pour l'observation au microscope électronique à transmission.

Cette manipulation n'a été réalisée que sur les espèces d'*A. pisonii* et *M. rapax*.

Après la dissection, les branchies sont préfixées pendant 1 heure à 4°C dans du glutaraldéhyde à 2,5 % et de solution saline tampon phosphat (Phosphate Buffered Saline) à 0,8x (pH 7,2). Les branchies sont ensuite rincées et fixées à température ambiante pendant 45 minutes dans du tétroxyde d'osmium à 1% et du PBS à 0,8x. La suite de la fixation est réalisée dans une solution aqueuse d'acétate d'uranyle à température ambiante pendant 1 heure. Ensuite, les branchies ont été imprégnées de résine London-Resin White (LR white). Des sections ultrafines (60nm d'épaisseur) ont été réalisées au couteau en diamant et observées au microscope à transmission (TEM) Tecnai G20 (FEI) à 200kV. Un total de 30 spécimens de chaque espèce (*A. pisonii* et *M. rapax*) a été analysés au microscope électronique à transmission.

4. Extraction d'ADN et analyse PCR

L'extraction d'ADN a été réalisée sur deux individus par espèce pour chaque espèce ou échantillons. L'ADN a été extrait à partir des branchies de toutes les espèces. Pour les espèces *A. pisonii* et *M. rapax* l'ADN a aussi été extrait à partir des branchies de juvéniles, de gonades, d'œufs, des larves élevées en laboratoire et de larves sauvages. L'ADN a aussi été extrait à partir d'eau de terrier de *M. rapax* et de surface de *Rhizophora mangle* (palétuvier) où se développe l'adulte *A. pisonii*. L'objectif premier était de savoir s'il y avait présence d'ADN bactérien dans ces échantillons. Plusieurs jeux d'amorces ont été utilisés (tab2.3) sur les échantillons des espèces *A. pisonii* et *M. rapax* : des amorces universelles ciblant les bactéries (8F-1492R) et des amorces ciblant des groupes de bactéries retrouvés chez les adultes de *A. pisonii* et *M. rapax* (8F-CFB563R, 8F-ROS537R) ont été utilisées sur les échantillons de branchies de juvéniles, les gonades, les œufs et les larves uniquement. Ces amorces cibles les groupes Roseobacter (ROS537), [Eilers *et al.*, 2001] et Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB563) [Weller *et al.*, 2000].

Les échantillons montrant un résultat positif à la PCR ciblant les bactéries avec des amorces universelles (8F-1492R) ont par la suite ont été employés pour une analyse métabarcoding. Les échantillons positifs ont été utilisés pour produire un produit PCR destiné au séquençage de la communauté bactérienne associée. Les amorces universelles 515F 'GTGYCAGCMGCCGCGGTAA (V4) et 926R 'CCGYCAATTYMTTTRAGTTT V5 (Parada *et al.*, 2016) ont été utilisées pour amplifier la région V4-V5 du gène codant pour l'ARNr 16S.

Le second objectif était de connaître la composition de la communauté bactérienne des adultes de toutes les espèces de crabes, ainsi que la composition de la communauté

bactérienne des juvéniles de *A. pisonii* et *M. rapax*. Le troisième objectif était d'identifier le mode de transmission des symbiotes de *A. pisonii* et *M. rapax* en recherchant les bactéries des adultes/juvénile dans les échantillons de gamètes, de larves et dans les échantillons environnementaux.

Tableau 3. Séquence des jeux d'amorces utilisées.

| | Séquence | Protocole PCR utilisé | Références |
|--------|-------------------------|--|--------------------------------|
| 8F | 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | Dénaturation à 94°C pendant 4 min, 30 cycles à 94°C pendant 1 min, à 52°C pendant 45s, et 72°C pendant 1.5 min, et élongation 7 min à 72°C pour 8F-1492R. | (Edwards <i>et al.</i> , 1989) |
| 1492R | 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT | Dénaturation à 94°C pendant 4 min, 30 cycles à 94°C pendant 1 min, à 52°C pendant 45s, and 72°C pendant 1.5 min, et élongation 7 min à 72°C pour 8F-1492R. | (Goodfellow & O'Donnell, 1993) |
| CFB563 | 5' -GGACCCTTTAAACCCAAT | Dénaturation à 94°C pendant 4 min, 30 cycles at 94°C pendant 1 min, à 52°C pendant 45s, et 72°C pendant 1.5 min, et élongation 7 min at 72°C pour 8F-CFB563. | (Weller <i>et al.</i> , 2000) |
| ROS537 | 5'- CAACGCTAACCCCTCC | Dénaturation at 94°C pendant 4 min, 30 cycles à 94°C pendant 1 min, à 52°C pendant 45s, et 72°C pendant 1.5 min, et élongation 7 min à 72°C pour 8F-ROS537. | (Eilers <i>et al.</i> , 2001) |

5. Analyse métabarcoding par séquençage massif de la région V4-V5 du gène codant l'ARNr 16S bactérien

5.1 *Aratus pisonii* & *Minuca rapax*

La PCR utilisant des amorces universelles pour amplifier la région V4-V5 du gène codant pour l'ARNr 16S a été réalisée comme décrit dans Duperron *et al.*, (2019). Un fragment de ~400 pb du gène codant pour l'ARNr correspondant à la région variable V4-V5 d'*Escherichia coli* a été amplifié à l'aide des amorces 515F et 926R (Parada *et al.*, 2016) et séquençé sur une plateforme Illumina MiSeq (2 X 300 pb, séquençage en paires, Genoscreen, France).

L'analyse des séquences a été effectuée à l'aide de QIIME2 (Hall & Beiko, 2018). Les variants de séquence d'amplicon (ASV, Callahan *et al.*, 2017) ont été identifiés à l'aide de DEBLUR (Amir

et al., 2017) en utilisant les paramètres par défaut, c'est-à-dire une probabilité maximale pour les indels de 0,01 et un taux d'erreur de lecture moyen de 0,5 % pour la normalisation. Les séquences chimériques ont été identifiées à l'aide de UCHIME (détection de chimères *de novo*), puis supprimées (Edgar *et al.*, 2011). Les affiliations taxonomiques ont été obtenues par le classificateur basé sur sklearn (GreenGenes 13-8-99 release). Les séquences correspondant à "Eukaryota", "Chloroplast" et "Mitochondria" ont été écartées. Les diagrammes de Venn ont été dessinés à l'aide du logiciel en ligne disponible sur <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>.

5.2 Les autres espèces de crabes, les juvéniles d'*A. pisonii* et *M. rapax* et les échantillons environnementaux.

L'ADN de deux individus adultes par espèce, pour lesquels la présence de bactéries a été préalablement vérifiée par MEB, a été extrait des branchies à l'aide du kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Puis, nous avons procédé de la même façon que pour les échantillons cités précédemment dans la partie 5.1

L'analyse des séquences a été réalisée à l'aide de QIIME2 (Hall & Beiko, 2018). Les variants de séquence d'amplicon (ASV, Callahan *et al.*, 2017) ont été identifiés à l'aide de DADA2 en utilisant les paramètres par défaut, c'est-à-dire une probabilité maximale pour les indels de 0,01 et un taux d'erreur de lecture moyen de 0,5 % pour la normalisation. DADA2 est également utilisé pour identifier et supprimer les séquences chimériques. Les affiliations taxonomiques ont été obtenues par le classificateur basé sur sklearn (version Silva 13-2-99).

6. Analyses phylogénétiques des ASV dominants

6.1 *Aratus pisonii* & *Minuca rapax*

Pour chacun des jeux de données, le pourcentage utilisés pour caractériser les ASV comme étant dominantes varie en fonction des espèces et des résultats obtenus issu de l'analyse avec Qiime2.

Pour les adultes de *Aratus pisonii* et *Minuca rapax*, un jeu de données comprenant les séquences des ASV dominantes, leurs séquences les plus similaires selon BLAST, et des séquences représentatives des clades bactériens pertinents (Alphaproteobacteria,

Actinobacteria et Bacteroidetes) ont été assemblés. Les séquences ont été alignées à l'aide de MUSCLE (358 positions nucléotidiques), et l'alignement a été vérifié visuellement. Les relations phylogénétiques ont été déduites en utilisant une approche de maximum de vraisemblance.

Concernant les autres espèces, un jeu de données comprenant les séquences des ASV dominantes ont été blasté afin de connaître le pourcentage de similarité avec des séquences existantes dans la base de données NCBI. Par la suite, les communautés bactériennes de chaque échantillon ont été comparées grâce à un diagramme de venn afin de savoir si certaines ASV sont partagées entre familles ou espèces, ou si elles ne sont retrouvées que chez une espèce en particulier

7. Analyse métabolomique

Nous avons collecté 4 espèces différentes, *A. pisonii* et *M. rapax*, deux crabes semi-marins de mangrove, *U. cordatus*, un crabe terrestre vivant en arrière mangrove et enfin *P. gibbesi* retrouvé dans les récifs coralliens.

Pour chaque espèce nous avons disséqué et lyophilisé 0,9g de branchie que nous avons ensuite envoyé à un laboratoire au Canada pour réaliser l'analyse métabolomique.

**Chapitre 3 : Caractérisation des
ectosymbiotes bactériens colonisant les
branchies de deux crabes de Mangrove.**

Synthèse du chapitre 3 : Caractérisation des ectosymbiotes bactériens colonisant les branchies de deux crabes de Mangrove.

Dans le milieu marin, de nombreuses études décrivent des associations symbiotiques entre divers hôtes (coraux, éponges, annélides, nématodes, mollusques...) et des bactéries le plus souvent phototrophes ou chimiosynthétiques (Dubilier *et al.*, 2008). Dans l'écosystème particulier de la mangrove qui possède une riche diversité spécifique, quelques associations sont décrites chez des bivalves Lucinidae associés au sédiment réduit, chez des nématodes ou encore des méduses (Rützler & Feller 1988 ; Brissac *et al.*, 2011). Récemment quelques études ont fait état de la présence de bactéries symbiotiques chez diverses familles de crabes (Dotillidae, Grapsidae, Ocypodidae, Portunidae et Sesamidae) dont certaines présentes en mangrove (Booth, 2018). Les crabes sont des organismes importants dans l'écosystème de mangrove en raison de leur activité de bioturbation. En effet, ils participent au recyclage de la matière organique, de l'azote et réduisent la salinité des sols. Cette activité a un impact positif sur la productivité de la mangrove (Kristensen 2008 ; Smith *et al.*, 2009 ; Zilius *et al.*, 2020)

En général, les crustacés représentent le groupe le moins documenté en termes de symbiose où le crustacé est l'hôte de l'association. Dans le cas des crabes côtiers, des bacilles et des coques sont présentes au niveau des lamelles branchiales des crabes, et la communauté est essentiellement composée d'Alphaproteobacteria et d'Acidiimicrobia (Booth, 2018). Deux autres associations ont été décrites chez des crabes de sources hydrothermales de la famille des Kiwadae et Galatheidae (Goffredi *et al.*, 2008 ; Tsuchida *et al.*, 2011). Les bactéries sont présentes sur la face externe de la carapace de l'animal, ce sont des bactéries filamenteuses appartenant aux groupes des Campylobacterota et Gammaproteobacteria (Goffredi *et al.*, 2008 ; Tsuchida *et al.*, 2011). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à deux espèces de crabes vivant en Guadeloupe. *Aratus pisonii*, un crabe arboricole vivant sur les branches et racines des palétuviers rouges et *Minuca rapax* un crabe vivant et creusant des terriers dans le sol de mangrove.

Les buts de cette étude étaient : (i) montrer la présence des bactéries chez ces deux espèces par des techniques de microscopies électroniques, (ii) de caractériser la composition de la communauté bactérienne associée aux branchies par analyse métabarcoding.

Pour ce faire, une trentaine d'individus adultes de chaque espèce ont été collectés manuellement sur les branches ou sur le sédiment au cours d'une année. Les individus ont été récoltés sur cinq sites différents : la Rivière Salée, la Manche à Eau, le Canal des Rotours, la Sablière et la Marina du Gosier. Les branchies sont extraites de la cavité branchiale après une anesthésie à froid à -20 °C pendant 5 minutes et sont préparées pour l'observation au microscope électronique à balayage et à transmission. En parallèle, l'autre partie des branchies est utilisée pour une extraction d'ADN suivi d'une identification de la communauté bactérienne par analyse métabarcoding. L'outil bioinformatique QIIME2 a permis d'obtenir les « Amplicon Sequence Variants » ou ASV de chaque échantillon.

La caractérisation par la microscopie électronique à transmission a permis de savoir que les bactéries ne sont pas présentes à l'intérieur des tissus branchiaux des crabes, mais seulement à la surface des lamelles branchiales. La microscopie électronique à balayage a montré des patches ou des tapis de bactéries en formes de coques ou de bacilles. Quatre morphotypes différents ont été observés sur les lamelles branchiales d'*A. pisonii* et *M. rapax*. Ils se différencient essentiellement par leur longueur et épaisseur. Les Bacteroidota et les Alphaproteobacteria dominent la communauté bactérienne chez les deux espèces analysées. Malgré la présence des mêmes phyla chez ces deux espèces, la communauté bactérienne est distincte, il se pourrait qu'il existe une spécificité d'association entre les hôtes et les bactéries ou que cette distinction soit due au fait que *M. rapax* et *A. pisonii* se développent dans deux biotopes différents, tous deux situés dans la même mangrove. Cette association diffère de celles observées chez les crustacés de sources hydrothermales. Les organismes hydrothermaux présentent des symbiotes essentiellement sur leur carapace (intérieur ou extérieur) et sont dominés par des Campylobacterota et Gammaproteobacteria, tandis que chez les organismes côtiers les symbiotes se trouvent à l'intérieur de la cavité branchiale sur les branchies. Cette interaction ne semble pas être une association aléatoire, une ASV retrouvée chez *A. pisonii* notamment ASV-Ara-5 est proche d'une séquence bactérienne identifiée à partir des branchies du crabe de mangrove *Uca urvillei* au Kenya. L'ASV-Ara-1 a également été identifiée à partir des branchies du crabe de mangrove, *Perisesarma guttatum*, en Afrique du Sud. Concernant *M. rapax*, l'ASV-Min-1 est identique à une base près à une bactérie retrouvée dans les branchies de deux crabes de mangrove, *Perisesarma guttatum* et *Uca urvillei*. De surcroît, cette interaction entre bactéries et branchies semble être assez répandue et concerne des crabes terrestres, semi-terrestres ainsi qu'exclusivement marins ou

d'eau douce. Les rôles de ces associations sont encore méconnus, certains auteurs suggèrent que la présence des bactéries serait un avantage pour la terrestrialisation des crabes (Booth, 2018). Les bactéries associées aux crustacés hydrothermaux jouent un rôle dans la nutrition des hôtes.

Ces résultats montrent que les crabes *A. pisonii* et *M. rapax* possèdent une communauté symbiotique associée à leurs branchies. Chaque communauté est bien distincte même si on tend à retrouver les mêmes ASV chez les familles de crabes. Les prochaines analyses porteront sur d'autres espèces de crabes terrestres, semi-terrestres et exclusivement marins.



Bacterial ectosymbionts colonizing gills of two Caribbean mangrove crabs

Naëma S. Béziat^{1,2} · Sébastien Duperron³ · Sébastien Halary³ · Catherine Azede¹ · Olivier Gros^{1,4}

Received: 12 November 2020 / Accepted: 21 July 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

Abstract

We describe here the interactions between bacterial ectosymbionts and two Caribbean mangrove crabs: *Aratus pisonii* (Sesarmidae) and *Minuca rapax* (Ocypodidae). Specimens of *A. pisonii* and *M. rapax* were collected in Guadeloupe from mangrove trees (*Rhizophora mangle*) and from the mangrove mud, respectively. Ectosymbionts colonizing gills in all host individuals were observed using scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM). No intracellular bacteria were observed in gills cells suggesting that the biofilm only occurs on the surface of the gills. For *A. pisonii* and *M. rapax*, four different bacterial morphotypes were distributed throughout the surface of gill lamellae. Different sizes and lengths were observed in the bacterial population colonizing *A. pisonii* and *M. rapax*. Either symbionts cover the entire surface of the gills, or they formed irregularly distributed patches. Molecular analyses (high-throughput amplicon sequencing of bacterial 16S rRNA-encoding genes) confirmed the occurrence of multiple bacterial taxonomic units, with dominance of Alphaproteobacteria and Bacteroidetes in both host species. However, dominant bacterial phylotypes were not shared between *A. pisonii* and *M. rapax*. This suggests that each species of these semiterrestrial crabs may harbor a specific and distinct bacterial community despite living in the same mangroves. The discussion compares the bacterial compositions of the two species and their potential functions are hypothesized. Further investigations are needed to confirm the specificity and nature of the symbiosis, including potential exchanges occurring between the partners.

Keywords Bacterial symbiosis · Crustacea · Metabarcoding · Ultrastructural analysis

1 Introduction

Symbiotic relationships between Prokaryotes and Eukaryotes are widespread in terrestrial and aquatic ecosystems. Many organisms establish symbiotic relationship in which partners

together can achieve new functions. In marine environments, well-documented examples include annelids, bivalves, crustaceans, and nematodes associated with chemoautotrophic bacteria in reducing environments (Dubilier et al. 2008). There, symbionts often provide a substantial supply of nutrients to the hosts as well as protection from toxic compounds, as exemplified by various marine invertebrates that shelter sulfur-oxidizing autotrophic bacteria (Nyholm and McFall-Ngai 2004 Dubilier et al. 2008 Sharma et al. 2013).

In mangroves, comparable associations occur in many organisms that live in contact with the reduced sediment (Goffredi et al. 2004; Dubilier et al. 2008; Brissac et al. 2011). Mangroves are highly productive coastal ecosystems distributed in the intertidal zone of tropical and subtropical regions, and harbor a diverse marine and terrestrial fauna. Bird, reptiles, mammals, crustaceans, mollusks, sponges, echinoderms are usually observed (Rützler and Feller 1988). Organisms have an essential role in mangrove ecosystems structure and functioning. Animal bioturbation for example contributes to oxygen

✉ Naëma S. Béziat
beziat.naema@gmail.com

¹ Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité (ISYEB), Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS, Sorbonne Université, EPHE, Université des Antilles, Campus de Fouillole, 97110 Pointe-à-Pitre, France

² Caribaea Initiative, Université des Antilles, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe

³ Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes (MCAM), UMR 7245 CNRS, Muséum national d'Histoire naturelle, 57 rue Cuvier (CP54), 75005 Paris, France

⁴ C3MAG, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, Université des Antilles, BP 592 - 97159, Pointe-à-Pitre, France

penetration into the coastal sediment, and activity of crabs was shown to have a greater influence on the structure and composition of microbial communities than environmental conditions (Booth et al. 2019). Microbial communities play an essential role in the degradation of litter, which ultimately results in the presence of reduced compounds and increased availability of associated nutrients (Liang et al. 2007). Some mangrove organisms establish symbiotic associations with chemosynthetic bacteria, as documented for bivalves (Frenkiel et al. 1996), nematodes (Himmel et al. 2009), and medusozoans (Abouna et al. 2015).

Symbiosis is less documented in crustacean taxa. Recently though, some crab species living in mangrove environments from Saudi Arabia and South Africa were reported to have gill-associated bacteria (Booth 2018). These crabs belong to the families Dotillidae, Grapsidae, Ocypodidae, Portunidae, and Sesamidae, and harbor rod-shaped bacteria and cocci of different sizes covering gills lamellae vertically or horizontally depending on crab family based on SEM observations. Most of these ectosymbionts were identified using 16S rRNA sequencing as Alphaproteobacteria and Acidimicrobiia, but no information is available regarding their metabolisms. Several crabs from hydrothermal vents have been more thoroughly investigated, including members of the Kiwaidae and Galatheidae families (Superfamily: Galatheaidea). These were shown to harbor bacteria on their body surface, attached to the outer part of their cuticle (Goffredi et al. 2008; Tsuchida et al. 2011). This epibiotic community is dominated by chemosynthetic Campylobacterota and Gammaproteobacteria, as well as by Bacteroidetes (Goffredi et al. 2008). The galatheid crab *Shinkaia crosnieri* from the Pacific–Antarctic Ridge also possesses setae on its entire body and shelters filamentous bacteria on the ventral setae (Tsuchida et al. 2011) belonging to the same bacterial taxa as above.

In this study, we investigated potential bacterial symbioses in two brachyuran crabs colonizing the fringe mangrove forest of Guadeloupe (Lesser Antilles in the Caribbean), namely *Aratus pisonii* (Milne Edwards 1837), an arboreal crab living on the mangrove tree *Rhizophora mangle*, and *Minuca rapax* (Smith 1870), the fiddler crab living on mangrove mud (see online resource 1). These crabs are semi-aquatic, and depend on sea-water for their reproduction (Warner 1967; Christy 1978).

The aim was (i) to test for the presence of bacterial symbionts in these species using ultrastructural investigation, and (ii) to characterize the symbiotic community using a comparative 16S rRNA gene amplicon sequencing approach in order to compare it with other mangrove crabs as well as with deep-sea species. We provide the first investigation of symbioses in mangrove crabs from the Caribbean arc.

2 Materials and methods

2.1 Sampling site

Thirty adult individuals of each species were collected manually during one year, 12 females and 18 males of *Aratus pisonii* (carapace length [CL] = 21.48 ± 3.4 mm) and 9 females and 21 males of *Minuca rapax* (CL = 20 ± 1.4 mm). They were collected from the marine fringe of the mangrove under a *Rhizophora mangle* canopy in Guadeloupe (French West Indies) directly on trees (around ten sampled) for *A. pisonii* or running on the sediment for *M. rapax*. Samples were collected at two main sites “Manche à Eau” and “Rivière Salée” (located $16^{\circ}16'22''\text{N}/61^{\circ}33'22''\text{W}$ and $16^{\circ}15'11''\text{N}/61^{\circ}32'58''\text{W}$), and three secondary sites (“Canal des Rotours”: $16^{\circ}21'12''\text{N}/61^{\circ}29'34''\text{W}$, “Marina du Gosier”: $16^{\circ}13'06''\text{N}/61^{\circ}31'20''\text{W}$, and “Sablière” $16^{\circ}14'2''\text{N}/61^{\circ}33'06''\text{W}$). Dissections were performed in the laboratory, after a cold anesthesia, using forceps to open the carapace. The gill filaments were retrieved from the gill cavity and placed either directly in the fixative solution or used for DNA extraction. In accordance with Article 17, paragraph 2, of the Nagoya Protocol on Access and Benefit-sharing, a sampling permit was issued and published in the number APA 2298730.

2.2 Scanning electron microscopy preparation

Immediately after dissection, gill samples were fixed at 4°C in 2.5% glutaraldehyde in 0.8x PBS buffer (pH 7.2). They were then dehydrated in series of acetone solutions of increasing concentration ($30^{\circ}, 50^{\circ}, 70^{\circ}, 90^{\circ}$ and 3 times 100°), dried to critical point in CO_2 at 31°C and 74 bars and sputter-coated with gold before observation with a FEI Quanta 250 electron microscope at 20 kV.

2.3 Transmission Electron microscopy preparation

After dissection, gill filaments from adult crabs were prefixed for 1 h at 4°C in 2.5% glutaraldehyde in 0.8x PBS buffer (pH 7.2). After a wash in the same buffer, they were fixed for 45 min at Room temperature (RT) in 1% osmium tetroxide and post-fixed with 2% aqueous uranyl acetate for 1 h at RT. Subsequently, gills were embedded in London Resin White resin. Ultrathin sections (60 nm thick) were observed under Tecnai G20 (FEI) microscope at 200 kV. A total of 30 specimens from each species (*A. pisonii* and *M. rapax*) were analyzed under the electron microscope.

2.4 Composition of gill-associated bacterial communities

Whole DNA from two adult individuals per species, in which the presence of symbionts was first checked by

SEM, was extracted from gills using the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. PCR using universal primers to amplify the V4-V5 region of the 16S rRNA-encoding gene were performed as described in Duperron et al. 2019. A ~400 bp fragment of the rRNA-encoding gene corresponding to the V4-V5 variable region of *Escherichia coli* was amplified using 515F and 926R primers (Parada et al. 2016) and sequenced on an Illumina MiSeq platform (2 X 300 bp, paired-end sequencing, Genoscreen, France). Company-provided mock communities of known composition were used as an internal control for the whole sequencing process. Raw reads were deposited into the GENBANK Sequence Read Archive (SRA, Bioproject PRJNA638519) database under accession numbers SAMN15196320–1 (*A. pisonii* specimen #1 and #2) and SAMN15196324–5 (*M. rapax* specimen #1 and #2).

Sequence analysis was performed using QIIME2 (Hall and Beiko 2018). Amplicon Sequence Variants (ASVs (Callahan et al. 2017)) were identified using DEBLUR (Amir et al. 2017) using default parameters, i.e. a maximal probability for indels of 0.01 and mean read error rate of 0.5% for normalization. Chimeric sequences were identified using UCHIME (de novo chimera detection) and then removed (Edgar et al. 2011). Taxonomic affiliations were obtained by the sklearn-based classifier (GreenGenes 13–8-99 release). Sequences matching “Eukaryota”, “Chloroplast” and “Mitochondria” were discarded. Venn diagrams were drawn using the web-based software available at <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>.

2.5 Phylogenetic analysis of dominant ASVs

A dataset was assembled including sequences of dominant ASVs that represented at least 10% of reads in at least one specimen, their most similar sequences according to BLAST, and sequences representative of relevant bacterial clades (Alphaproteobacteria, Actinobacteria and Bacteroidetes). Sequences were aligned using MUSCLE (358 nucleotide positions), and the alignment was checked visually. Phylogenetic relationships were inferred using a Maximum likelihood approach. A General Time Reversible model with Gamma-distributed rates (5 categories and invariant positions) was selected based on the Akaike Information Criterion (AIC) using the SMS model selection tool (Lefort et al. 2017). Bootstrap values were calculated based on 1000 independent replicates analyzed using the same approach and model. Actinobacteria were used as an outgroup in the tree. Analyses were performed using the software MEGAX (Kumar et al. 2018).

3 Results

3.1 Ultrastructural analysis

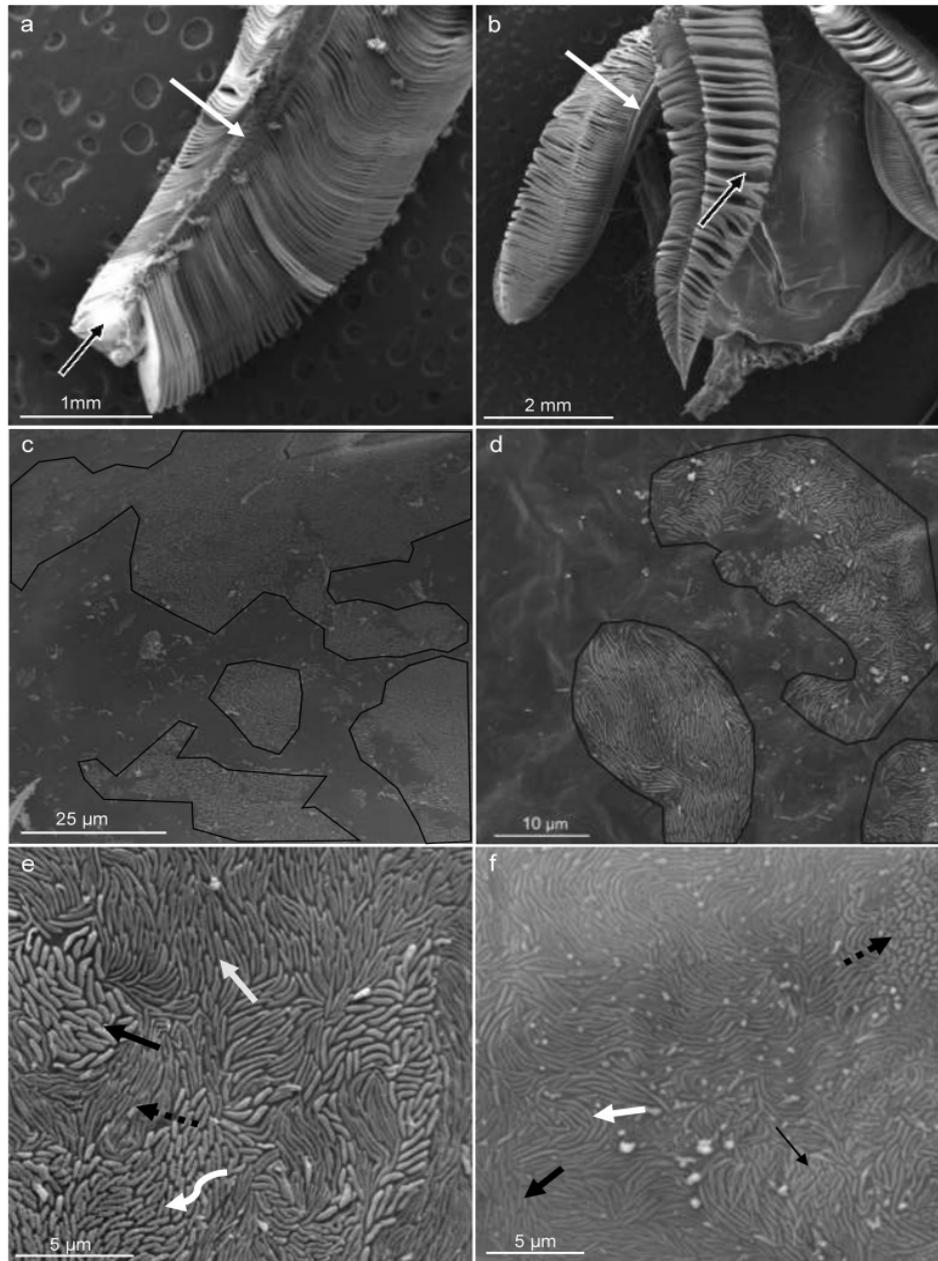
All 30 individuals of each of the 2 species examined throughout one year of collection using SEM showed a bacterial community associated with gills, at all sampling sites. These were all adults and all of them displayed bacteria on gills. Males and females were observed randomly. The morphology of the gill is identical for both sexes within the same species. Gill's morphology changes according to the taxonomic group.

Brachyuran crabs are characterized by a phyllobranchia type of gills with lamellae positioned in pairs and attached to a gill axis. Generally, this type of gill has a very thin tip at its end (Fig. 1a). Phyllobranchia gills length depends on the individual size. *M. rapax* gills have triangular branches (Fig. 1a) while *A. pisonii* gills seem to have more rounded branches (Fig. 1b). On all samples examined, both edges and surface of gill lamellae were colonized, either by some irregularly distributed patches of bacteria or by a regular bacterial biofilm (Figs. 1c, d). For both species, several different bacterial morphotypes (cocci, rods, but no filaments) were observed throughout the surface of gill lamellae by SEM (Figs. 1e, f). Four morphotypes (rod-shaped bacteria) are present on *M. rapax* (Fig. 1e), size is similar but bacteria differ by their thickness. First morphotype (white arrow) measures $1.69 \pm 0.33 \mu\text{m}$ with a $0.21 \pm 0.03 \mu\text{m}$ thickness. Second morphotype (black arrow) measures $1.16 \pm 0.22 \mu\text{m} \times 0.26 \pm 0.04 \mu\text{m}$ while the third morphotype (dotted black arrow) measures $1.54 \pm 0.42 \mu\text{m} \times 0.18 \pm 0.03 \mu\text{m}$. The last one (white curved arrow), possesses outgrowth at its surface and measures $0.93 \pm 0.27 \mu\text{m} \times 0.24 \pm 0.04 \mu\text{m}$ (Fig. 1e). Also, four morphotypes are observed on *A. pisonii*, thickness seems similar but bacteria differ by their size. Two long rod-shaped morphotypes are present (Fig. 1f). The long straight morphotype (black arrow) measures $2.26 \pm 0.76 \mu\text{m}$ while the long curved morphotype (white arrow) measures $1.68 \pm 0.48 \mu\text{m}$. Two short morphotypes are also present (Fig. 1f): a cocci-like morphotype (black dotted arrow) measuring $0.73 \pm 0.19 \mu\text{m}$ and short rods measuring $0.98 \pm 0.26 \mu\text{m}$.

Observations were homogeneous between males and female specimens. Even between the different sites sampled, no differences could be observed regarding the bacterial morphotypes present and/or their distribution on the gill cells. (Online resource 2).

The TEM observations from ultrathin sections showed that *A. pisonii* specimens harbored up to two layers of bacteria on their gill's cuticle (Fig. 2a) while *M. rapax* presented a single layer (Fig. 2b). Both TEM and SEM observations confirmed the ectosymbiotic status of the relationship, as no bacterium was detected within host cells (Figs. 1, 2).

Fig. 1 Structural analysis of gill filaments from two mangrove crabs according to SEM views. (a) Overview of the phyllobranchia of *Minuca rapax*. Each filament is composed of several lamellae (black arrow) present in pair attached to a central axis (white arrow) (a-b). Gill lamellae can have several forms depending on crab's species. *Aratus pisonii* presents a very rounded shape of the gill lamellae (b) while *M. rapax* has a more triangular shape (a). Bacterial cover does not appear as uniform on all part of gill lamellae (c) and (d). The limits of the bacterial patches are highlighted in black to show their distribution on gill lamellae. These lamellae are colonized by different bacterial morphotypes covering the cuticle of each gill cells. In *M. rapax* (e), bacterial populations are composed by a large morphotype (black arrow), a medium and long morphotype (white arrow), a thin form (black dotted arrow), and a morphotype with little outgrowth on the surface (white curved arrow). On *A. pisonii* gills (f), four bacterial morphotypes are obviously observed as indicated by various arrows



3.2 Diversity of gill-associated bacteria

In the two *Aratus pisonii* specimens analyzed, 24,009 and 21,241 quality-filtered reads were obtained clustering into 42 and 35 ASVs, respectively. The two *Minuca rapax* specimens yielded 20,749 and 22,289 quality-filtered reads representing 111 and 87 ASVs, respectively (Online resource 3). Together, Bacteroidetes and Proteobacteria (mostly Alphaproteobacteria) represented

76.5 to 97.1% of reads in the four specimens (Fig. 3). Actinobacteria represented 16.7 and 17.7% of reads in the *M. rapax* specimens, while they were below 6% in *A. pisonii*.

Four and three of the *A. pisonii* ASVs displayed abundances greater than 10% of reads in the two specimens, respectively summing to 84.5 and 66.5% of reads (Online resource 3). Two of these dominant ASVs were dominant in both specimens. Additional five and eight ASVs were between 1 and 10% and were thus considered

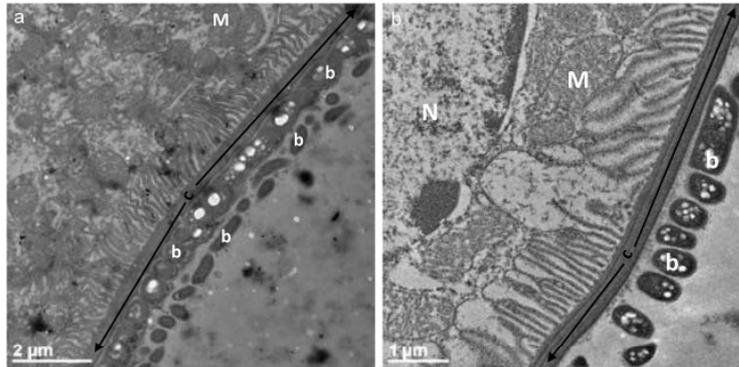


Fig. 2 Ultrastructural analysis of the gill cells with TEM. (a) Transversal section of *Aratus pisonii* gill lamellae showing the lack of intracellular bacteria. Moreover, in some areas, two layers of bacteria are superposed at the surface of cuticle (c). In *Minuca rapax* (b) only a single layer of bacteria (b) covering the cuticle (c) was detected from the gill cells. The cuticle is thick on this species, no intracellular bacteria were

observed within the cytoplasm of the gill cells. The cytoplasm volume of some bacteria appears filled with vesicles corresponding to internal former sites of sulfur granules lost during the dehydration and embedding processes (b: bacteria, M: Mitochondria, N: Nucleus, I: Ionophore)

abundant in the two specimens, respectively. Among the 12 dominant and abundant ASVs, 11 were present in both specimens (Fig. 4). Three and three of the ASVs present in *M. rapax* were above 10% in the two specimens, respectively, summing up to 53.2 and 51.8% of reads (Online resource 3). A single ASV was dominant

(>10%) in both specimens, while another was dominant in specimen 1 (12.8%) and not detected from specimen 2. Additional 11 and 13 ASVs were between 1 and 10% and were thus considered abundant in the two specimens, respectively. Among the 23 dominant and abundant ASVs identified, 21 were present in both specimens (Fig. 4).

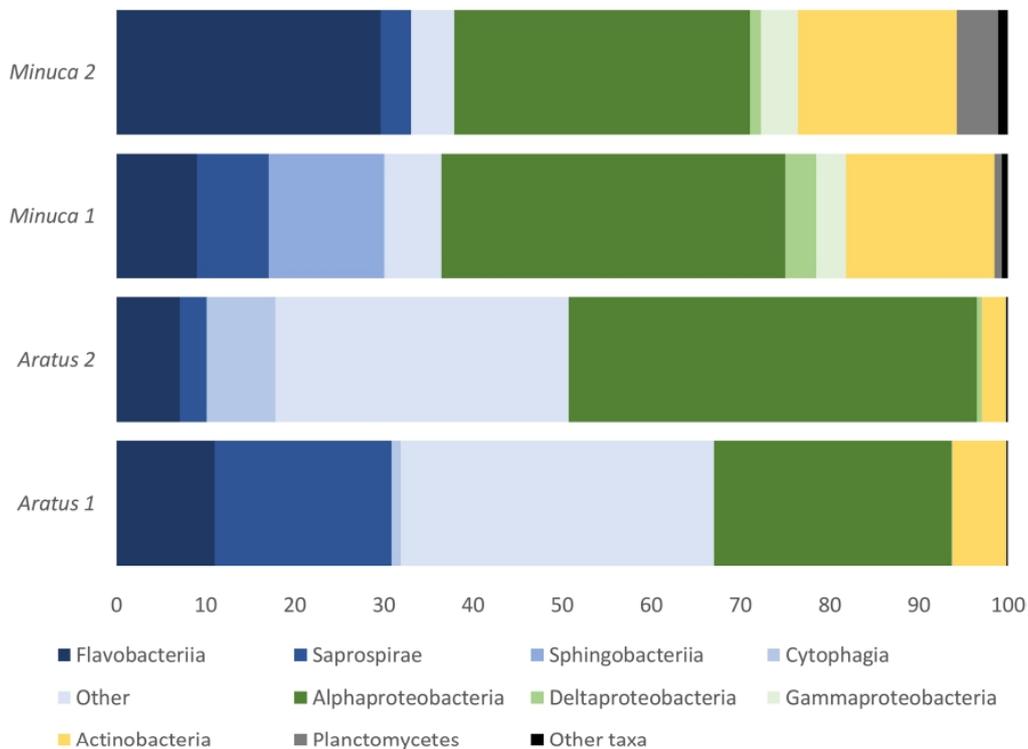
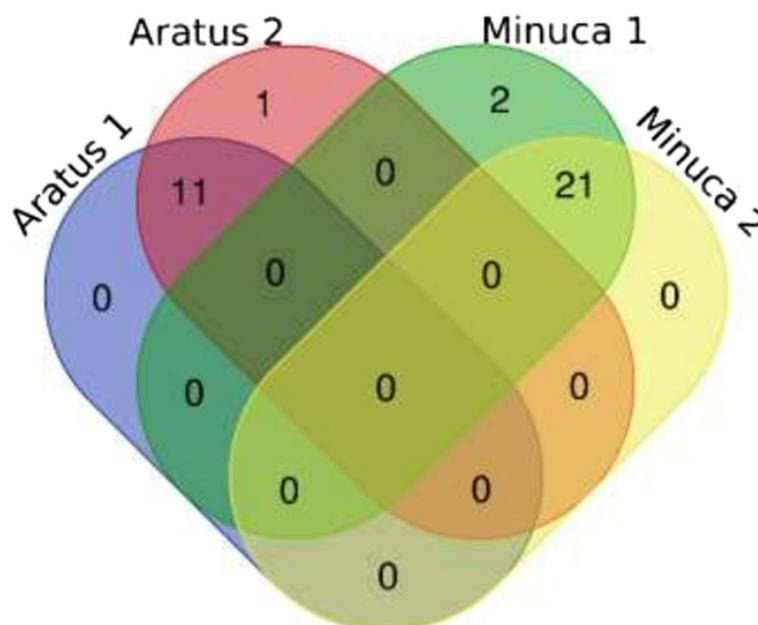


Fig. 3 Percentage relative abundances of major bacterial classes in the two *Aratus pisonii* and two *Minuca rapax* specimens. Classes within the Bacteroidetes are colored in shades of blue; classes within the Proteobacteria are in shades of green

Fig. 4 Venn Diagram displaying the number of abundant (i.e. >1%) gill bacterial ASVs shared among the two *Aratus pisonii* and the two *Minuca rapax* specimens



Despite overall similarity between composition of bacterial communities in *A. pisonii* and *M. rapax* at the class level (Fig. 3), ASVs in the two species were distinct. Overall, 117 ASVs were specific for *M. rapax* and 39 for *A. pisonii*, while only 12 were shared between the two species, none of these shared ASVs being abundant (i.e. >1%) in both species (Fig. 4 and Online resource 4).

3.3 Phylogenetic relationships of dominant ASVs

Four of the 5 dominant ASVs found in *Aratus pisonii* clustered within the Bacteroidetes (Fig. 5). One ASV (ASV-Ara - 5) was closely related to a dominant sequence from *Minuca rapax* (ASV - Min - 2, 4.0% divergence (Online resource 3)), and these were most similar (yet with >6.8% difference) to a sequence identified from the gill of the mangrove crab *Uca urvillei* from Kenya (Marasco et al., unpublished). Two ASVs were closely related (ASV-Ara - 2 and ASV-Ara - 4, 4.9% divergence) and displayed a clone from pig litter as their closest relative. The fourth Bacteroidetes ASV, ASV-Ara - 3, was related to sequences from a soda lake and from the heterotroph *Membranicola marinus*. The fifth dominant ASV, ASV-Ara - 1, belonged to the Alphaproteobacteria and was identical to bacterial sequences from the intestine of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (Li et al. 2007) and gills of mangrove crabs *Perisesarma guttatum* from South Africa (Marasco et al., unpublished).

Two of the 5 dominant ASVs in *Minuca rapax* were Bacteroidetes. Besides ASV - Min - 2 resembling *A. pisonii* ASV-Ara - 5 and discussed above, another ASV clustered

within the Bacteroidetes and was similar to sequences from seawater bacteria (ASV - Min - 5). Two ASVs were Alphaproteobacteria. ASV Min - 4 was closely related to various *Roseovarius* species (which are strict aerobic marine bacteria), while the second, ASV Min - 1, was almost identical (1 bp difference out of 350) to gill bacteria from the mangrove crabs *Perisesarma guttatum* and *Uca urvillei* from Kenya and South Africa (Marasco et al., unpublished). The last dominant ASV, ASV Min - 3, was a member of the Actinobacteria, related to a sequence from a hydrate ridge.

4 Discussion

4.1 Symbiont distribution and composition

Bacteria were found coating the gills of *Aratus pisonii* and *Minuca rapax*. This distribution is comparable to that recently documented in the gills of several mangrove crab species presented in a PhD thesis (Booth 2018), and different from that reported in hydrothermal crustaceans. Hydrothermal shrimps such as *Rimicaris exoculata* indeed display symbionts on the inner surface of the carapace (branchiostegites) and hypertrophied mouthparts (Zbinden et al. 2004), while galatheid crabs present symbionts on the external cuticle surface (Goffredi et al. 2008; Tsuchida et al. 2011). Mangrove crabs studied here on the other hand harbor their ectosymbionts inside the carapace, on gill lamellae, while the carapace is mostly devoid of bacterial biofilms. Booth (2018) reported similar localization in gills for fourteen crabs

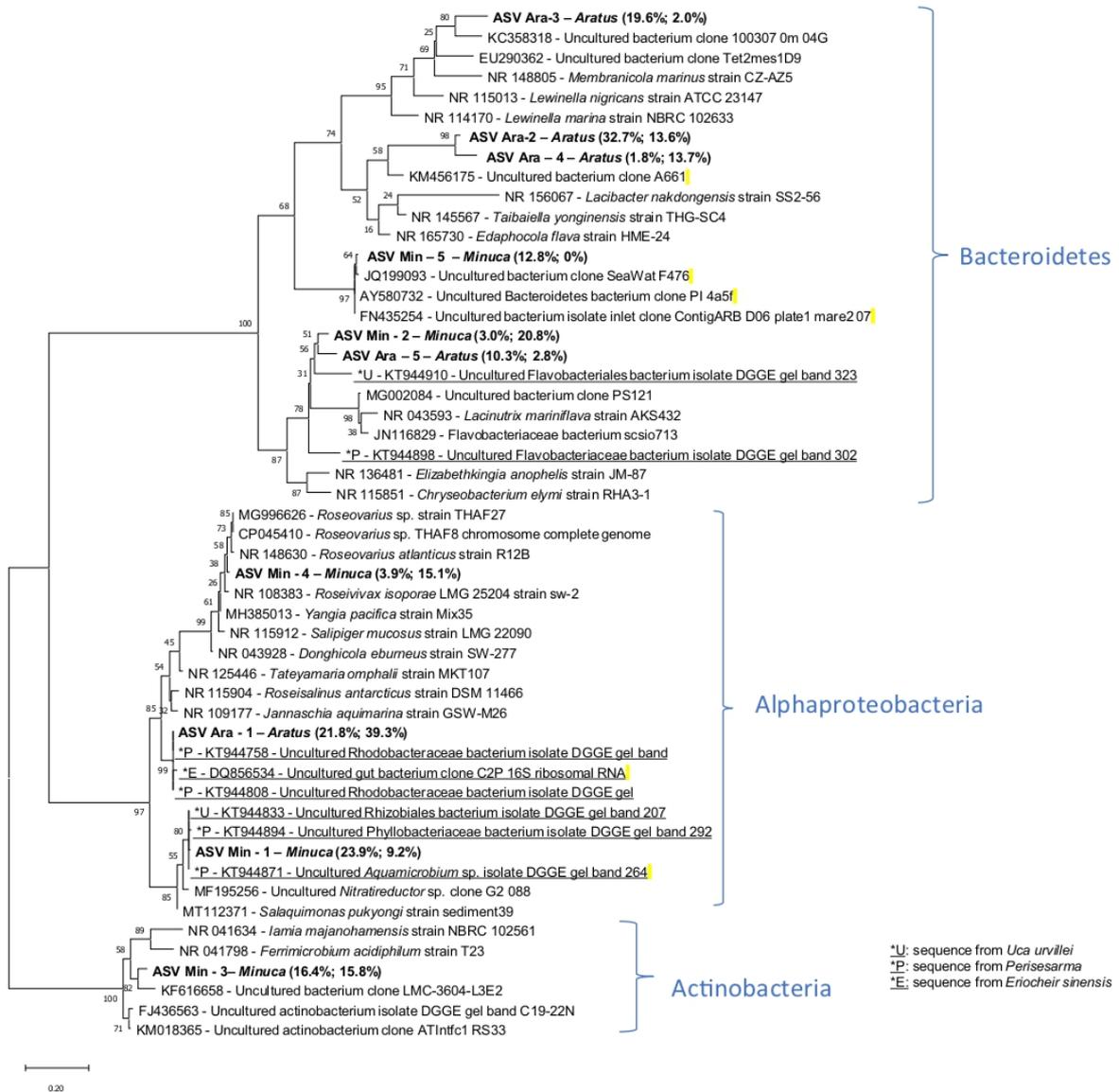


Fig. 5 Phylogenetic relationships of the 10 dominant ASVs occurring in *Aratus pisonii* and *Minuca rapax* (in bold). Sequences obtained from other crab genera (*Eriocheir*, *Perisesarma*, and *Uca*,) are underlined. See material and methods for description. Percentages between

parentheses after ASV names represent abundance in specimens 1 and 2 of the species, respectively. The scale bar represents 20% estimated sequence divergence; percentages at nodes were calculated based on 1000 bootstrap replicates

from several ecological niches in the mangrove ecosystems of Saudi Arabia and South Africa. Marine, semi-terrestrial, and terrestrial crabs displayed bacteria covering the entire gill lamellae. The characteristics of the mangrove environment could thus influence the distribution of symbionts. Crabs studied here and those analyzed by Booth (2018) indeed display similar symbioses despite being from very different localities. No ectosymbiont is described to date from gill tissues of hydrothermal crabs or shrimps, while gill ectosymbioses have

been repeatedly reported, for example in Mollusks found at wood falls including bivalves, chitons, and gastropods (Gros and Gaill 2007; Duperron et al. 2008, 2013; Zbinden et al. 2010; Brissac et al. 2011). Regarding symbiont identification, four of the 10 dominant ASVs identified in either *A. pisonii* or *M. rapax* are closely related or identical to sequences obtained from terrestrial mangrove crabs distributed worldwide, namely *Perisesarma gutattum* from Kenya, *Uca urvillei* from South Africa, and the catadromous crab *Eriocheir sinensis* from

China. Some of these crabs belong to the same family (the genera *Minuca* and *Uca* belong to the family Ocypodidae, while *Aratus* and *Perisesarma* belong to the family Sesamidae) and share closely related bacteria. Unfortunately, apart from sequence DQ856534 from *Eriocheir sinensis*, these sequences are only available from databases and are not presented in a published paper.

Nevertheless, this suggests that both mangrove crabs investigated here harbor a bacterial community on their gills, different both morphologically as well as taxonomically from ectosymbioses found in other crustaceans. Despite the low number of replicates, molecular results are very homogenous among the two specimens from each species. The fact that these specimens of a given host share most of their abundant ASVs, while they share none with the other host species suggests a non-random association of hosts and bacteria. This could be either because of species-specificity in the association, or because of slightly different habitats which expose each species to different pools of environmental bacteria since *A. pisonii* often occurs on *R. mangle* roots and branches, while *M. rapax* is found on mangrove mud.

None of the dominant ASVs is related to a known bacterial pathogen of crustaceans or invertebrates, and no lesions were visible on the tissue carrying bacteria, suggesting that the interaction may not be parasitic. Bacteria could thus be commensals, or the symbiotic relationship could be beneficial to either mangrove crabs, bacteria, or both. More work will be needed to test these hypotheses. According to Zhang et al. (2016), despite the constant exposure of gills to surrounding water, the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* harbors different bacterial communities in its gut and gills compared to that from surrounding water. Similar host influence on gill community compositions may thus be expected in mangrove crabs. Tsuchida et al. (2011) have shown that the bacterial community of the hydrothermal vent crab *Shinkaia crosnieri* (consisting of ectosymbionts covering the body) is more diverse than the bacterial community of the shrimp *Rimicaris exoculata* (symbionts located in the gill chamber) because this crab is directly exposed to high concentrations of reduced chemical compounds from the environment, supporting that habitat differences may lead to major differences in crab symbiont communities. In the present study, *Aratus pisonii* and *Minuca rapax* do not share identical bacterial communities on their gills, likely because they are not exposed to the exact same environment. Adults of *Aratus pisonii* live mainly on mangrove trees using the long aerial roots to occasionally wander into the marine water meanwhile adults of *M. rapax* live exclusively on the sediment and never climb trees or roots.

4.2 Hypothetical role of symbionts

Despite that mangrove habitats can be rich in sulfides and that several examples of symbioses involving sulfur-oxidizing bacteria were documented, none of the dominant ASVs found in *A. pisonii* and *M. rapax* is closely related to a known sulfur-oxidizing chemoautotrophic bacterium. In this study, Alpha-proteobacteria and Bacteroidetes are the most abundant bacterial groups colonizing gills of *Aratus pisonii* and *Minuca rapax*. In crabs from Asian and African mangroves, the most abundant bacterial groups were Acidimicrobia and Alpha-proteobacteria, (Booth 2018). One dominant ASV found on *A. pisonii* is for example related to *Membranicola marinus* (Li et al. 2016), an aerobic heterotroph. Many Alpha-proteobacteria also consume dissolved organic matter as Bacteroidetes do (Cottrell and Kirchman 2000). Based on their taxonomic affinities, dominant bacteria colonizing the gills of mangrove crabs are thus most likely heterotrophs rather than chemoautotrophs. A nutritional role of bacteria could be possible despite their localization on gills. Gill-located bacteria are well documented to contribute host nutrition in various invertebrates including bivalve mollusks in which bacterial gill-associated endosymbionts transfer fixed carbon through different tissues (Fisher and Childress 1986). Wood-boring teredinid bivalves are associated with endosymbionts present in specialized gill cells called bacteriocytes. There, bacteria are thought to be secreting cellulolytic enzymes that degrade plant material in the pallial cavity, helping in wood digestion, and perform nitrogen fixation that supplements the hosts nutrition (Distel 2003). Overall, localization of symbionts in the gills does not preclude their contribution to host nutrition, although details need to be explored in order to evaluate this potential role.

5 Conclusion

Our study shows that mangrove crabs *Aratus pisonii* and *Minuca rapax* harbor bacterial communities on their gills, composed of rod- and cocci-shaped bacteria mostly belonging to the Bacteroidetes and Alpha-proteobacteria. While sympatric in the same mangrove, the bacterial community is different between the two species and none of the main bacterial symbionts is shared. The role of this interaction remains to be elucidated, but the fact that highly similar bacterial sequences were reported from mangrove crabs on other continents indicates that bacterial symbiosis may be a common feature of mangrove crabs worldwide. This supports that this symbiosis may be an adaptation to the mangrove habitat. Future work should investigate the nature of the symbiotic relationship by addressing the role of epibiotic bacteria using functional approaches (metagenomics, metabolome analysis, experiments, etc.), in order to reveal its eventual adaptive significance to

mangrove ecosystems, in which crabs are major ecosystems engineers (Booth et al. 2019).

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s13199-021-00801-4>.

Author contributions Conceptualization and supervision: O.G (Olivier Gros) and S.D. (Sébastien Duperron), Phylogenetic studies: S.D. (Sébastien Duperron) and S.H (Sébastien Halary), Ultrastructural studies: N.B. (Naëma Béziat) and O.G. Collection of specimens and preparation for ultrastructural studies: N.B. and C.A. (Catherine Azède).

All the authors contributed to the writing and editing the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding N. Beziat was supported by a grant from “Conseil Régional de la Guadeloupe” and by Caribaea Initiative. We acknowledge the financial support of the CNRS MITI X-Life 2018–2019 program (CABMAN project) for the sequencing.

Availability of data and material All data are available on GenBank NCBI.

Code availability Not applicable.

Declarations

Conflicts of interest/competing interests There is no conflicts of interest or competing interests.

Ethics approval Not applicable.

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

References

- Aboutina S, Gonzalez-Rizzo S, Grimonprez A, Gros O (2015) First description of Sulphur-oxidizing bacterial symbiosis in a cnidarian (Medusozoa) living in sulphidic shallow-water environments. *PLoS One* 10:e0127625
- Amir A, McDonald D, Navas-Molina JA, Kopylova E, Morton JT, Zech Xu Z, Kightley EP, Thompson LR, Hyde ER, Gonzalez A, Knight R (2017) Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence patterns. *mSystems* 2:e00191–16
- Booth J (2018) Ecology of the Mangrove Microbiome (Doctoral dissertation)
- Booth JM, Fusi M, Marasco R, Mbobo T, Daffonchio D (2019) Fiddler crab bioturbation determines consistent changes in bacterial communities across contrasting environmental conditions. *Sci Rep* 9: 3749
- Brissac T, Merçot H, Gros O (2011) Lucinidae/sulfur-oxidizing bacteria: ancestral heritage or opportunistic association? Further insights from the Bohol Sea (the Philippines). *FEMS Microbiol Ecol* 75:63–76
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP (2017) Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J* 11:2639–2643
- Christy JH (1978) Adaptive significance of reproductive cycles in the fiddler crab *Uca pugnator*: a hypothesis. *Science* 199:453–455
- Cottrell MT, Kirchman DL (2000) Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the Cytophaga-Flavobacter cluster consuming low- and high-molecular-weight dissolved organic matter. *Appl Environ Microbiol* 66:1692–1697
- Distel D (2003) The biology of marine wood boring bivalves and their bacterial endosymbionts. *ACS Symp Ser* 845:253–271
- Dubilier N, Bergin C, Lott C (2008) Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nat Rev Microbiol* 6: 725–740
- Duperron S, Halary S, Habiballah M, Gallet A, Huet H, Duval C, Bernard C, Marie B (2019) Response of fish gut microbiota to toxin-containing cyanobacterial extracts: a microcosm study on the medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Sci Technol Lett* 6:341–347
- Duperron S, Laurent MCZ, Gaill F, Gros O (2008) Sulphur-oxidizing extracellular bacteria in the gills of Mytilidae associated with wood falls. *FEMS Microbiol Ecol* 63:338–349
- Duperron S, Pottier M-A, Léger N, Gaudron SM, Puillandre N, le Prieur S, Sigwart JD, Ravaux J, Zbinden M (2013) A tale of two chitons: is habitat specialisation linked to distinct associated bacterial communities? *FEMS Microbiol Ecol* 83:552–567
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27:2194–2200
- Fisher CR, Childress JJ (1986) Translocation of fixed carbon from symbiotic bacteria to host tissues in the gutless bivalve *Solemya reidi*. *Mar Biol* 93:59–68
- Frenkiel L, Gros O, Mouëza M (1996) Gill structure in *Lucina pectinata* (Bivalvia: Lucinidae) with reference to hemoglobin in bivalves with symbiotic sulphur-oxidizing bacteria. *Mar Biol* 125:511–524
- Goffredi SK, Jones WJ, Erlich H, Springer A, Vrijenhoek RC (2008) Epibiotic bacteria associated with the recently discovered yeti crab, *Kiwa hirsuta*. *Environ Microbiol* 10:2623–2634
- Goffredi SK, Waren A, Orphan VJ et al (2004) Novel forms of structural integration between microbes and a hydrothermal vent gastropod from the Indian Ocean. *Appl Environ Microbiol* 70:3082–3090
- Gros O, Gaill F (2007) Extracellular bacterial association in gills of “wood mussels”. *Cah Biol Mar* 48:103
- Hall M, Beiko RG (2018) 16S rRNA gene analysis with QIIME2. *Methods Mol Biol* 1849:113–129
- Himmel D, Maurin LC, Gros O, Mansot J-L (2009) Raman microspectrometry sulfur detection and characterization in the marine ectosymbiotic nematode *Eubostrichus dianae* (Desmodoridae, Stilbonematidae). *Mol Biol Cell* 101:43–54
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549
- Lefort V, Longueville J-E, Gascuel O (2017) SMS: smart model selection in PhyML. *Mol Biol Evol* 34:2422–2424
- Liang J-B, Chen Y-Q, Lan C-Y, Tam NFY, Zan QJ, Huang LN (2007) Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment. *Mar Biol* 150:739–747
- Li K, Guan W, Wei G, Liu B, Xu J, Zhao L, Zhang Y (2007) Phylogenetic analysis of intestinal bacteria in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *J Appl Microbiol* 103:675–682
- Li X, Liu Y, Chen Z, Liu LZ, Liu ZP, Liu Y (2016) *Membranicola marinus* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Saprospiraceae isolated from a biofilter in a recirculating aquaculture system. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:1275–1280
- Milne Edwards H (1837) Histoire naturelle des crustacés. L’Institute, Paris 5:225
- Nyholm SV, McFall-Ngai M (2004) The winnowing: establishing the squid–vibrio symbiosis. *Nat Rev Microbiol* 2:632–642
- Parada AE, Needham DM, Fuhrman JA (2016) Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ Microbiol* 18:1403–1414

- Rützler K, Feller C (1988) Mangrove swamp communities. *Oceanus* 30: 10
- Sharma S, Shukla KP, Singh V, Singh J, Devi S, Tewari A (2013) Plant-microbe Symbiosis: perspectives and applications. In: Arora NK (ed) plant microbe symbiosis: fundamentals and advances. Springer India, pp 119–145
- Smith SI (1870) III. Notes on American Crustacea. No. 1. Ocypodidea. *Trans Conn Acad* 2:113–176
- Tsuchida S, Suzuki Y, Fujiwara Y, Kawato M, Uematsu K, Yamanaka T, Mizota C, Yamamoto H (2011) Epibiotic association between filamentous bacteria and the vent-associated galatheid crab, *Shinkaia crosnieri* (Decapoda: Anomura). *J Mar Biol Assoc UK* 91:23–32
- Wamer GF (1967) The life history of the mangrove tree crab *Aratus pisonii*. *J Zool* 153:321–335
- Zbinden M, Le Bris N, Gaill F, Compere P (2004) Distribution of bacteria and associated minerals in the gill chamber of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* and related biogeochemical processes. *Mar Ecol Prog Ser* 284:237–251
- Zbinden M, Pailleret M, Ravaux J, Gaudron SM, Hoyoux C, Lambourdière J, Warén A, Lorion J, Halary S, Duperron S (2010) Bacterial communities associated with the wood-feeding gastropod *Pectinodonta* sp. (Patellogastropoda, Mollusca). *FEMS Microbiol Ecol* 74:450–463
- Zhang M, Sun Y, Chen L, Cai C, Qiao F, du Z, Li E (2016) Symbiotic bacteria in gills and guts of chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) differ from the free-living bacteria in water. *PLoS One* 11:e0148135

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Chapitre 4 : Transmission
environnementale des symbiotes
bactériens des crabes de mangrove *Aratus
pisonii* et *Minuca rapax*.**

Synthèse du chapitre 4 : Transmission environnementale des symbiotes bactériens des crabes de mangrove *Aratus pisonii* et *Minuca rapax*.

Les symbioses étant largement étudiées depuis leur découverte, les scientifiques se basent sur quelques critères pour définir le type réel de l'association. La durée de l'association, le caractère obligatoire ou facultatif de celle-ci, la localisation des symbiotes, les échanges réalisés entre les deux ainsi que la transmission des symbiotes à la génération suivante sont les critères principaux à identifier (Douglas & Smith, 1987). La transmission des symbiotes à la génération suivante peut être impérative pour la survie de l'hôte (Bright & Bulgheresi, 2010). A ce jour, deux modes de transmission ont été identifiés, la transmission verticale et horizontale, cette dernière comprenant toutefois le mode de transmission environnemental. Les symbiotes transmis de façon verticale, sont généralement présents dans les gamètes de la femelle et plus rarement dans les spermatozoïdes (Vautrin & Vavre, 2009). Les symbiotes peuvent être présents à la surface des œufs ou à l'intérieur de ceux-ci comme pour le bivalve *Solemya reidi* (Cary 1994). La transmission horizontale est caractérisée par une phase aposymbiotique des premiers stades de vie. Les larves ou juvéniles sont contaminés soit par d'autres hôtes porteurs des symbiotes cibles (Zimmermann *et al.*, 2021), soit par des bactéries compétentes issues de l'environnement (Nyholm & McFall-Ngai, 2004). Chez les crustacés, la symbiose est peu documentée en comparaison aux autres groupes d'animaux. Par ailleurs, le mode de transmission reste peu connu. Concernant les organismes de sources hydrothermales (crevettes et crabes), les auteurs proposent une transmission environnementale des symbiotes (Thurber *et al.*, 2011). Pour le homard *Homarus gammarus*, le crabe d'eau douce *Eriocheir sinensis* et les crabes de mangrove *A. pisonii* et *M. rapax* ayant des bactéries sur leurs branchies, le mode de transmission est inconnu (Middlemiss *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 2016 ; Béziat *et al.*, 2021).

L'objectif principal de cette étude est d'identifier le mode de transmission des symbiotes de *A. pisonii* et *M. rapax*. Les juvéniles de ces deux espèces se développent tous deux sur le sol de mangrove contrairement aux adultes qui évoluent dans des biotopes différents. Le second objectif est de décrire la composition des communautés microbiennes des juvéniles afin de savoir si elle diffère chez les deux espèces malgré leur développement dans le même biotope au stade juvénile.

Dans la lagune de la manche à eau, nous avons collecté des femelles gravides, des juvéniles des deux espèces, des échantillons d'eau de terrier de l'espèce *M. rapax*, et deux individus *A. pisonii* juste après la mue. De plus, nous avons gratté la surface des racines aériennes de palétuvier rouge afin d'estimer la nature des bactéries environnementales présentes dans le biotope de l'adulte d'*A. pisonii*. Nous avons aussi récolté des larves aquatiques grâce à un filet à plancton (300µm de maille) passé le long de la lagune. A partir de deux femelles gravides nous avons récupéré des œufs et les gonades des deux espèces de crabes. Les autres femelles gravides ont été placées en laboratoire dans un bac à sec, avec un accès à l'eau de mer pour encourager la ponte. A l'issue de la ponte, nous avons récupéré les larves zoés 1 fraîchement écloses.

Une extraction d'ADN suivi d'une PCR a été réalisée sur tous les échantillons à savoir les œufs et gonades femelles, les larves entières issues du milieu naturel, les larves juste après éclosion en laboratoire, les échantillons d'eau de terrier, les branchies des juvéniles, ainsi que les échantillons de palétuvier.

Les gonades, les œufs, et les larves ont montré une absence d'amplification par PCR de l'ADNr 16S avec des amorces universelles, ainsi qu'avec des amorces spécifiques ciblant les groupes Cytophaga, Flavobacterium, Bacteroides et Roseobacter (retrouvés chez les adultes). Ces résultats excluent la transmission verticale des symbiotes.

Les échantillons positifs à la PCR précédemment cités (branchies de juvéniles, eau de terrier, et surface de palétuvier) ont été envoyés pour analyse métabarcoding. L'autre partie des branchies de juvéniles des deux espèces ainsi que les branchies des individus ayant mués et des œufs d'*A. pisonii* ont été préparés pour une observation au microscope électronique à balayage.

Les observations effectuées au microscope électronique à balayage montrent la présence de bactéries sur les branchies des juvéniles d'*A. pisonii* et de *M. rapax* comme observé précédemment chez les adultes. Les individus ayant récemment mués et les œufs d'*A. pisonii* sont dépourvus de symbiotes sur les lamelles branchiales et à la surface des œufs.

Les résultats de l'analyse métabarcoding montrent que la flore bactérienne symbiotique des juvéniles d'*A. pisonii* est majoritairement composée par des Alphaproteobacteria (56-58%) et des Bacteroidota (40-42%), alors que chez les juvéniles de *M. rapax* ce sont des

Alphaproteobacteria (84-88%), des Bacteroidota (-15%) et des Actinobacteria (1%) qui sont majoritaires.

Aucune ASV n'est partagée entre les juvéniles des deux espèces, chacun possède une communauté bien distincte malgré le fait de se développer dans le même biotope (sol vaseux des mangroves).

Comparaison de la communauté des juvéniles à l'eau de terrier et à la surface des palétuviers

Les bactéries des genres Rhodothermia (32-34%) et Actinobacteria (28-39%) sont majoritaires dans l'échantillon d'écorce de palétuvier. Aucune ASV n'est partagée entre les juvéniles des deux espèces et l'écorce de palétuvier.

Les Alphaproteobacteria sont dominantes dans un échantillon d'eau de terrier (46%) tandis que les Gammaproteobacteria sont dominantes dans l'autre (76%). Le juvénile d'*A. pisonii* partage 15 ASV avec un seul des échantillons d'eau de terrier. Ces 15 ASV sont représentées en faible quantité dans la communauté du juvénile d'*A. pisonii*. Cependant, parmi les 7 ASV considérées comme abondantes chez le juvénile, 2 ASV (ARA-juv-1 et ARA-juv-2) sont similaires à 99% à 2 ASV retrouvées dans l'échantillon d'eau de terrier. Avec ce pourcentage de similarité, nous considérons que les séquences représentent la même espèce.

Concernant le juvénile de *M. rapax*, 13 ASV sont partagées avec un échantillon d'eau de terrier. Les 5 ASV considérées comme abondantes chez *M. rapax* sont retrouvées dans l'échantillon d'eau de terrier.

Comparaison de la communauté des juvéniles à la communauté des adultes

Les ASV majoritaires chez l'adulte d'*A. pisonii* sont nommées ARA-1,-2,-3,-4,-5 et sont comparées aux séquences majoritaires des juvéniles nommées ARA-juv-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7. Parmi ces ASV, deux sont identiques à 100% : Ara-juv-1 et ARA-1, c'est la séquence majoritaire chez l'adulte et chez le juvénile. De plus, ARA-juv-5 et ARA-3 sont identiques à 100%. Les autres ASV majoritaires chez l'adultes (ARA-2,-4,-5) correspondent à des ASV minoritaires chez le juvénile.

Concernant l'espèce *Minuca rapax*, les ASV majoritaires de l'adultes sont nommées MIN-1,-2,-3,-4,-5 et celles du juvéniles sont nommées MIN-juv-1,-2,-3,-4,-5.

L'ASV MIN-juv-4 est similaire à 99% à MIN-2 et L'ASV MIN-juv-5 est similaire à 99% à MIN-3. L'ASV Min-4 est identique à une ASV minoritaire chez le juvénile et les ASV MIN-1, et MIN-5 ne sont pas retrouvées chez le juvénile de cette espèce.

Ces résultats montrent que certaines bactéries majoritaires de la communauté des adultes sont déjà présentes chez les juvéniles et suggèrent que la communauté symbiotique s'établit au cours de la vie des crabes. Ce phénomène est observé chez la crevette *Rimicaris exoculata*, un switch de la communauté bactérienne symbiotique a lieu entre le stade juvénile et l'adulte passant d'une majorité de Gammaproteobacteria à une majorité de Campylobacterota au stade adulte (Guri *et al.*, 2012). Dans le cas des crabes au stade juvénile la communauté symbiotique est encore incomplète.

Même si l'ASV majoritaire chez les juvéniles d'*A. pisonii* et de *M. rapax* sont identiques à 99%, les communautés restent tout de même bien distinctes. Cela suggère que la phylogénie de l'hôte a un impact plus important pour la sélection des bactéries que le milieu dans lequel se développent les juvéniles.

Ces résultats montrent aussi que les juvéniles d'*A. pisonii* et de *M. rapax* acquièrent leurs symbiotes bactériens via leur environnement et qu'il y a une sélection des bactéries compétentes. L'absence d'amplification d'ADN bactérien dans les gamètes et larves couplée à l'absence de bactéries sur les lamelles branchiales des individus ayant mués confirme ce mode de transmission. Comme il est observé pour la crevette *Rimicaris exoculata* et le homard *H. gammarus*, après chaque mue, l'hôte perd entièrement sa couverture bactérienne, puis est progressivement recolonisé par les mêmes groupes bactériens initialement présents dans cette association (Corbari *et al.*, 2008 ; Middlemiss *et al.*, 2015).

Maitriser la culture larvaire des espèces *M. rapax* et *A. pisonii* permettrait de connaître le moment d'infection des bactéries chez les crabes. Nous supposons tout de même que la colonisation commence après le stade mégaloïde lors de la transformation en jeune crabe.

Environmental transmission of symbionts in the mangrove crabs *Aratus pisonii* and *Minuca rapax*: acquisition of the bacterial community through larval development to juvenile stage.

BÉZIAT N.S.^{1,2*}, DUPERRON S.³, and GROS O.^{1,4}.

¹Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité (ISYEB), Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS, Sorbonne Université, EPHE, Université des Antilles. Campus de Fouillole, 97110 Pointe-à-Pitre, France.

²Caribaea Initiative, Université des Antilles, Guadeloupe

³ Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes (MCAM), UMR 7245 CNRS, Muséum national d'Histoire naturelle, 57 rue Cuvier (CP54), 75005 Paris, France.

⁴C³MAG, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, Université des Antilles, BP 592 - 97159 Pointe-à-Pitre, France.

*Corresponding author: beziat.naema@gmail.com

ORCID

0000-0002-5411-8069 : Naëma Beziat

0000-0002-6422-6821: Sébastien Duperron

0000-0002-2297-2009 : Olivier Gros

Abstract

Aratus pisonii and *Minuca rapax* are two brachyurans crabs living with bacterial ectosymbionts located on gill lamellae. Several rod-shaped bacterial morphotypes are present and the community is dominated by Alphaproteobacteria and Bacteroidota. This study aims to identify the mode of transmission of the symbionts to the new host generations and to identify the bacterial community colonizing the gills of juveniles. We tested for the presence of bacteria using PCR with universal primers targeting the 16S rRNA encoding gene from gonads, eggs, and different larval stages either obtained in laboratory condition or from the field. The presence of bacteria on juvenile gills was also characterized by scanning electron microscopy, and subsequently identified by metabarcoding analysis.

Gonads, eggs, and larvae were negative to PCR test suggesting that bacteria are not present at these stages in significant densities. On the other hand, juveniles of both species display three rod-shaped bacterial morphotypes on gill lamellae, and sequencing revealed that the community is dominated by Bacteroidota and Alphaproteobacteria on *A. pisonii* juveniles, and by Alphaprotobacteria, Bacteroidota and Acidimicrobia on *M. rapax* juveniles. Despite the fact that juveniles of both species co-occur in the same biotope, no shared bacterial phylotype was identified. On the other hand, some of the most abundant bacteria present in adults are also present in juvenile of the same species, suggesting that juvenile-associated communities resemble those of adults. Because some of these bacteria were also found in crab burrow water, we hypothesize that the bacterial community is established gradually during the life of the crab starting from the megalopa stage and involves epibiosis-competent bacteria that occur in the environment.

1. Introduction

Most eukaryotes live in symbiotic association with prokaryotic partners. These associations are particularly well documented in animals living in various biotopes from terrestrial to aquatic environments (McFall-Ngai *et al.*, 2013). De Bary (1879) proposed the first definition of symbiosis as the « Living together of dissimilarly named organisms”. This definition encompasses all types of relationships, and describes symbiosis in the broadest sense (Martin & Schwab, 2012). Many criteria must be considered to characterize a relationship between a eukaryotic host and its symbionts including the specificity and duration of the association, its obligatory or facultative character, the localization of the symbionts, the metabolic exchanges, and also their transmission mode to the next host generations (Smith & Douglas, 1987). From an evolutionary and survival perspective, it is important for hosts to ensure efficient transmission of their symbionts (Bright & Bulgheresi, 2010). Two modes of transmission have been distinguished: vertical and horizontal, the latter including the case of environmental transmission. Vertical transmission occurs via the gametes (Vautrin & Vavre, 2009). Most often the symbionts are transmitted by the female. Symbionts can be located on egg’s surface, as described in the insect *Cavelerius saccharivorus* (Itoh *et al.*, 2014) or within oocyte/egg as described in whiteflies colonized by *Rickettsia* (Shan *et al.*, 2020) or in the clam *Solemya reidi* colonized by sulfur-oxidizing bacteria (Cary, 1994). Vertical transmission leads to a high specificity and fidelity (Distel (1998)), and in some species, results in co-speciation events between hosts and symbionts (Dubilier *et al.*, 2008). Horizontal transmission on the other hand involves an aposymbiotic phase in larvae or juveniles followed by the symbiotic phase for the rest of the host’s life, usually after metamorphosis. Horizontal transmission can be inter- or intra- specific as observed for *Wolbachia* bacteria and diverse hosts (Ahmed *et al.*, 2016; Zimmermann *et al.*, 2021), or can occur through contamination by environmental bacteria as for the squid *Euprymna scolopes* and its associated light-producing symbiont *Vibrio fischeri* (Nyholm & McFall-Ngai, 2004) or in lucinid bivalves (Gros *et al.*, 1996; Guri *et al.*, 2012; Ávila, 2016). In this latter case, a stock of symbiosis-competent bacteria naturally present in the hosts environment has to be captured by the aposymbiotic host (Gros *et al.*, 1996, 1997, 1998b; Bright & Bulgheresi, 2010).

In marine crustaceans, symbioses have been less documented than in other groups such as Mollusks. When present, symbionts tend to be ectosymbiotic. They can be located on the cuticle as in shrimps of the genus *Rimicaris* (Zbinden *et al.*, 2008b), in the crab *Kiwa hirsuta*

(Goffredi *et al.*, 2008), or on gills in the lobster *Homarus gammarus* (Middlemiss *et al.*, 2015). Symbiont acquisition mode is poorly characterized in crustaceans. Yet, bacterial symbionts present on the carapace of *Kiwa* crabs are for example present in the environment (Thurber *et al.*, 2011; Tsuchida *et al.*, 2011) suggesting environmental transmission.

Despite a limited research effort, some species of coastal crabs are reported to be associated with bacteria located on their gills, including the freshwater species *Eriocheir sinensis*, mainly colonized by Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidota, and Firmicutes (Zhang *et al.*, 2016; Booth, 2018) but no data is available concerning the transmission mode of the symbionts in the species concerned. In a recent study focusing on two Caribbean mangrove brachyuran decapods, Beziat *et al.* (2021) have shown that *Aratus pisonii* (arboreal mangrove crab) and *Minuca rapax* (living on mangrove mud) are associated with specific lineages of bacteria, dominated by Bacteroidota, Actinobacteria and Alphaproteobacteria. While similar at the phylum level, bacterial communities differed at the 16S rRNA level between the two species.

The aim of this study is to investigate how the symbiotic bacterial populations are transmitted to the next generations in *Aratus pisonii* and *Minuca rapax*. Juveniles of both species share the same environment, while adults use different habitats (trees and mud, respectively). We thus investigate if the environment has more impact on the community composition than host species. To this purpose, the presence of bacteria was investigated in gonads, eggs, larvae and juveniles using PCR and electron microscopy analyses. Besides those collected in the field, larvae were also obtained in the laboratory and reared in controlled conditions. The composition of gill-associated bacterial communities in juveniles was analyzed and compared to that of adult specimens as well as environmental samples (mangrove tree bark and burrow's water).

2. Materials and Methods

2.1 Sampling site and crab collection

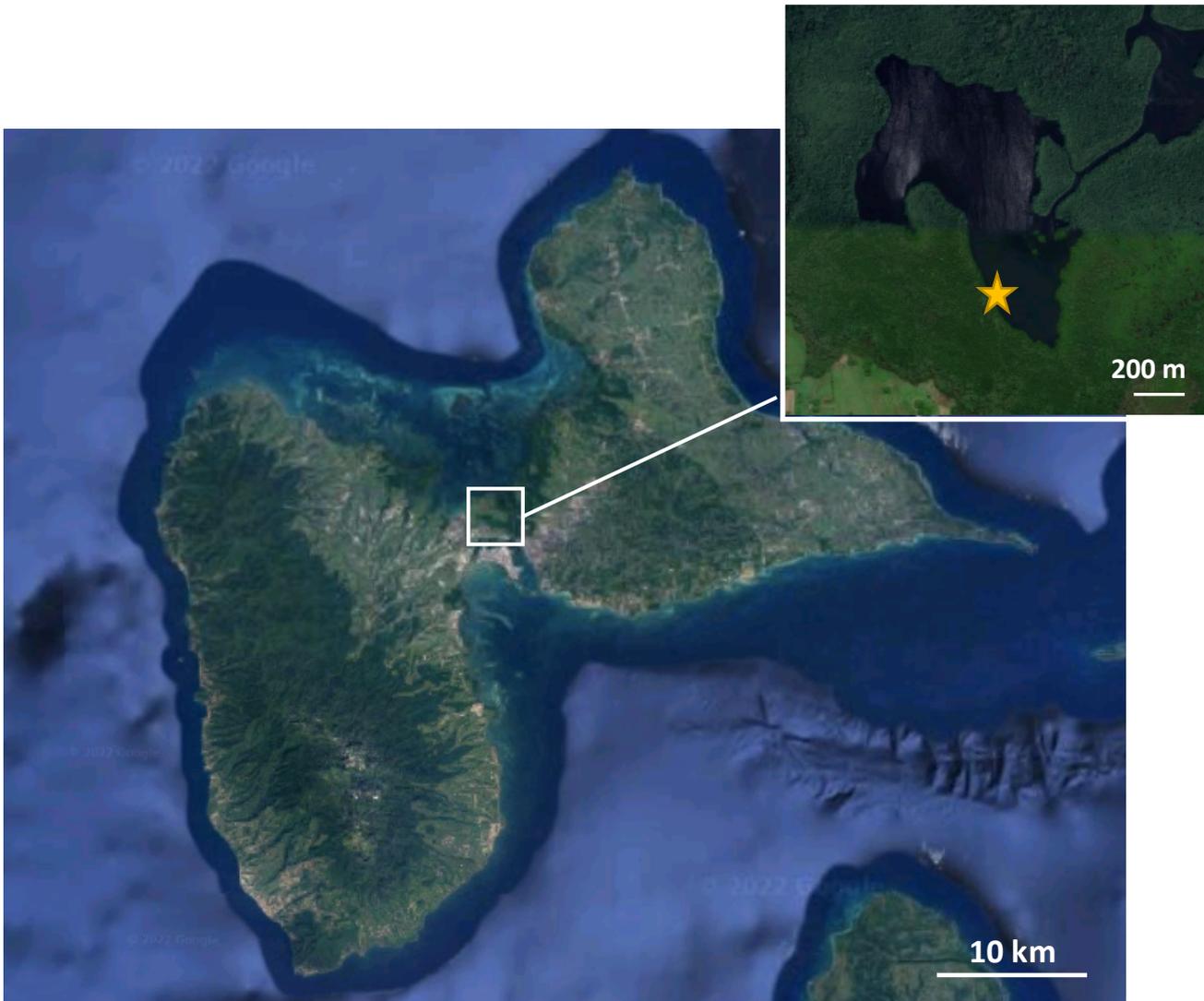


Figure 16. Island of Guadeloupe, Lesser Antilles. Site of collection: Manche à Eau (white square, yellow star).

Ovigerous females, and juveniles of the crabs *Aratus pisonii* and *Minuca rapax* were collected manually from the mangrove located in the Manche à Eau lagoon in Guadeloupe (Lesser Antilles, collection site: N16°27'459"/W61°55'722" (fig.16). *Aratus pisonii* adults were collected directly on *Rhizophora mangle* trees while juveniles were collected only on the sediment. Adults and juveniles of *Minuca rapax* were collected on the sediment from the same area. During collection, two *A. pisonii* adults were collected just after molt. *Aratus pisonii*

ovigerous females were collected between January and March 2019 while *Minuca rapax* ovigerous females were collected in July 2020. For each egg-laying attempt, about 10 females of each species were collected, they were transferred to the laboratory to obtain natural spawning and get larval culture.

Swimming larvae (Zoe stages) were captured from the same location in February 2021 with a plankton net (200µm mesh size) during a transect across the entire lagoon near the mangrove fringe with a small boat operated at 2 knots.

Water samples from several burrows of *M. rapax* were collected at low tide using a 50 ml-syringe, and surface of *Rhizophora mangle* bark was collected by scraping using sterile tweezers. Upon recovery, samples were frozen.

2.2 Larval culture

Aratus pisonii and *Minuca rapax* ovigerous females were kept in the laboratory in a dry container, with access to seawater for egg laying. During the night, the crabs came out of their container to release eggs in the water. After hatching (usually early in the morning the day after capture), all the larvae were collected with a 50 mL syringe and transferred into a cylindroconic batch containing 4L of 1.2µm- filtered seawater (salinity: 34.6 g.L⁻¹). The 1.2 µm filtration remove the big organic debris in the sea water and so limit the bacterial development in the culture water. Sea water was gently oxygenated in depth and renewed every two days to avoid bacterial development. Larvae were fed with *Artemia nauplii* (3 individuals per mL) every two days.

2.3 DNA extraction and Polymerase Chain Reaction analyses

DNA extraction and PCR analyses were performed on gonads from two adult females, eggs, larvae, and gills of two juveniles per species. Regarding the larvae either collected from the field or obtained in laboratory, about ten zoea were used for extraction, and one megalopa. We call "larvae" the set of zoea and megalopa, although extractions of the zoea and the megalopa were done separately. A cold anesthesia of all individuals investigated was performed before dissection. Crude DNA was also extracted from four the scraped surface of

R. mangle, and from burrow water samples. For the latter, twenty milliliters of water were centrifuged at 5000g for 5 min and DNA was extracted from the obtained pellet.

DNA extractions were performed using the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Germany) following manufacturer's instructions. DNA from gills of *A. pisonii* and *M. rapax* adults were used as a positive control, while ultra-pure water (H₂O) was used as a negative control. First, we were looking for the presence of bacteria in various samples so PCR were performed with the universal primer set (8F-1492R) to obtain a signal from bacteria. Primer sets (8F-CFB 563R; 8F-ROS 537R targeting the bacterial groups (Cytophaga, Flavobacterium, Bacteroides, and Roseobacter) present in adults of *A. pisonii* and *M. rapax* (Beziat *et al.*, 2021) were also used on these same samples [Weller *et al.*, 2000; Beardsley, 2003] (Tab.4, Sup. data 1). Standard condition was used for PCR, with initial denaturation at 94°C during 4 min, 30 cycles at 94°C during 1 min, at 52°C during 45s, and 72°C during 1.5 min, and final elongation 7 min at 72°C. PCR-positive samples were then used for metabarcoding analyses (Tab.4, see next paragraph).

2.4 Composition of gill-associated bacterial communities based on 16S rRNA-encoding gene sequencing

Metabarcoding analyses were performed on juveniles' gills and environmental samples (burrow waters and *R. mangle* cortex). A~400 bp fragment of the rRNA-encoding gene corresponding to the V4-V5 variable region of *Escherichia coli* was amplified using primers 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') and 926R (5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3') (Parada *et al.*, 2016) and sequenced on an Illumina MiSeq platform (2 X 300 bp, paired-end sequencing, Genoscreen, France). Company-provided mock communities of known composition were used as an internal control for the whole sequencing process.

Sequence analyses were performed using QIIME2 (Hall & Beiko, 2018). Amplicon Sequence Variants (ASV (Callahan *et al.*, 2017)) were identified with DADA2 using default parameters, i.e. a maximal probability for indels of 0.01 and mean read error rate of 0.5% for normalization. DADA2 was also used to identify and remove chimeric sequences. Taxonomic affiliations were obtained by the sklearn-based classifier (Silva 13-2-99 release).

ASV obtained were compared with ASV recently obtained from the gills of adult specimens (Beziat *et al.*, 2021)

2.5 Ultrastructural analysis

For Scanning Electron Microscopy (SEM) observations, samples of eggs from ovigerous females collected in the field, gills of juveniles of both species and gills of the post-molt specimens were used. Juvenile gills used for ultrastructural analysis and metabarcoding analysis are from the same individual.

Tissues were fixed at 4°C in 2.5% glutaraldehyde in 0.8x PBS buffer (pH 7.2) for at least 2 hours. They were then dehydrated in series of acetone solutions of increasing concentration (30°, 50°, 70°, 90°, and 3 times 100°), critical point dried with CO₂ and sputter-coated with gold before observation with a FEI Quanta 250 electron microscope at 20 kV.

3.Results

Results of the different analyses performed on the various samples are summarized in in tab.4.

Tableau 4. Summary of the different analyses performed on the study samples; “nt”: not tested; “+”: presence of bacteria for the sample tested; “-” : no evidence for the presence of bacteria.

| Techniques / Samples | <i>Aratus pisonii</i> | | | | | | <i>Minuca rapax</i> | | | | Environmental samples | |
|------------------------------|-----------------------|-----------|-----------------------|-------------------|----------------|-----------------------|---------------------|-----------|-------------------|----------------|-----------------------|---|
| | Gonads | Eggs | Wild Larvae, megalopa | Laboratory Larvae | Juvenile gills | Molted adult specimen | Gonads | Eggs | Laboratory Larvae | Juvenile gills | Burrow waters | <i>Rhizophora</i> mangrove root's surface |
| Universal PCR (8F-1492R) | - | - | - | - | + | <u>nt</u> | - | - | - | + | + | + |
| PCR (8F-CFB 563R) | - | - | - | - | + | <u>nt</u> | - | - | - | + | + | + |
| PCR (ROS 537 R-8F) | - | - | <u>nt</u> | - | + | <u>nt</u> | - | - | - | + | + | <u>nt</u> |
| Scanning Electron Microscope | <u>nt</u> | - | <u>nt</u> | <u>nt</u> | + | - | <u>nt</u> | <u>nt</u> | <u>nt</u> | + | <u>nt</u> | <u>nt</u> |
| 16s rRNA sequencing | <u>nt</u> | <u>nt</u> | <u>nt</u> | <u>nt</u> | + | <u>nt</u> | <u>nt</u> | <u>nt</u> | <u>nt</u> | + | + | + |

3.1 Analyses of gonads and eggs

PCR amplifications from gonads and eggs of *A. pisonii* and *M. rapax* using the three primers sets were negative despite positive results on controls used (tab.4).

Examination using SEM failed to detect bacterial symbionts on egg's surface of *A. pisonii* (fig.17). These results suggest a very rare occurrence of bacteria on eggs and gonads, below the detection limit of the methods used.

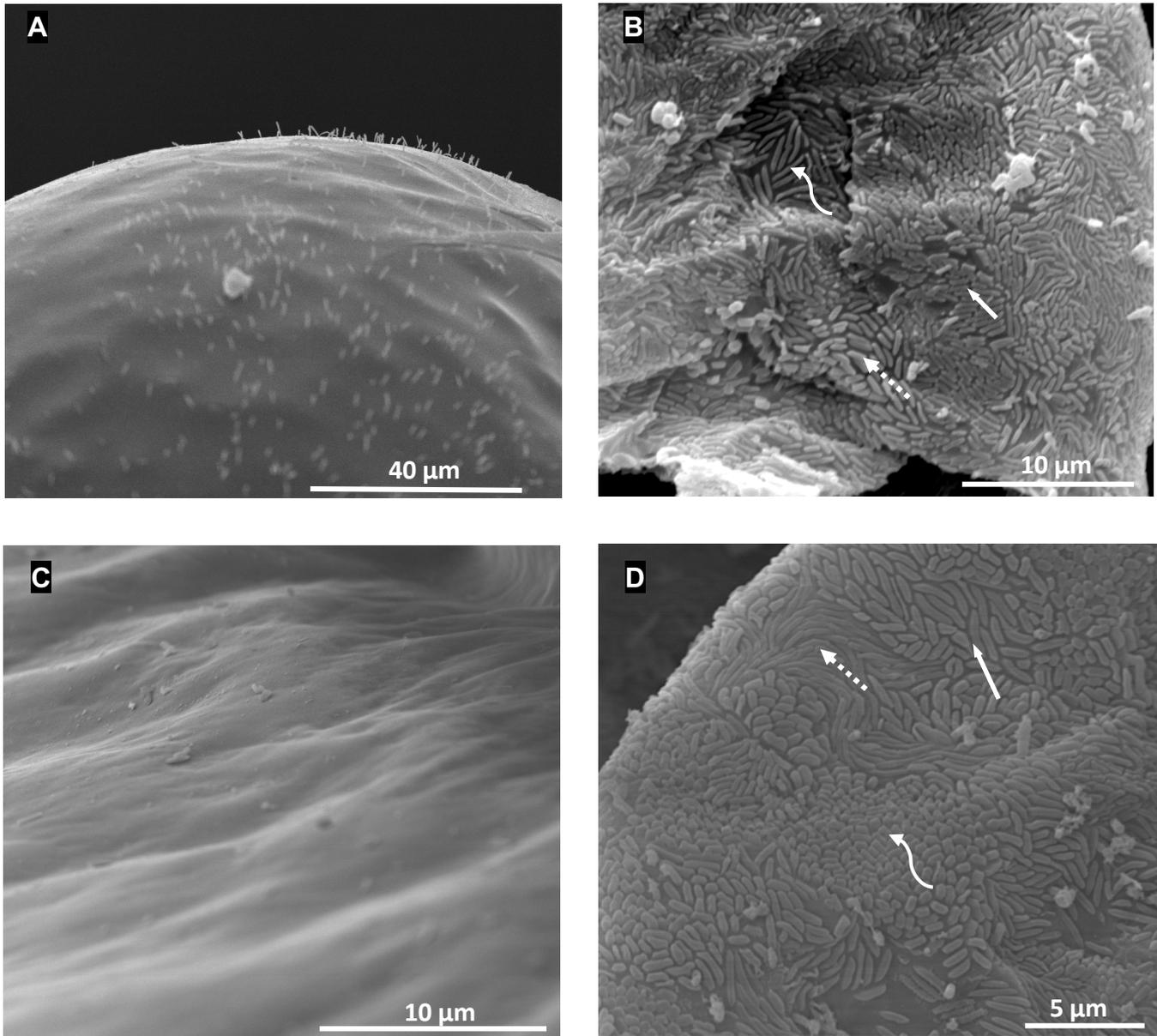


Figure 17. SEM images of eggs, gills after molt (adult) of *A. pisonii*. SEM images in *A. pisonii* and *M. rapax* juveniles. A. Egg surface of *A. pisonii* is devoid of bacteria while presenting several outer cell ornamentations. B. Gill surface *A. pisonii* juveniles covered by three different morphotypes of rod-shaped bacteria, white arrow: short and thin morphotype, white dotted arrow: short and big morphotype, white curved arrow: long morphotype. C. Gill surface of *A. pisonii* individual captured in the field just after molt, no bacteria were seen on the gill lamellae. D. Gill surface of *M. rapax* juveniles covered by three different morphotypes of rod-shaped bacteria, white arrow: big morphotype, with dotted arrow: thin morphotype, curved arrow: short morphotype.

3.2 Analyses on wild and lab-reared larval stages

Larvae of *A. pisonii* collected on the field had a carapace length of $412.8 \pm 62.20 \mu\text{m}$ (n=20). Lab-reared larvae of *A. pisonii* had a carapace length of $332.06 \pm 54.46 \mu\text{m}$ (n=30) and *M. rapax* lab-reared larvae had a carapace length of $323.80 \pm 12.14 \mu\text{m}$ (n=21).

Zoe 1 larval stages obtained in the laboratory were tested just after hatching for both species (fig.18). PCR amplifications with universal and group-specific primer sets were negative in both *A. pisonii* and *M. rapax*. The same results are obtained from *A. pisonii* field-sampled larvae, whatever the stage. Neither zoe stages 1 and 3 nor megalopa tested separately yielded a band in PCR (with any of the three primer sets used).

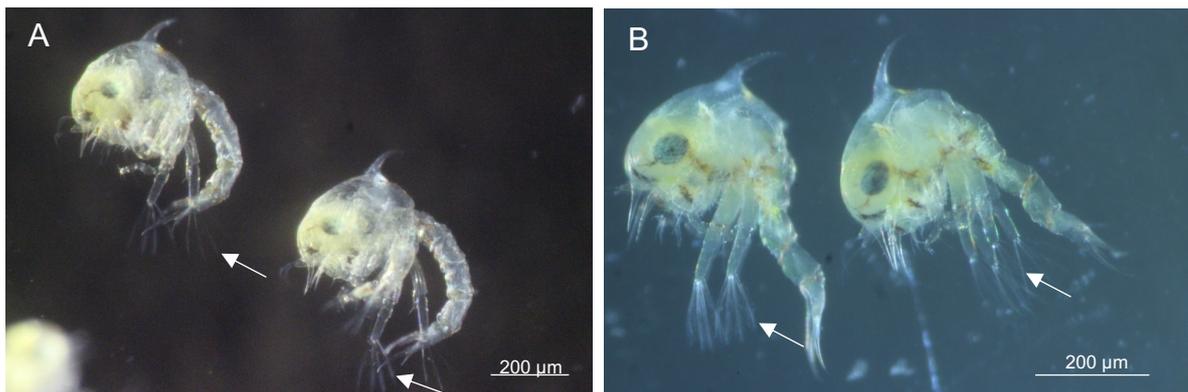


Figure 18. Larvae of *M. rapax* and *A. pisonii* species. First larval stage obtained laboratory culture; A. *Minuca rapax* zoea. and B. *Aratus pisonii* zoe. Eye, the dorsal spin, and the rostral spin are visible on the carapace of the zoe. Also 4 plumose marginal setae are visible at the end of the exopods (white arrow).

3.3 Bacterial communities associated with wild juveniles

The measured juvenile specimens collected from the field had a carapace length (CL) of $5.6 \pm 1.3 \text{ mm}$ for *A. pisonii* and $6.1 \pm 1.6 \text{ mm}$ for *M. rapax*.

Rod-shaped bacteria of different sizes and shapes were present on gill lamellae of juveniles of *A. pisonii* and *M. rapax* (Fig.17 B-D). Three different morphotypes were observed on *A. pisonii*: a short and thin morphotype, a short and large morphotype, and a long morphotype. *M. rapax* also yielded three morphotypes: a big morphotype, a thin morphotype, and a short morphotype. In comparison, the post-molt adult of *A. pisonii* displayed no bacteria on the surface of its gills (Fig.17 C). Positive PCR amplifications with all three primer sets

were obtained from the same *M. rapax* and *A. pisonii* juveniles observed using SEM and collected from the sediment.

Analysis of community compositions based on 16S rRNA V4-V5 sequencing in the two *Aratus pisonii* juveniles yielded 40.699 and 37.207 quality-filtered reads clustering into 65 and 56 ASV, respectively (combined samples: 88 ASV, fig.19). Alphaproteobacteria represented 56 and 58%, and Bacteroidota represented 42 and 40 % of the reads. Seven ASV are abundant (each representing above 1% of the reads) in *A. pisonii*. ARA-juv-1 is the most abundant, with 34% and 40% of the reads in the two specimens; it belongs to the Alphaproteobacteria group and is identical (100% sequence similarity) to an uncultured bacterium found on gills of the mangrove crab *Perisesarma guttatum* (KT944808). ARA-juv-2 represent 13% and 7% on the two specimens, it also belongs to the Alphaproteobacteria, and is 99% similar to an uncultured bacterium found in sediment in Chile (EF632822). ARA-juv-3 to 7 all belong to Bacteroidota group and are similar to environmental sequences obtained from either animal (Ara-juv-3 represent 12% of the reads and is 94% similar to an uncultured bacterium found in the gastropod *Triona metcalfi* (OL862969), Ara-juv-4 represent 7% and 1% of the reads on the two specimens and is 97% similar to an uncultured organism from environmental samples (JN522769). ARA-juv-5 represent 6% and 2% of the reads is 90% similar to an uncultured bacterium found in the sponge *Tethya californiana* [EU290362]) or environmental samples (ARA-juv-6 represent 3% and 6% of the reads and is 89% similar to an uncultured bacterium found in environmental samples (KM456175). ARA-juv-7 represent 3% and 8% of the reads and is 90% similar to an uncultured bacterium found in environmental samples).

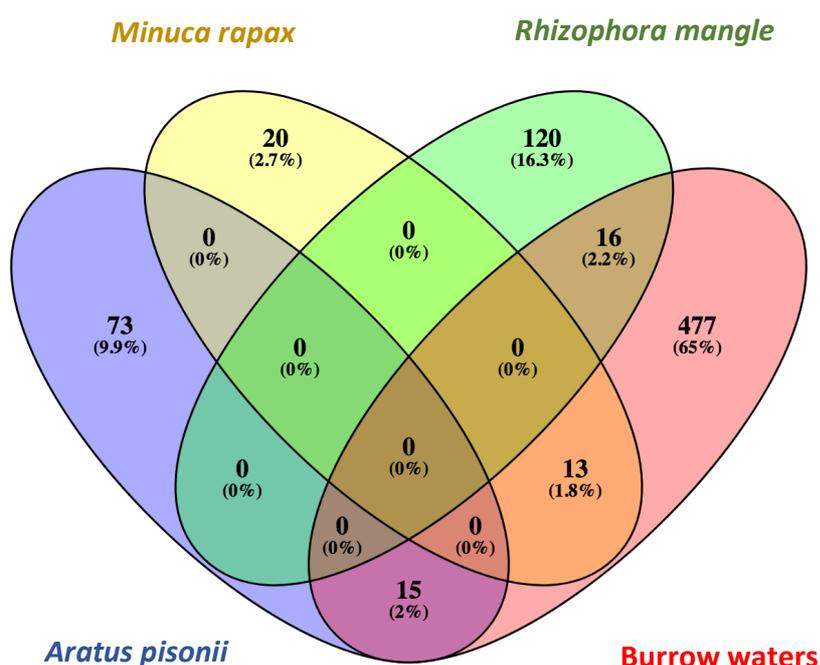


Figure 19. Venn Diagram between *A. pisonii* juvenile gill, *M. rapax* juvenile gill, burrow waters and *Rhizophora mangle* branches sample. Eighty-eight ASV are found on juvenile gills of *Aratus pisonii* (both samples combined), 136 ASV are found on *Rhizophora mangle* surface (both samples combined), 33 ASV are found on *M. rapax* juvenile, and 521 ASV found on burrow waters.

The two *Minuca rapax* juveniles yielded 14.777 and 15.513 quality-filtered reads representing 17 ASV for both samples (combined samples: 32 ASV, fig.19). Alphaproteobacteria represented 84 and 88 % of the reads in the two juveniles examined, respectively. Bacteroidota were below 15% while Actinobacteria represented around 1%. Four ASV are abundant in *M. rapax* juveniles. By far the most abundant ASV is MIN-juv-1, representing 86% of the community in the first individual and 79% of the community in the second one. It corresponds to an Alphaproteobacteria and is 100% identical to an uncultured bacterium found in gills of the crab *Uca urvillei* (KT944883, unpublished). MIN-juv-2 represent 3% of the reads and is present only on one specimen; it belongs to the Bacteroidota group and it is 94% similar to an uncultured bacterium found on macroalgal surface (GU451338). MIN-juv-3 represent 1% and 13% of the reads, it belongs to Bacteroidota group and is 93% similar to an uncultured bacterium found in *Uca urvillei* gills (KT944910, unpublished). MIN-

juv-4 represent 1% of the reads (present only in one sample). It is also a Bacteroidota similar at 92% to an uncultured bacterium found in the gill of the crab *Perisesarma guttatum* (KT944898, unpublished). MIN-juv-5 is an ASV that represents 0.6% of the reads in only one sample. It belongs to the Actinobacteria and is 95% similar to an uncultured bacterium from environmental samples (KF616658). We think this one was interesting to keep because it is found on adult specimens see next paragraph.

No ASV is shared between juveniles of *A. pisonii* and *M. rapax* (fig.19).

3.4 Comparison with communities from tree bark, burrow water, and adult crabs

Two samples of *Rhizophora mangle*, yielded 30,044 and 26,579 quality-filtered reads clustered into 87 and 92 ASV, respectively. Samples were dominated by Rhodothermia (32.8% and 34.4 % of reads) and Actinobacteria (39.3% and 28.6 %, Fig.20). No ASV was shared between *M. rapax* or *A. pisonii* juveniles and *R. mangle* samples (fig.19).

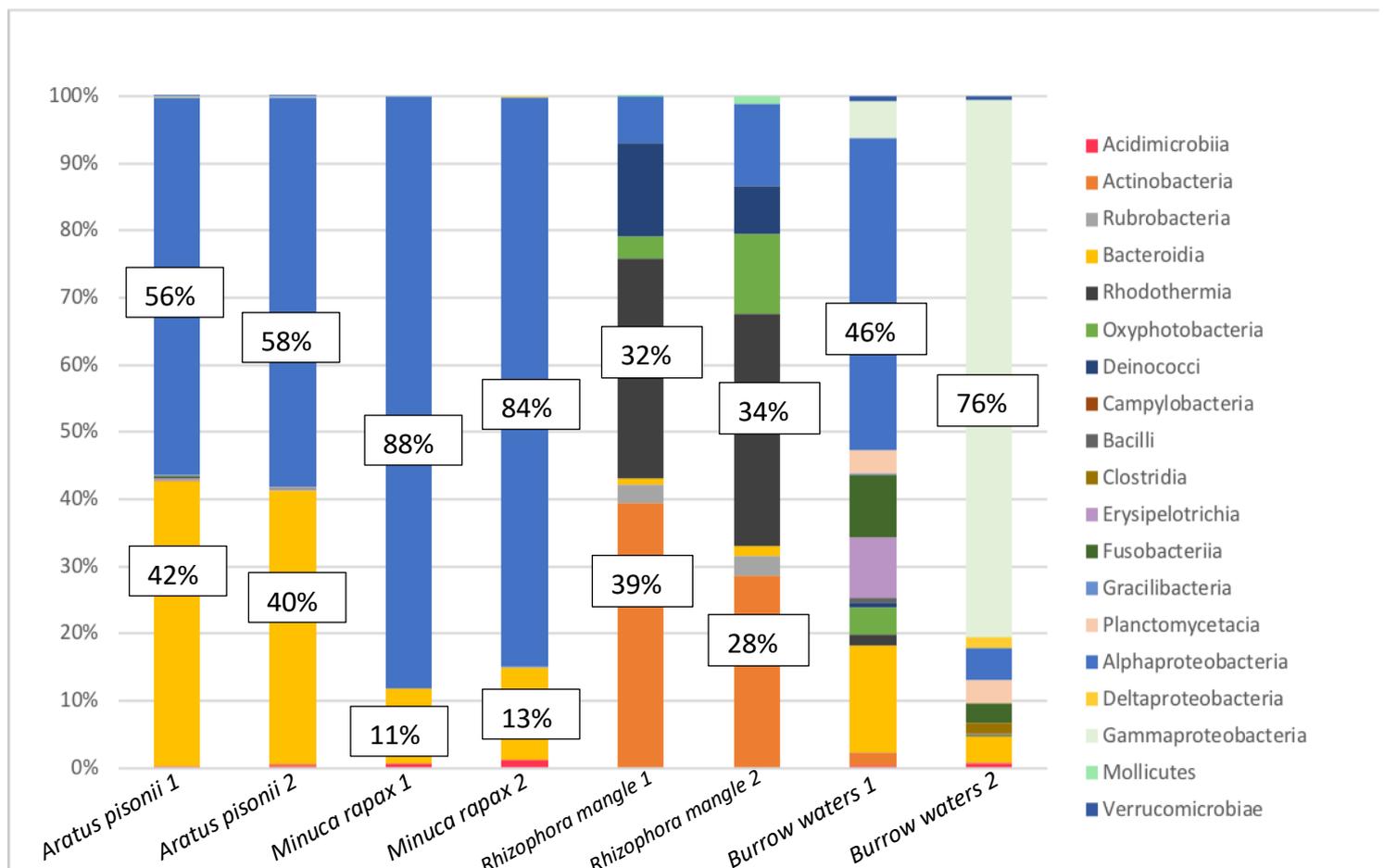


Figure 20. Barplot of showing the proportions of bacterial Phylum of the different samples with percentages of reads

In the two burrow water samples analyzed, 19,186 and 15,704 quality-filtered reads were obtained, clustering into 122 and 402 ASV, respectively. Alphaproteobacteria was the most abundant phylum in one of the samples (46.5% of reads), while the other were dominated by Gammaproteobacteria (76.4% of reads). A total of 15 ASV were shared between burrow waters and *A. pisonii juveniles* (fig 4). 2 of the 7 abundant ASV found in *A. pisonii juveniles*, namely ARA-juv-1 and ARA-juv-2, are 99% similar to 2 ASV found in burrow's waters. ARA-juv-1 was the most abundant ASV on *A. pisonii* juvenile, and represents 10% of reads in burrows water (5 nt different over 372 nt). ARA-juv-2 was similar to one ASV that represent 1% of the reads of burrow waters (2 nt different over 372 nt). The others ASV shared between *A. pisonii* and burrow waters are rare in the latter, representing between 0.01 and 0.4% of the reads on *A. pisonii* samples and 0.05% and 8.7% of the reads on burrow waters samples. These ASV are present only in one sample of burrow waters.

The comparison was then made then with the 5 main ASV previously found in adult *A. pisonii* gills, namely ARA-1,-2,-3,-4,-5 (Beziat *et al.*, 2021). ASV ARA-juv-1 and ARA-Juv-5 are 100 % identical to ARA-1 and ARA-3 obtained in adults, respectively. ARA-juv-1/ARA-1 is the most abundant ASV in both adult and juvenile specimens (34% and 40% of the reads on juvenile samples, and 39% and 21% in adults as reported in Beziat *et al.*, (2021). ARA-juv-5/ARA-3 represent 12% of the reads on juvenile samples (and in adults 19% and 2%). The 3 others main adult ASV (ARA-2, ARA-4 and ARA-5) are present in juvenile gill bacterial communities in low abundances. ARA-2 represents 0.02% and 0.16% of reads in the two juveniles (in adult 32% and 13%); ARA-4 represents 0.13% in the first individual and absent in the other (in adult 1% et 13%); and finally, ARA-5 represents 1.01% and 3.27% of reads (in adults 10% and 2%).

M. rapax juveniles shared 13 ASV with burrow's water samples (Fig.19). The five ASV that are abundant in *M. rapax* juveniles are all found in burrow's water samples. The juvenile-dominant ASV MIN-juv-1 represents 10% of the reads on burrow waters, MIN-juv-2 represents 0.8%, MIN-juv-3 represents 0.3%, MIN-juv-4 represents 0.2% and MIN-juv-5 represents 0.1% of the reads (averaged from the two burrow samples). The others ASV shared between *M. rapax* and burrow waters represent between 0.05% and 2.2% of the reads on *M. rapax* and 0.03% and 7.23% on burrow waters samples. The ASV shared were present only in one burrow waters samples.

The comparison was then made then with the 5 main ASV previously found in adult *M. rapax* gills, namely MIN-1,-2,-3,-4,-5 (Beziat *et al.*, 2021). Two ASV (MIN-juv-4, MIN-juv-5) were 99% similar to MIN-2 and MIN-3 found in adult specimens, respectively (5 and 2 nt differences over 350nt). MIN-juv-4/MIN-2 represent 1% of the reads in juvenile samples, in adults 2% and 20%; MIN-juv-5/MIN3 represent 0.6% of the reads on juvenile samples, versus 15% and 16% in adults (Beziat *et al.*, 2021).

Two others ASV, each rare in *M. rapax* juveniles, were 100% identical to MIN-4 and MIN-2: MIN-2 is identical to one rare ASV found on juvenile that represent 0.09% of the reads. MIN-4 is identical to one rare ASV on the juvenile that represent 0.08% of the reads. These rare ASV were not found in burrow waters samples. MIN-1 and MIN-5 were not found on juvenile.

4 DISCUSSION

Crabs are very important in mangroves and are considered as the engineers of this ecosystem in large part due to their bioturbation action (Kristensen, 2008, Rev.). They consume the litter and allow the availability of organic matter, they recycle the nutrients of the mangrove, they aerate the sediment through their burrowing activity and reduce soil salinity which has an impact on mangrove growth (Smith *et al.*, 2009). They also allow the bioavailability of nitrogen in the environment (Zilius *et al.*, 2020). One study shows that there are symbionts associated with crabs (Beziat *et al.*, 2021); to understand the importance of symbiosis in this ecological role, we need to understand how individuals acquire it.

Gill epibionts are environmentally acquired

Vertical transmission of bacterial symbionts implies the presence of symbionts in the gonads and/or gametes, allowing transfer into embryos and larvae as well, as previously described in the insect *Blattella germanica* (Sacchi *et al.*, 1988) or the bivalve *Solemya reidi* (Cary & Giovannoni, 1993; Krueger *et al.*, 1996) In *Aratus pisonii* and *Minuca rapax*, bacteria were detectable neither in the gonads nor gametes and larvae using PCR with three distinct primer sets, and SEM on eggs of *A. pisonii*. These data support that bacteria are either absent, or present at undetectably low densities at these stages, and thus likely not vertically transmitted.

In the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*, the surface of the eggs is colonized by bacteria (Ávila, 2016) but authors suggested a horizontal transmission mode, these bacteria

being acquired from the environment rather from parents. Later on, in development, bacterial symbionts are absent from the gill cavity of shrimp larvae, supporting that the symbiosis-competent bacteria come from the environment (Guri *et al.*, 2012), in which free-living very close relatives of the major gill-colonizing Campylobacterota are documented to colonize available substrates (Szafranski *et al.*, 2015).

In this present study, gill bacteria are detected in juveniles of mangrove crabs, thus, transmission mode seems to be environmental. Among potential source habitats, *Rhizophora mangle* surface did not share any ASV with crab species. For some organisms whose mode of transmission is environmental, it sometimes happens that some associated symbionts are not found in the living environment (Methou *et al.*, 2019). However, two of the main ASV found in *A. pisonii* juveniles (ARA-juv-1, ARA-juv-2) are highly similar to ASV found in burrow waters. At this level of similarity, we consider them belonging to the same bacterial species. ARA-juv-1 is the main ASV colonizing the juveniles. This implies that the main ASV in *A. pisonii* is found in burrow's water of *Minuca rapax*, suggesting burrow water could be a source of symbiosis-competent bacteria. In *M. rapax*, all 5 major ASV present in juveniles are also present in their burrow's waters. It is thus likely that *M. rapax* juveniles acquire their symbiotic community from the environment. We assume that the acquisition of symbionts in both species occurs after the first molt of megalopa into a young juvenile crab.

Community similarities between juveniles and adults as evidence for host-symbiont fidelity

In a recent study, the main ASV occurring on gills of *A. pisonii* and *M. rapax* were characterized (Beziat *et al.*, 2021). ASV of juveniles (what we call here "the community") were compared to the main ASV of adults of the same species. In the present work, all of the main ASV from adults of *A. pisonii* were found on the juveniles of the same species, two ASV that are predominant in adults are also dominant in juveniles, otherwise the other are rare in juveniles. The most abundant ASV in the adult is also the most abundant in juveniles. For *M. rapax* 3 of the 5 majors adult ASV were present in juveniles, of these three ASV, two are abundant on juvenile, the other is present in low proportion. However, the major ASV in juveniles (Min-juv-1) is absent in adult community, it could be a life-stage specific symbiont. Conservation of major ASV from juveniles to adults is intriguing given that gills of post-molt adults of *A. pisonii* appear devoid of symbiont. In *Rimicaris exoculata*, bacterial symbionts

attached into the gill chamber are also eliminated after each molt and the symbiotic community is reconstituted in the gill chamber gradually (Corbari *et al.*, 2008). A similar process was observed for the lobster *Homarus gammarus*, which gills are re-colonized by filamentous, cocci and rod-shaped bacteria after each molt (Middlemiss *et al.*, 2015). Thus, observation of post-molt *A. pisonii* gills devoid of bacteria suggests a similar recolonization occurring in mangrove crabs. The fact that similar bacteria are found in juveniles and adults despite renewal after molt suggests a level of host-symbiont fidelity through time, as observed in other crustaceans for which post-molt recolonization involves the same bacteria that were present pre-molt (Corbari *et al.*, 2008).

From the juvenile stages on, the bacterial community composition tends towards that observed in adults. This means the bacterial community is not yet 'adult-like' at the first juvenile stages we observed in this study for these crabs. This is similar for the shrimp *R. exoculata*, in which the bacterial community switches throughout the embryonic development and is somewhat influenced by the chemistry of the environment (Guri *et al.*, 2012; Ávila, 2016).

The juveniles of *Aratus pisonii* develop in a different biotope compared to the adults. Indeed *A. pisonii* juveniles share their biotope with juveniles and adults of *Minuca rapax*. Despite this common biotope, juveniles of *A. pisonii* juveniles and *M. rapax* display different associated bacteria. This is not surprising, as even if the environment can also have an effect on the community in certain cases (Noyer *et al.*, 2014), host species is usually a stronger driver of the composition of bacterial community. This was previously observed in the gut microbial community of fresh water shrimps, where less OTU are shared when the host species is different (Tzeng *et al.*, 2015). Zhang *et al.*, (2016) also demonstrated that the constitution of the community depends on the host genetic factors as well as on the different tissue localizations rather than on the environment, indicating that an (unknown) selection mechanism occurs.

5 Conclusion

The absence of symbionts in gonads, gametes, and larvae suggests an environmental acquisition of symbionts in both *Aratus pisonii* and *Minuca rapax*. This hypothesis is supported by the presence of bacteria in juveniles, some of which also occur in burrow water. Colonization of crab gills by bacteria must occur after the megalopa stage. Indeed, depending on the species, gills can be present from the first larval stages (Zoe 1) however, they are often present as undifferentiated gill buds. As development proceeds, the gills become fully developed and functional in the first crab stage obtained after the megalopa (Yang & McLaughlin, 1979; Hong, 1988; Spitzner *et al.*, 2018). Symbiont acquisition is thus probably dependent of the presence of functional gill filaments in the juveniles. We hypothesize that the gills must be completely developed to acquire the symbionts, as observed in the bivalve family Lucinidae (Gros *et al.*, 1996; 1997).

In the future, monitoring gill community compositions throughout hosts life will help better understand the establishment association. For this, being able to follow the development of mangrove crabs after their larval phase in the laboratory would be a highly valuable tool in order to test which environmental sources of bacteria are used, identify the mechanisms of symbiont selection, and decipher the role of gill bacterial symbionts.

Bibliography

Ahmed, M. Z., Breinholt, J. W. and Kawahara, A. Y. (2016) Evidence for common horizontal transmission of Wolbachia among butterflies and moths. *BMC Evolutionary Biology* **16**, 118. doi:10.1186/s12862-016-0660-x.

Ávila, I. H. (2016) Larval dispersal and life cycle in deep-water hydrothermal vents: the case of *Rimicaris exoculata* and related species. PhD Thesis, Université de Bretagne Occidentale.

Beardsley, C. (2003). *In situ dynamics and predator-prey interactions in the microbial plankton of the North Sea* (Doctoral dissertation, Universität Bremen Bremen).

Béziat, N. S., Duperron, S., Halary, S., Azede, C., & Gros, O. (2021). Bacterial ectosymbionts colonizing gills of two Caribbean mangrove crabs. *Symbiosis*, *85*(1), 105-114.

Booth, J. (2018) Ecology of the Mangrove Microbiome. PhD Thesis, King Abdullah University of Science and Technology 322p. <https://repository.kaust.edu.sa/handle/10754/628044>

Bright, M. and Bulgheresi, S. (2010) A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nature reviews. Microbiology* **8**, 218–230.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J. and Holmes, S. P. (2017) Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME Journal* **11**, 2639–2643.

Cary, S. C. (1994) Vertical transmission of a chemoautotrophic symbiont in the protobranch bivalve, *Solemya reidi*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3**, 121–130.

Cary, S. C. and Giovannoni, S. J. (1993) Transovarial inheritance of endosymbiotic bacteria in clams inhabiting deep-sea hydrothermal vents and cold seeps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 5695–5699.

Corbari, L., Cambon-Bonavita, M.-A., Long, G. J., Grandjean, F., Zbinden, M., Gaill, F. and Compère, P. (2008) Iron oxide deposits associated with the ectosymbiotic bacteria in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *Biogeosciences* **5**, 1295–1310.

Distel, D. L. (1998) Evolution of chemoautotrophic endosymbioses in bivalves. *BioScience* **48**, 277–286.

Dubilier, N., Bergin, C. and Lott, C. (2008) Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nature Reviews. Microbiology* **6**, 725–740.

Goffredi, S. K., Jones, W. J., Erlich, H., Springer, A. and Vrijenhoek, R. C. (2008) Epibiotic bacteria associated with the recently discovered Yeti crab, *Kiwa hirsuta*. *Environmental Microbiology* **10**, 2623–2634.

Gros, O., Darrasse, A., Durand, P., Frenkiel, L. and Mouëza, M. (1996) Environmental transmission of a sulfur-oxidizing bacterial gill endosymbiont in the tropical lucinid bivalve

Codakia orbicularis. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2324–2330.

Gros, O., Frenkiel, L. and Mouëza, M. (1997) Embryonic, larval, and post-larval development in the symbiotic clam *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). *Invertebrate Biology* **116**, 86–101.

Gros, O., De Wulf-Durand, P., Frenkiel, L. and Mouëza, M. (1998) Putative environmental transmission of sulfur-oxidizing bacterial symbionts in tropical lucinid bivalves inhabiting various environments. *FEMS Microbiology Letters* **160**, 257–262.

Guri, M., Durand, L., Cueff-Gauchard, V., Zbinden, M., Crassous, P., Shillito, B. and Cambon-Bonavita, M.-A. (2012) Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *The ISME Journal* **6**, 597–609.

Hall, M. and Beiko, R. G. (2018) 16S rRNA Gene analysis with QIIME2. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **1849**, 113–129.

Hong, S. (1988) Development of epipods and gills in some pagurids and brachyurans. *Journal of Natural History* **22**, 1005–1040.

Itoh, H., Aita, M., Nagayama, A., Meng, X.-Y., Kamagata, Y., Navarro, R., Hori, T., Ohgiya, S. and Kikuchi, Y. (2014) Evidence of environmental and vertical transmission of Burkholderia symbionts in the oriental chinch bug, *Cavelerius saccharivorus* (Heteroptera: Blissidae). *Applied and Environmental Microbiology* **80**, 5974–5983.

Kristensen, E. (2008) Mangrove crabs as ecosystem engineers; with emphasis on sediment processes. *Journal of Sea Research* **59**, 30–43.

Krueger, D. M., Gustafson, R. G. and Cavanaugh, C. M. (1996) Vertical transmission of chemoautotrophic symbionts in the bivalve *Solemya velum* (Bivalvia: Protobranchia). *The Biological Bulletin* **190**, 195–202.

Martin, B. and Schwab, E. (2012) Symbiosis: 'Living together' in Chaos. *Studies in history of biology* **4**, 7–25.

McFall-Ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C. G., Carey, H. V., Domazet-Lošo, T., Douglas, A. E., Dubilier, N., Eberl, G., Fukami, T., Gilbert, S. F., Hentschel, U., King, N., Kjelleberg, S., Knoll, A. H., Kremer, N., Mazmanian, S. K., Metcalf, J. L., Neelson, K., Pierce, N. E., Rawls, J. F., Reid, A., Ruby, E. G., Rumpho, M., Sanders, J. G., Tautz, D. and Wernegreen, J. J. (2013) Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 3229–3236.

Methou, P., Hernández-Ávila, I., Aube, J., Cueff-Gauchard, V., Gayet, N., Amand, L., Shillito, B., Pradillon, F. and Cambon-Bonavita, M.-A. (2019) Is it first the egg or the shrimp? – Diversity and variation in microbial communities colonizing broods of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* during embryonic development. *Frontiers in Microbiology* **10**,.

Middlemiss, K. L., Urbina, M. A. and Wilson, R. W. (2015) Microbial proliferation on gill structures of juvenile European lobster (*Homarus gammarus*) during a moult cycle. *Helgoland Marine Research* **69**, 401–410.

Noyer, C., Casamayor, E. O. and Becerro, M. A. (2014) Environmental heterogeneity and microbial inheritance influence sponge-associated bacterial composition of *Spongia lamella*. *Microbial Ecology* **68**, 611–620.

Nyholm, S. V. and McFall-Ngai, M. (2004) The winnowing: establishing the squid– vibrio symbiosis. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 632–642.

Sacchi, L., Grigolo, A., Mazzini, M., Bigliardi, E., Baccetti, B. and Laudani, U. (1988) Symbionts in the oocytes of *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae): Their mode of transmission. *International Journal of Insect Morphology and Embryology* **17**, 437–446.

Smith, D. C. and Douglas, A. E. (1987) The biology of symbiosis. *The biology of symbiosis*.

Smith, N. F., Wilcox, C. and Lessmann, J. M. (2009) Fiddler crab burrowing affects growth and production of the white mangrove (*Laguncularia racemosa*) in a restored Florida coastal marsh. *Marine Biology* **156**, 2255–2266.

Spitzner, F., Meth, R., Krüger, C., Nischik, E., Eiler, S., Sombke, A., Torres, G. and Harzsch, S. (2018) An atlas of larval organogenesis in the European shore crab *Carcinus maenas* L. (Decapoda, Brachyura, Portunidae). *Frontiers in Zoology* **15**, 27.

Szafranski, K. M., Deschamps, P., Cunha, M. R., Gaudron, S. M. and Duperron, S. (2015) Colonization of plant substrates at hydrothermal vents and cold seeps in the northeast Atlantic and Mediterranean and occurrence of symbiont-related bacteria. *Frontiers in Microbiology* **6**.

Thurber, A. R., Jones, W. J. and Schnabel, K. (2011) Dancing for food in the deep sea: bacterial farming by a new species of Yeti Crab. *PLOS ONE* **6**, e26243.

Tsuchida, S., Suzuki, Y., Fujiwara, Y., Kawato, M., Uematsu, K., Yamanaka, T., Mizota, C. and Yamamoto, H. (2011) Epibiotic association between filamentous bacteria and the vent-associated galatheid crab, *Shinkaia crosnieri* (Decapoda: Anomura). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **91**, 23–32.

Tzeng, T.-D., Pao, Y.-Y., Chen, P.-C., Weng, F. C.-H., Jean, W. D. and Wang, D. (2015) Effects of host phylogeny and habitats on gut microbiomes of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*). *PLOS ONE* **10**, e0132860.

Vautrin, E. and Vavre, F. (2009) Interactions between vertically transmitted symbionts: cooperation or conflict? *Trends in Microbiology* **17**, 95–99.

Yang, W. T. and McLaughlin, P. A. (1979) Development of the epipodite of the second maxilliped and gills in *Libinia erinacea* (Decapoda, Brachyura, Oxyrhyncha). *Crustaceana. Supplement* 47–54.

Zbinden, M., Shillito, B., Le Bris, N., de Villardi de Montlaur, C., Roussel, E., Guyot, F., Gaill,

F. and Cambon-Bonavita, M.-A. (2008) New insights on the metabolic diversity among the epibiotic microbial community of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **359**, 131–140.

Zhang, M., Sun, Y., Chen, L., Cai, C., Qiao, F., Du, Z. and Li, E. (2016) Symbiotic bacteria in gills and guts of chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) differ from the free-living bacteria in water. *PLOS ONE* **11**, e0148135.

Zilius, M., Bonaglia, S., Broman, E., Chiozzini, V. G., Samuiloviene, A., Nascimento, F. J. A., Cardini, U. and Bartoli, M. (2020) N₂ fixation dominates nitrogen cycling in a mangrove fiddler crab holobiont. *Scientific Reports* **10**, 13966.

Zimmermann, B. L., Cardoso, G. M., Bouchon, D., Pezzi, P. H., Palaoro, A. V. and Araujo, P. B. (2021) Supergroup F Wolbachia in terrestrial isopods: Horizontal transmission from termites? *Evolutionary Ecology* **35**, 165–182.

Chapitre 5 : Analyse métabolomique des communautés bactériennes associées aux branchies des crabes de mangrove, *A. pisonii* et *M. rapax*

Synthèse du chapitre 5 : Analyse métabolomique des communautés bactériennes associées aux branchies des espèces de mangrove *A. pisonii* et *M. rapax*

Les associations symbiotiques sont très étudiées dans le monde du vivant, en effet, les organismes s'associent dans le but de tirer un bénéfice de la relation. C'est l'un des critères les plus importants permettant de caractériser une relation symbiotique. Cependant, le but de l'association peut être difficile à identifier. Les rôles décrits pour les symbioses concernent le plus souvent l'aspect trophique. Le symbiote participe à la nutrition et au développement de l'hôte en lui transférant des composés essentiels ou en transférant le carbone fixé issu de sa production primaire, c'est le cas des méduses *Cassiopea xamachana* associées à des algues photosynthétiques (Freeman *et al.*, 2016) ou encore du bivalve *Lucinoma aequizonata* associé à des bactéries chimiotrophes (Distel *et al.*, 1988). Chez les crustacés, plusieurs études décrivent des bactéries se développant sur la carapace de plusieurs espèces de crevettes et de crabes de sources hydrothermales. Un rôle nutritif a aussi été identifié pour les symbiotes associés aux crevettes du genre *Rimicaris* et a été supposé pour les galathées *Shinkaia croisnieri* et *Kiwa hirsuta* (Tsuchida *et al.*, 2011 ; Ponsard *et al.*, 2013). En milieu côtier, des bactéries sont présentes sur les branchies de plusieurs espèces de crabes. Cette association a été décrite sur des crabes en Asie, en Afrique ainsi qu'en Guadeloupe, notamment sur les espèces de mangrove *A. pisonii* et *M. rapax* (Booth, 2018 ; Béziat *et al.*, 2021). Cette association ne semble pas être aléatoire. Nous avons donc entrepris d'identifier les métabolites secondaires présents dans les tissus branchiaux en utilisant une technique de chromatographie gazeuse bidimensionnelle complète (GCxGC), couplée à la spectrométrie de masse en temps de vol (TOFMS) sur 4 espèces de crabes.

Trois espèces de crabes de mangrove semi-marins de Guadeloupe (*Aratus pisonii*, *Minuca rapax*, *Ucides cordatus*) et une espèce de crabe exclusivement marine (*Percnon gibbesi*) ont été analysées. L'objectif de cette étude est de tester l'efficacité de la technique de métabolomique proposée concernant l'identification des métabolites secondaires (dans les branchies de crabes) qui pourraient avoir un rôle dans l'interaction hôte/symbiotes.

Aratus pisonii et *M. rapax* ont été récoltés sur 3 sites différents tandis qu'*U. cordatus* et *P. gibbesi* ont été collectés chacun sur un seul site spécifique à chaque espèce. Trois individus par espèces ont été analysés.

Un total de 24 échantillons de branchies a été lyophilisé et utilisé pour les analyses métabolomiques (GCxGC-TOFMS).

Les fonctions de comparaison statistique de ChromaTOF® (LECO Instruments, USA) ont été utilisées pour aligner les tableaux de pics sur la base des temps de rétention et des spectres de masse. Les outils de script ChromaTOF® ont également été utilisés pour traiter les chromatogrammes afin d'identifier les familles de composés.

Les échantillons ont été évalués en fonction du nombre de pics, des pics communs, de la surface totale des pics (TPA), de la surface totale des pics utiles par classe (C-TUPA), et les identifications provisoires des métabolites ont été basées sur les informations du spectre de masse et l'indice de rétention (RI) de première dimension. Cette analyse a été réalisée à l'aide de Microsoft Excel 2013 et a consisté à sélectionner les métabolites d'intérêt.

De plus, des échantillons de branchies des espèces *U. cordatus* et *P. gibbesi* ont été préparés pour une observation au microscope électronique à balayage (MEB).

L'observation au MEB a permis de confirmer la présence de bactéries en forme de bâtonnets formant un tapis bactérien sur les lamelles branchiales de ces deux espèces.

L'analyse métabolomique a permis l'identification de plus de 2000 pics, chaque pic représentant un métabolite. La majorité des pics correspondent à des métabolites primaires comprenant des acides aminés, des acides gras, des sucres ..., les métabolites secondaires correspondent essentiellement à des terpenoïdes. Cette méthode a permis d'identifier 18 métabolites secondaires comme étant importants dans la relation symbiotique. Parmi ces 18 composés, trois ont été retenus. La cycloserine, la trigonelline et l'amphétamine. La cycloserine a été retrouvée chez toutes les espèces étudiées, concernant l'espèce *A. pisonii* elle est retrouvée en très faible quantité sur 2 sites parmi les 3 analysés. C'est une molécule antimicrobienne d'origine bactérienne, produite par les bactéries du genre *Streptomyces* et par *Pseudomonas fluorescens* (Shoji *et al.*, 1984). Ces bactéries ne sont pas retrouvées dans la communauté branchiale des espèces de crabe de *A. pisonii* et *M. rapax*, les communautés bactériennes de *P. gibbesi* et *U. cordatus* étant encore inconnues (Beziat *et al.*, 2021). Les bactéries présentes sur les branchies des crabes sont cependant à l'origine de la production de cycloserine.

La trigonelline, a été retrouvée chez toutes les espèces peu importe le site de collecte sauf chez *Ucides cordatus*. C'est aussi un antibiotique qui a été isolé de la plante *Trigonella foenum-graecum* et qui est naturellement présent chez les crustacés (Anwar *et al.*, 2018 ; Suwetja *et*

al., 1989). La « production » de cet antimicrobien par l'hôte pourrait lui permettre de contrôler la population bactérienne présente sur ses branchies.

Enfin, l'amphétamine est présente chez toutes les espèces sur tous les sites de collection. Ce composé a été reporté comme psychostimulant chez les écrevisses et est naturellement retrouvé dans les muscles d'autres crustacés (van Staaden *et al.*, 2011 ; Yuan *et al.*, 2020).

Les prochaines analyses ont été réalisées sur plusieurs tissus de plusieurs espèces de crabes afin de déterminer l'origine des différents composés.

Cette approche démontre l'intérêt de la métabolomique non ciblée pour identifier des molécules d'intérêt dans les branchies des crabes, qui pourraient intervenir dans la symbiose.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography Open

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcoa

Metabolomic analysis of secondary metabolites from Caribbean crab gills using comprehensive two-dimensional gas chromatography - time-of-flight mass spectrometry—New inputs for a better understanding of symbiotic associations in crustaceans

Kieran Tarazona Carrillo^a, Naëma S. Béziat^{b,c}, Gerardo Cebrián-Torrejón^{d,e}, Olivier Gros^{b,e}, A. Paulina de la Mata^a, James J. Harynuk^{a,*}

^a Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

^b Institut de Systématique, Evolution, Biodiversité (ISYEB), Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS, Sorbonne Université, EPHE, Université des Antilles, Campus de Fouillole, 97110 Pointe-à-Pitre, France

^c Caribaea Initiative, Université des Antilles, Guadeloupe, France

^d COVACHIM-M2E Laboratory EA 3592, Department of Chemistry, Fouillole Campus, University of the French West Indies, UFR Sciences Exactes et Naturelles, CEDEX, 97157 Pointe-à-Pitre, France

^e C3MAG, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, Université des Antilles, BP 592 - 97159 Pointe-à-Pitre, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Crustaceans
Secondary metabolites
Symbiotic relationships
GC×GC
Derivatization

ABSTRACT

Secondary metabolites are bioactive compounds produced by living organisms that can be indicative of symbiotic relationships in nature. Prior studies have demonstrated putative symbiotic interactions between decapod crabs and epibiotic bacteria in their environment. This study presents a sample preparation protocol for metabolomics analysis of lyophilized crab gill samples from four brachyuran crab species inhabiting different regions of Guadeloupe, Lesser Antilles. Sample extracts were prepared using a two-step methoximation-trimethylsilylation derivatization protocol and analyzed by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (GC×GC-TOFMS). Three main secondary metabolites identified in the crab gills and discussed herein include cycloserine, trigonelline, and amphetamine. Cycloserine is a bacterial-produced metabolite with antibiotic properties, and along with the antimicrobial activity of trigonelline, these compounds may influence the microbial community of the crabs and/or protect them from bacterial infection in the frame of the symbiotic relationships. Amphetamine is a psychostimulant that has been previously detected in crab muscles, and has been found in crab gills in this study. Cycloserine was present in the gills of *Ucides cordatus* and *Percnon gibbesi*, trigonelline was present in all crabs except *Ucides cordatus*, and amphetamine was detected in all crab gill samples. Further research into these secondary metabolites is facilitated with the sample preparation protocol and can elucidate the various symbiotic interactions of crabs and their microbiome; potentially for other crustaceans as well.

1. Introduction

Symbiotic associations are common in the living world. These associations generally confer a benefit to at least one actor involved in such an association. The most described roles concern either nutrition or an ecological advantage for the host. For example, the jellyfish *Cassiopea xamachana* lives in association with unicellular algae belonging to the genus *Symbiodinium* which transfers 95% of the carbon it fixes by photosynthesis to the host [1]. The association between the tropical bivalve *Codakia orbicularis* and sulfur-oxidizing bacterial gill-endosymbionts allows this

mollusk to colonize an ecological niche initially toxic for other eukaryotic organisms and access to 90% of the carbon fixed by its symbionts [2] as for all lucinids described. Crustaceans represent the least-studied group in terms of symbiosis. Some interactions are studied in shrimp and crabs from hydrothermal vents [3,4] even if the role of the symbiotic association is not always easy to identify. Concerning the crab *Shinkaia croisneri* the presence of ectosymbionts is not fully justified [4] even if the authors assume a role in nutrition. Recent studies describe symbiotic relationships between crabs from African and Asian areas and epibiotic bacteria [5]. Bacterial ectosymbionts are also present on the surface of gill lamellae of two species of crabs living in the Caribbean [6]. This phenomenon seems to arise in several species but the role of such bacterial symbionts remains unknown. Secondary metabolites may be the key to understanding the role of these bacterial symbionts and their

* Corresponding author.

E-mail address: james.harynuk@ualberta.ca (J.J. Harynuk).

<https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2022.100069>

Received 25 August 2022; Received in revised form 9 November 2022; Accepted 12 November 2022

2772-3917/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

influence on the host. These bioactive molecules were previously considered non-essential [7,8], and although they do not pertain to primary metabolism, they have been found to play important roles in symbiotic relationships [7–9]. Interactions between marine invertebrates and symbiotic microbes have inspired further research into antibiotic discovery as several secondary metabolites produced by these microbes have antimicrobial properties [10–14]. Despite the growing attention, research on the source of these metabolites and their importance in symbiosis is limited or not widely available [15].

Gas chromatography (GC) has been widely used for studying metabolites in biological samples [16,17]. In cases when samples are not complex, metabolite separation can be optimized for GC analysis. The metabolite profiles of many biological samples, including crab gills, are far more complex, containing thousands of compounds, and thus making adequate one-dimensional separation challenging [18–21]. Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) is far superior compared to conventional one-dimensional GC with enhanced sensitivity, resolution, and separation power [19,20], making it an ideal technique for analyzing primary and secondary metabolites from crab gills. Metabolites from crab gill samples have been analyzed by GC coupled to mass spectrometry (MS) detection, following a chemical derivatization protocol [22–26].

Derivatization is used to increase the volatility, chromatographic performance, and thermal stability of polar metabolites [16,27]. Of the various types of derivatization methods available for GC-based analyses, the two-step methoximation-trimethylsilylation is the most widely used for metabolomics as it provides a greater coverage of metabolites containing hydroxyl, carboxyl, amine, amide, and thiol functional groups [16,17,27]. Herein, we compare the standard crab gill preparation protocol to a similar liquid extraction and chemical derivatization protocol developed for this study. We also evaluate the methods for analysis of crab gills by GC×GC coupled to time-of-flight mass spectrometry (TOFMS).

The objective of this study was to investigate the primary and secondary metabolites produced in the gills of a few crabs from a mangrove environment and a marine species living in reefs using GC×GC-TOFMS. Having an idea of the compounds associated with the gills would give information on the true relationship existing between the two partners of the association (mutualism or parasitism).

2. Materials and methods

2.1. Sites of collection

Four species of brachyuran crabs were collected at different locations in Guadeloupe (Table 1, Fig. 1), Lesser Antilles. Three species were semi-marine crabs from mangrove environment. *Aratus pisonii* (Milne Edwards, 1837), a tree-climbing crab living on branches/roots of the mangrove tree *Rhizophora mangle* (Linnaeus, 1753), *Minuca rapax* (Smith, 1870), and *Ucides cordatus* (Linnaeus 1763), both running and/or burrowing on mangrove sediment. The last species studied was *Percnon gibbesi* (H. Milne-Edwards, 1853) an exclusive marine crab living in coral reefs associated with the sea urchin *Diadema antillarum* (Philippi, 1845).

Table 1
Species studied and their location.

| Crab species | Site of collection | Samples |
|-------------------------------|----------------------|---------|
| <i>Aratus pisonii</i> (AP) ★ | Manche à Eau (AP-ME) | 3 |
| | Marina (AP-M) | 3 |
| | Pointe Sable (AP-PS) | 3 |
| <i>Minuca rapax</i> (MR) ▲ | Ilet Cochon (MR-IC) | 3 |
| | Pointe Sable (MR-PS) | 3 |
| | Manche à Eau (MR-ME) | 3 |
| <i>Ucides cordatus</i> (UC) ■ | Goyave (UC-G) | 3 |
| <i>Percnon gibbesi</i> (PG) ● | Port-Louis (PG-PL) | 3 |

2.2. Sample preparation and analysis

At least three individuals per site were used and cold anesthesia was applied to all individuals before gill dissection from the cavity with forceps. The gills of each individual were weighed (minimum of 0.1 g of gill tissue) before being placed into microtubes. For small species, two individuals were used to reach the minimum weight of 0.1 g of gill tissue. All gill samples were then lyophilized and stored at 4 °C for 128 days prior to extraction for analyses by GC×GC-TOFMS. A preliminary study was conducted to compare the current standard crab gill sample preparation method [22,23,28] and a method inspired by metabolomic analyses of other aquatic organisms [29–32] in order to maximize the metabolite coverage (Supplementary Information 1). The selected method is described below. In total 24 samples were analyzed in this study in addition to a pooled quality control (QC) sample, and quality assurance (QA) samples, including sample replicates, instrument blanks and reagent blanks. Fig. 2 shows the sample preparation workflow diagram.

2.3. Chemicals

HPLC grade methanol (>99.9%, Millipore Sigma, Canada), ACS grade chloroform (Fisher Scientific, Canada), and 18.2 MΩ deionized MilliQ water from an Elga PURELAB Flex 3 system (VWR International, Canada) were used for the extraction solvent mixture. Internal standard (IS) was ⁴13C methylmalonic acid (Millipore Sigma, Canada). Cycloserine (Millipore Sigma, Canada) was used for positive identification of this metabolite (SI1). Anhydrous sodium sulfate (Millipore Sigma, Canada) was used to dry HPLC grade toluene (Millipore Sigma, Canada) prior to derivatization. The derivatization reagents were methoxyamine hydrochloride (Millipore Sigma, Canada) prepared in HPLC grade pyridine (Millipore Sigma, Canada), and N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide + 1% trichloromethylsilane (MSTFA + 1% TMCS) (Fisher Scientific, Canada).

2.4. Extraction

The 24 lyophilized crab gill samples were weighed (11–12 mg) into 2 mL Eppendorf SafeLock tubes (Eppendorf Canada Ltd., Canada) for extraction. Three beads (2.38 mm metal beads, Qiagen, Canada) and 30 µL of the internal standard ⁴13C methylmalonic acid (100 mg/L in water) were added to each sample prior to extraction. The extraction solvent for each sample consisted of 600 µL MeOH:H₂O (4:1 v/v) and 120 µL of CHCl₃. The samples were homogenized by bead beating for 2 min after addition of the solvents, followed by vortexing for 2 min and sonication for 10 min to extract. The extracts were centrifuged at 10,000 g for 10 min, and 300 µL of the supernatant was transferred to 2 mL vials (Chromatographic Specialties Inc., Canada) and dried at 40 °C under nitrogen (099A EV2412S Glas-Col Heated Analytical Evaporator, Cole-Parmer, Canada) until dry, followed by storage at –80 °C prior to derivatization.

2.5. Derivatization

A 100 µL aliquot of toluene dried with anhydrous sodium sulfate was added to each of the extracts which were then dried under nitrogen at 50 °C to remove any traces of water. The samples were derivatized in two steps: methoximation followed by trimethylsilylation. Methoximation was performed by adding 50 µL of methoxyamine hydrochloride (20 mg/mL in pyridine) into each sample vial and vortexing for 10 s. Samples were incubated for 1 h at 60 °C then cooled for 5 min. Trimethylsilylation was achieved by adding 80 µL of MSTFA + 1% TMCS to each sample and vortexing for 10 s, samples were incubated for 1 h at 40 °C. After a 5 min cooling, the derivatized samples containing a white precipitate (due to salt) were transferred to 300 µL glass insert vials (Chromatographic Specialties Inc., Canada) and centrifuged at 1000 g

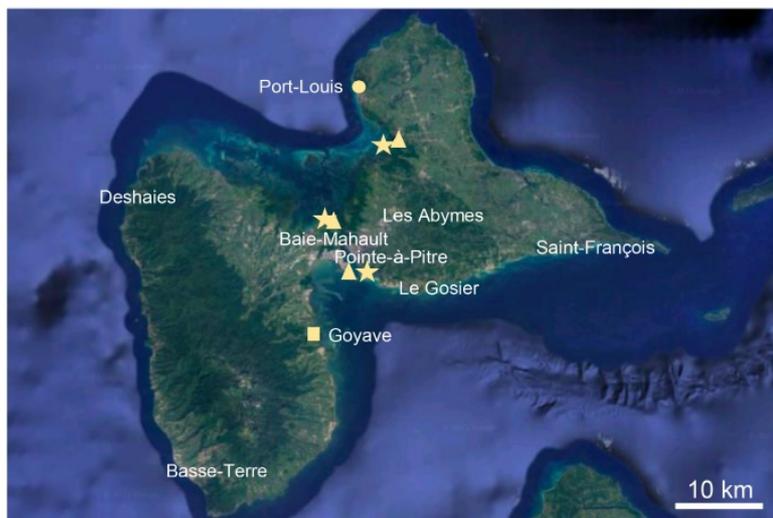


Fig. 1. Sites of collection of the four studied crab species. Map of Guadeloupe indicating major landmarks and locations where crabs were obtained.

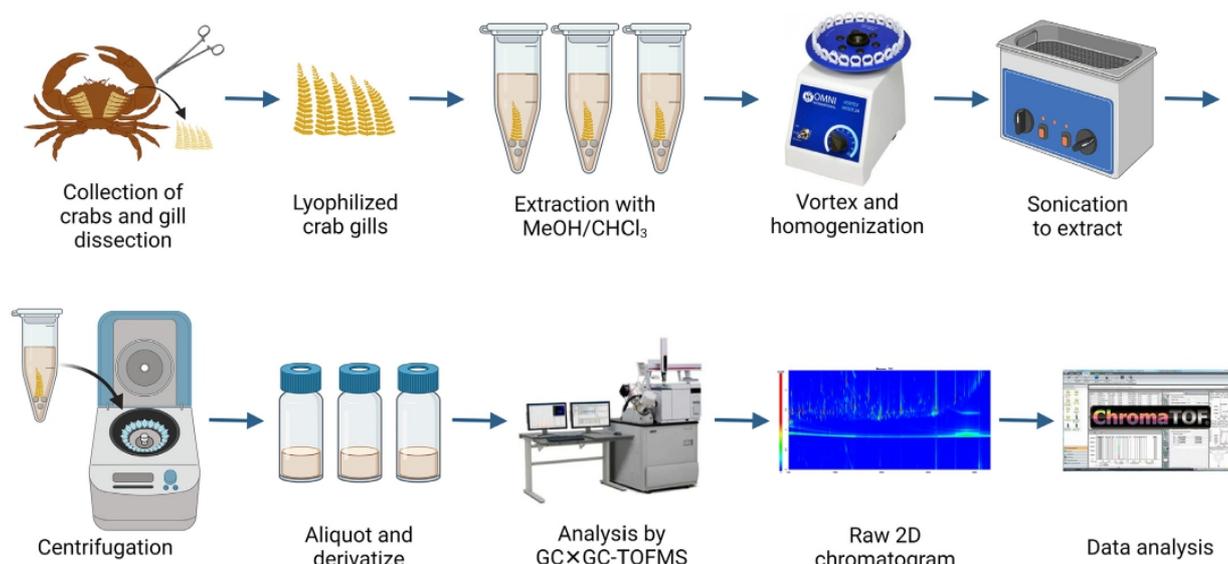


Fig. 2. Workflow diagram of the lyophilized crab gills analyzed by GC×GC-TOFMS. Created with BioRender.com

for 1 min. The supernatants were transferred to new glass insert vials for analysis.

2.6. GC×GC-TOFMS method

The analyses were performed using a LECO Pegasus 4D GC×GC-TOFMS (LECO Instruments, USA) with a cooled injection System (Gerstel, USA) and liquid injection using a MultiPurpose Sampler (MPS; Gerstel, USA). The first-dimension column was a 60 m × 0.25 mm × 0.25 μm Rxi-5SilMS, and second-dimension a 1.2 m × 0.25 mm × 0.25 μm Rxi-200MS (Chromatographic Specialties, Canada). Ultra-pure helium (5.0 grade; Praxair Canada Inc., Canada) was used as the carrier gas, with a constant flow rate of 2.0 mL/min. Injection was splitless, using a split/splitless liner (Chromatographic Specialties, Canada), and an injection volume of 0.5 μL with the inlet temperature of 250 °C. The instrument conditions were used as described by Nam et al. for the GC and

MS methods [33]. Briefly, the temperature program of the primary oven began at 80 °C, held for 4 min, followed first by a ramp of 3.5 °C/min to a temperature of 315 °C held for 10 min. The secondary oven and modulator temperature offset were constant at +10 °C and +15 °C respectively. The modulation period was 2.5 s. Mass spectra were collected at an acquisition rate of 200 Hz over a mass range between 40 and 800 m/z. The detector voltage was 1700 V with an electron impact energy of −70 eV. The ion source temperature was 200 °C and the transfer line temperature was 225 °C.

2.7. Data processing and analysis

GC×GC-TOFMS data were processed using ChromaTOF® (v.4.72; LECO Instruments, USA). The baseline offset was set to 0.9 above the middle of the noise. The minimum S/N ratio for base- and sub-peaks were set at 100:1 and 6:1, respectively, and the mass spectral match re-

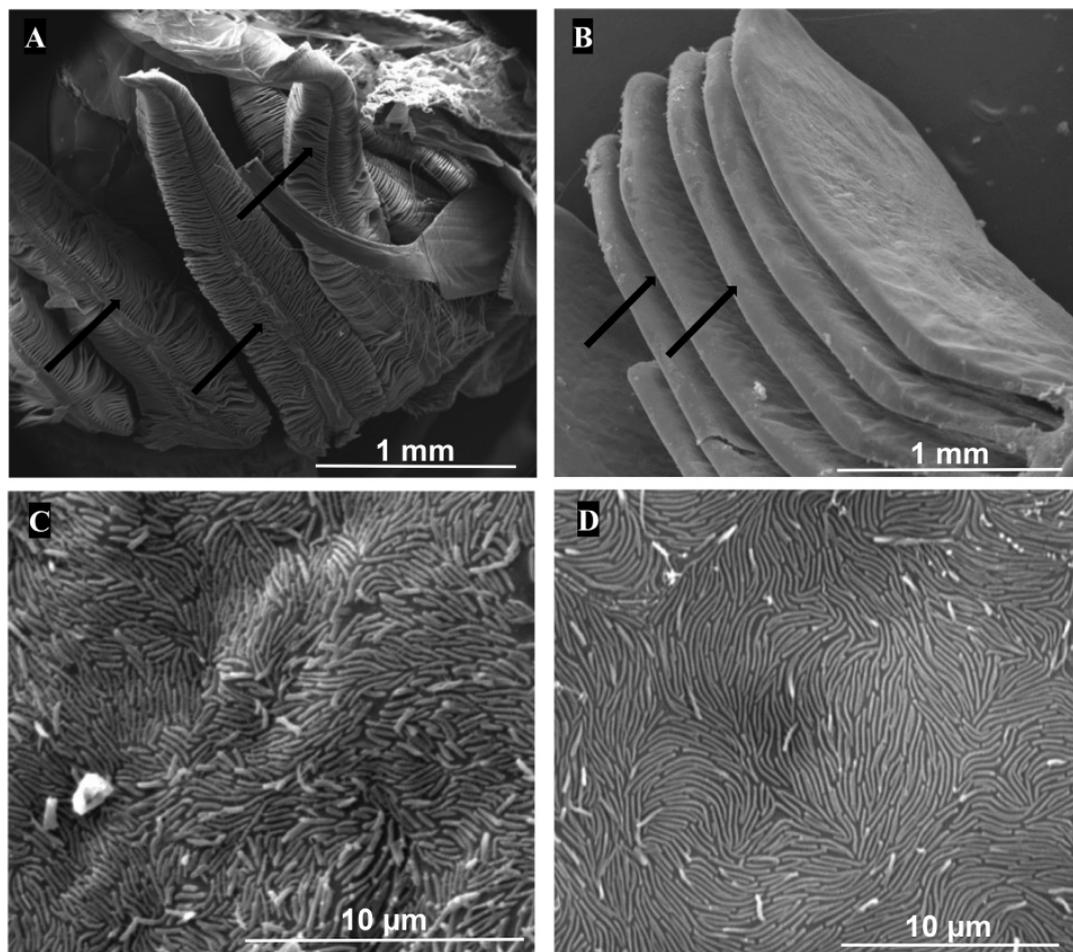


Fig. 3. Ultrastructure of the gills. SEM views of phyllobranchia and bacterial biofilm covering the gill lamellae of *Percnon gibbesi* and *Ucides cordatus*. **A.** Low magnification of several phyllobranchia (black arrows) of *Percnon gibbesi*. **B.** Gill lamellae of *Ucides cordatus* with a different shape (black arrows). Epibiotic bacteria covering the gill filaments are represented mainly by rod-shaped bacteria either on *Percnon gibbesi* (**C**) or on *Ucides cordatus* (**D**).

quired for the sub-peaks to be included in the auto-smoothed peak was set at 650. Expected peak widths throughout the entire chromatographic run were assumed to be approximately 12 s in the first dimension and 0.15 s in the second dimension. Chromatograms were processed using a data processing method to find all peaks with $S/N > 100$ and all chromatographic peaks were searched against the NIST-MS 2017 Libraries.

Statistical Compare features of ChromaTOF® were used to align the peak tables based on retention times and mass spectra. The retention time match criteria were set to 5 modulation periods apart in the first dimension (12.5 s) and 0.2 s in the second dimension to allow for minor shifts in retention times occurring between samples. The minimum similarity spectral match to combine sub-peaks was set to 600 for all m/z values with abundance greater than 1% of the base ion. The peak tables present the values of S/N and area for each peak. Peak areas were normalized by sample weight. ChromaTOF® scripting tools were also used to process the chromatograms to find families of compounds.

Additional metabolomic data analysis was conducted using Microsoft Excel 2013 and consisted of selecting metabolites of interest.

The samples were evaluated by the number of peaks, common peaks, total peak area (TPA), total useful peak area by class (C-TUPA), and ten-

tative identifications of metabolites were based on mass spectral information and first-dimension retention index (RI). The number of peaks refers to the number of identified compounds in the samples after data alignment, and the common peaks were determined by sample class. The TPA provides a sum of all the signals for each sample, while TUPA is the sum of all the signals obtained from common peaks in all the samples [33]. Class-TUPA was used for these samples where a class was assigned for each crab species, as well as each crab species and the location they inhabit, and the sum of signals was obtained from the common signals within each class [34].

2.8. Ultrastructural analysis of gill tissues

Gills from *P. gibbesi* and *U. cordatus* were prepared as described by Béziat et al. [6]. Gill samples were extracted from the gill cavity and fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.8x PBS buffer (pH 7.2). They were dehydrated in a series of acetone solutions (30°, 50°, 70°, 90°, and 3x 100°), then dried to the critical point at 31 °C and 74 bars. The dried gills were sputter-coated with gold before observations with a FEI Quanta 250 electron microscope at 20 kV.

Table 2
Comparison among sample locations.

| Class | Number of samples | Common peaks | Number of peaks | | TPA | | C-TUPA | |
|-------|-------------------|--------------|-----------------|---------|----------|---------|----------|---------|
| | | | Average | RSD (%) | Average | RSD (%) | Average | RSD (%) |
| AP-ME | 3 | 1738 | 2589 | 8 | 1.26E+08 | 26 | 8.94E+07 | 28 |
| AP-M | 3 | 1500 | 2325 | 5 | 8.63E+07 | 15 | 5.59E+07 | 16 |
| AP-PS | 3 | 1268 | 2240 | 15 | 9.04E+07 | 33 | 5.41E+07 | 37 |
| MR-IC | 3 | 1583 | 2237 | 4 | 8.36E+07 | 9 | 5.99E+07 | 5 |
| MR-PS | 3 | 1636 | 2350 | 4 | 9.89E+07 | 4 | 7.17E+07 | 5 |
| MR-ME | 3 | 1920 | 2506 | 2 | 1.03E+08 | 8 | 8.26E+07 | 1 |
| UC-G | 3 | 1705 | 2280 | 2 | 1.08E+08 | 12 | 9.43E+07 | 12 |
| PG-PL | 3 | 1323 | 2094 | 7 | 7.71E+07 | 16 | 4.78E+07 | 16 |

Table 3
Comparison among sample species.

| Class | Number of samples | Common peaks | Number of peaks | | TPA | | C-TUPA | |
|-------|-------------------|--------------|-----------------|---------|----------|---------|----------|---------|
| | | | Average | RSD (%) | Average | RSD (%) | Average | RSD (%) |
| AP | 9 | 854 | 2384 | 11 | 1.01E+08 | 30 | 4.41E+07 | 32 |
| MR | 9 | 1089 | 2364 | 6 | 9.51E+07 | 11 | 4.89E+07 | 13 |
| UC | 3 | 1705 | 2280 | 2 | 1.08E+08 | 12 | 9.43E+07 | 12 |
| PG | 3 | 1323 | 2094 | 7 | 7.71E+07 | 16 | 4.78E+07 | 16 |

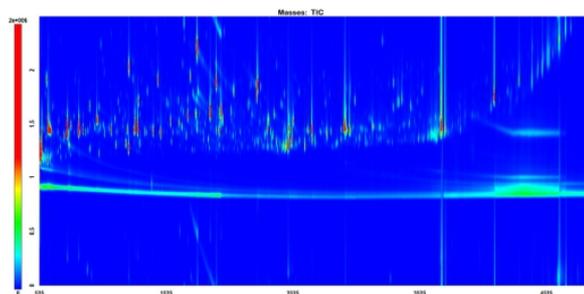


Fig. 4. GCxGC-TOFMS contour plot of a derivatized crab gill sample.

3. Results

3.1. Gill structure

Phyllobranchia (gill type of brachyuran crabs) of *Ucides cordatus*, the semi-marine crab from mangrove, and *Percnon gibbesi*, the exclusively marine crab, were checked for the presence of bacteria. The presence of rod-shaped bacteria on the gill lamellae surfaces for both species was confirmed (Fig. 3), similarly to the already described species *A. pisonii* and *M. rapax* [6].

3.2. Metabolomics results

GCxGC-TOFMS is a powerful tool used in metabolomics because of its superior ability to separate and identify compounds in complex samples, thus it was chosen as the platform to perform the analysis of the crab gills. In this analysis, more than 2000 peaks were detected in a typical derivatized crab gill chromatogram (Fig. 4). The majority of the peaks were primary metabolites, including amino acids, sterols, fatty acids, and sugars (SI2 Table 4). Several secondary metabolites, mainly terpenoid compounds, were tentatively identified using the mass spectral information from the peaks, the library match, and retention indices (SI2 Table 1).

After peak table alignment, the 24 samples presented a total of 3797 aligned peaks; the number of peaks having increased due to the difference in metabolites in each sample. Table 2 shows the results for each group of samples by location. The average number of peaks varied from

2094 to 2589 peaks, with common peaks representing between 57% and 71% of the total number of peaks. The lowest number of peaks was presented by *AP-Pointe Sable* samples along with the higher RSD% (15%). The locations that presented lower RSD% in TPA and TUPA were Ilet Cochon, Pointe Sable and Manche à Eau where the species *Minuca rapax* (MR) was found. On the other hand, the highest RSD% were observed for Manche à Eau, Marina and Pointe Sable for the species *Aratus pisonii*.

Table 3 shows the results by crab species. The average number of peaks was also calculated for the total number of detected peaks, TPA and TUPA. Comparing the average number of peaks detected by species, no significant differences were observed between the four species. However, the common peaks presented differences from 854 common peaks (AP) to 1705 peaks (PG). These results can be explained by the high variability presented by the *Aratus pisonii* samples amongst the different locations. These crab samples presented the higher RSD% in TPA and TUPA. The results were consistent with Table 2. The lowest RSD% for TPA and TUPA was obtained with the *Ucides cordatus* samples.

Crab gills are complex samples with a wide variety of metabolite families. The objective of this study was to develop a method to extract, identify and relatively quantify secondary metabolites of crab gills, because of their importance in symbiotic relationships [35,36]. Using the method described above, we tentatively identified 17 secondary metabolites using mass spectral information from each peak and RI, and positively identified cycloserine in the crab gills by injection of a pure standard. Table 4 shows average retention times from the secondary metabolites in the first- and second-dimensions, RI, and library match. The peak areas normalized by weight for each sample are included in the supplementary information (SI2 Table 1). Furthermore, the variability by location of 10 secondary metabolites was analyzed. Fig. 5 shows scatter plots of these 10 metabolites plotted against the log (for visualization) peak areas normalized by weight.

4. Discussion

A couple of recent studies [5,6] showed the presence of ectosymbiotic bacteria covering gill lamellae surface as observed here for *P. gibbesi* species and *U. cordatus* (Fig. 3). Hence, nothing is known yet about possible exchanges of metabolites between the crustacean's host and its bacteria. In order to explore the interaction between the host crabs and the bacteria, the present manuscript describes a method to analyze the metabolites of crab gill samples allowing us to identify a high number of different primary and secondary metabolites (≈ 2000). Different families

Table 4
Selected tentative secondary metabolites of crab gills.

| Metabolite | Type | Structure | 1st Dimension Time (s) | 2nd Dimension Time (s) | Library RI | Exp. RI | Library match |
|--------------------------------|---|-----------|------------------------|------------------------|------------|---------|---------------|
| o-Cymene | monoterpenoid | | 618.50 | 1.3525 | 1015 | 1016 | 799 |
| p-Cymene | monoterpenoid | | 673.056 | 1.31667 | 1043 | 1044 | 832 |
| Trigonelline TMS derivative | alkaloid | | 1725.33 | 1.74804 | | 1521 | 808 |
| Phenethylamine 2TMS derivative | monoamine alkaloid | | 1840.87 | 1.43978 | 1568 | 1579 | 858 |
| 10C monoterpenol ^a | monoterpenol | | 1849.17 | 1.30083 | | 1583 | |
| 10C monoterpenol ^a | monoterpenol | | 1911.07 | 1.27643 | | 1614 | |
| 10C monoterpenol ^a | monoterpenol | | 1919.76 | 1.27476 | | 1619 | |
| 10C monoterpenol ^a | monoterpenol | | 2017.95 | 1.31182 | | 1671 | |
| 10C monoterpenol ^a | monoterpenol | | 2018.57 | 1.30333 | | 1671 | |
| 10C monoterpenol ^a | monoterpenol | | 2041.62 | 1.27412 | | 1683 | |
| Farnesol TMS derivative | acyclic sesquiterpenol | | 2267.14 | 1.30143 | 1800 | 1807 | 694 |
| 15C sesquiterpenol | sesquiterpenol | | 3337.25 | 1.4635 | | 2522 | |
| γ-Tocopherol TMS derivative | tocopherol | | 3927.50 | 1.565 | 2987 | 2952 | 726 |
| α-Tocopherol TMS derivative | tocopherol | | 4083.53 | 1.6481 | 2999 | 3054 | 790 |
| 30C pentacyclic triterpenoid | pentacyclic triterpenoid | | 4329.91 | 2.03554 | | 3208 | |
| Amphetamine TMS derivative | Amine | | 1176.47 | 1.31966 | 1298 | 1268 | 708 |
| Amphetamine 2TMS derivative | Amine | | 1414.05 | 1.475 | 1394 | 1374 | 721 |
| Cycloserine 3TMS derivative | bacterial metabolite, broad spectrum antibiotic | | 1409.50 | 1.48833 | 1445 | 1372 | 717 |

^a The monoterpenols are based on borneol or farnesol, but the retention index did not agree. The mass spectra had some similarities, but ultimately did not correspond to the same molecules.

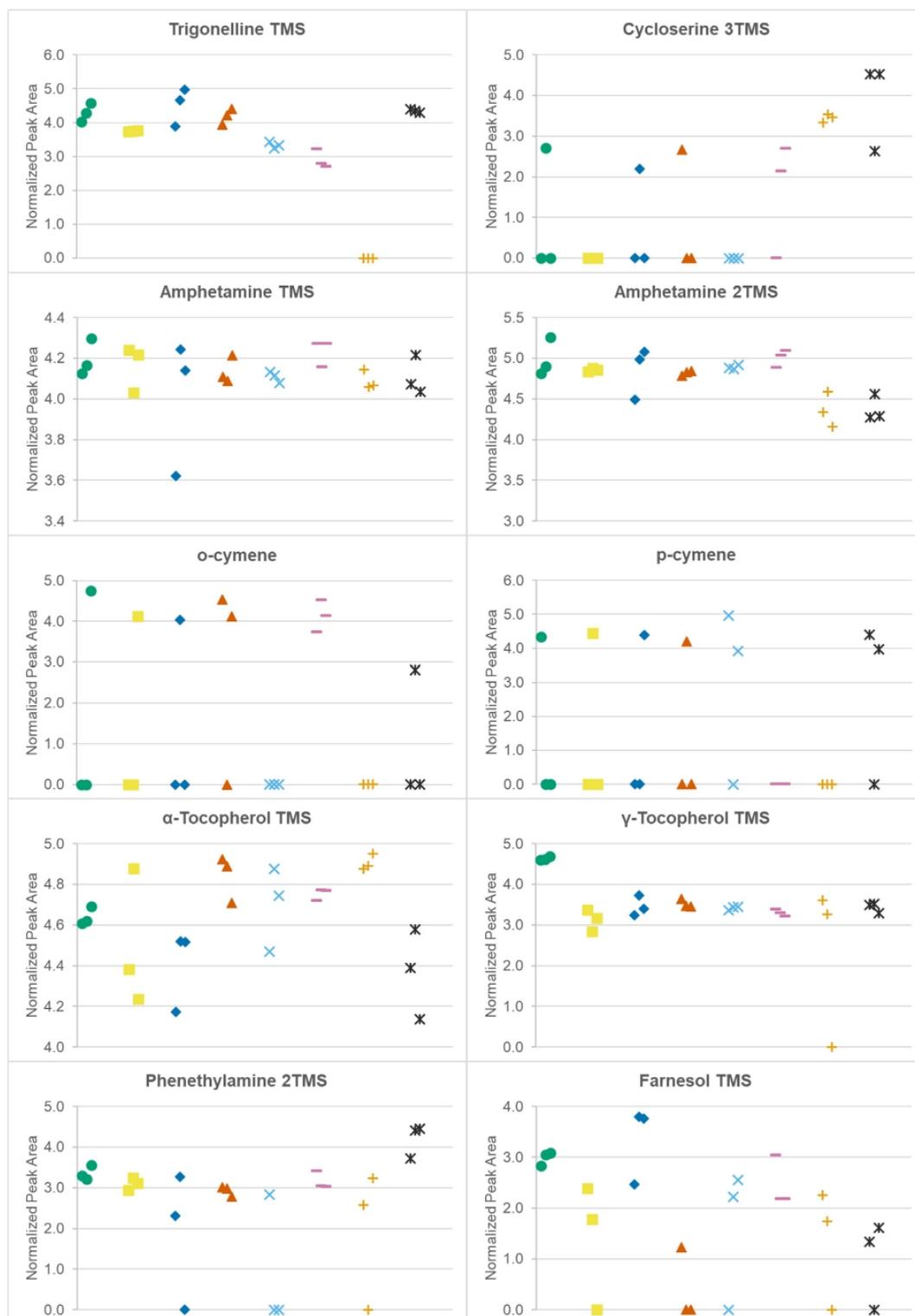


Fig. 5. Scatter plots of secondary metabolites. Normalized peak areas are plotted on logarithmic scale. ● AP-ME, ■ AP-M, ◆ AP-PS, ▲ MR-IC, × MR-PS, - MR-ME, + UC-G, ✱ PG-PL. Normalized peak area values are available in SI Table 1.

of primary metabolites were identified, including amino acids, sterols, fatty acids, and sugars.

Our research focuses on the secondary metabolites and their importance in symbiotic relationships [35,36]. This study detected and tentatively identified the presence of several bioactive secondary metabolites in the different crab gill samples. These secondary metabolites included terpenoids (*o*- and *p*-cymene) [37], derivatives of vitamin D (α - and γ -tocopherols) [38], etc. However, in the present manuscript we focused our attention on three bioactive secondary metabolites: cycloserine, trigonelline and amphetamine. The interest in amphetamine is justified by previous studies describing the biosynthesis of this compound by crabs [39].

Cycloserine is an antimicrobial molecule produced by bacteria belonging to the *Streptomyces* genus and by strains of *Pseudomonas fluorescens* Migula [40] used for the treatment of tuberculosis disease (*Mycobacterium tuberculosis*). It is has been isolated from *Streptomyces orchidaceus* [41] and, according to Li et al. [42], it is more effective against gram-positive than gram-negative bacteria. Cycloserine inhibits bacterial cell wall synthesis. *Pseudomonas* are gram-negative bacteria belonging to Gamma-proteobacteria group while *Streptomyces* are gram-positive bacteria belonging to the Actinobacteria group. These genera were not detected from *A. pisonii* and *M. rapax* communities according to recent metabarcoding analysis [6]. Main bacteria on gills of these two crab species are mostly a community of gram-negative bacteria composed of Alphaproteobacteria, Bacteroidetes and Actinobacteria [6]. The composition of bacterial communities colonizing the gills of the two other species, *Percnon gibbesi* and *Ucides cordatus*, are not yet known. Although the bacteria are not yet identified, they are likely the only source of the cycloserine secretion in gill filaments of crustaceans. Nearly no cycloserine (or in very low levels) could be detected from individuals of *Aratus pisonii* and *Minuca rapax*, from Marina and Pointe Sable sites respectively. This may be related to a weak production or decreased bacterial presence on the gill filaments from these two sites. However, it was found present in UC-G and PG-PL, this last one with a higher level relative to UC-G. Since genus *Pseudomonas* and *Streptomyces* were not present in certain crab species (*A. pisonii* and *M. rapax*), it will be necessary to identify the bacteria responsible for cycloserine production in these species.

The second antibiotic compound, trigonelline, was present in all AP, MR and PG individuals regardless of the sites. Samples from UC did not show the peak. AP individuals showed the highest amount, with individuals from the Pointe Sable location having the highest abundance as well as the largest variation. AP-M has the most consistent level of trigonelline. PG samples showed the second highest level and the MR samples the third. This compound is naturally produced by the plant *Trigonella foenum-graecum* [43], and has been found to be naturally present on crustaceans as in the shrimp *Sergestes lucens* and *Penaeus japonicus* [44]. It is also described as a urinary metabolite from the marine crab *Callinectes sapidus* and present in the soft tissues of the mud crab *Panopeus herbstii* [45]. In the present paper, regardless of the biotope, it is found on all four species analyzed: the arboreal crab *A. pisonii*, the mud crabs *M. rapax* and *U. cordatus*, and the exclusively marine crab *P. gibbesi*. It has been reported that trigonelline has an antibacterial effect on some bacterial strains [43] and antifungal activity [46] on *Candida albicans*. Hence, we suspect the production of this compound could have an impact on the selection of the microbial community of each crab species. In fact, each species of crab seems to have their own community [6].

Finally, amphetamine was found in all species and locations. Studies have demonstrated that such a compound has psychostimulant effects on invertebrates such as crayfish [47] and could be naturally present on crab muscle as volatile compounds [39]. This compound can also be found in the environment through the release in sewage waste water [48]. Amphetamine was found in crabs from all sites regardless of the ecology of the crabs studied. It is unlikely that amphetamine is present at all collection sites, and we suppose that this compound comes from the

same biosynthetic pathway that Yuan and collaborators described for the muscles [39]. The only difference found was UC-G and PG-PL presented a lesser amount of amphetamine compared to the rest of the samples. Currently, this hypothesis cannot be confirmed because we have no data concerning the analysis of wastewater or other bodies of water around Guadeloupe for this or other drugs and their metabolites. Further research will aim to identify the origin of the amphetamine by analyzing other crab tissues, including crab muscle, hepatopancreas, and kidneys. The presence of amphetamine in some of these other tissues could be indicative of its production by the crabs, or suggestive of bioaccumulation if it is found in all organs of the crabs.

5. Conclusions

This study presented a method for metabolomics analysis of lyophilized crab gill samples using GC×GC-TOFMS. The developed sample preparation protocol is applicable for analyses of crustacean samples by GC-based methods and will allow for more in depth analyses on their physiology focusing on primary and secondary metabolites, and their role in symbiotic relationships. Using this protocol, further analyses on crab tissue samples can be conducted to reveal the localization of bioactive secondary metabolites within the crab tissues and further enhance our knowledge of the many symbiotic interactions between crabs and bacteria.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was supported by Grant 2022-21-IRECOMAN from the "Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement" préfecture de Guadeloupe. The authors would also like to thank the **Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC)** and **MITACS** for funding portions of this research, as well as the **Canada Foundation for Innovation (CFI)**, **Genome Canada**, and **Genome Alberta** for their support of The Metabolomics Innovation Center (TMIC).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jcoa.2022.100069. The raw and processed data files associated with this work will be publicly available on the Federated Research Data Repository at <https://doi.org/10.20383/103.0657>.

References

- [1] C.J. Freeman, E.W. Stoner, C.G. Easson, K.O. Matterson, D.M. Baker, Symbiotic carbon and nitrogen assimilation in the Cassiopea-Symbiodinium mutualism, *Mar Ecol Prog Ser* 544 (2016) 281–286. <https://doi.org/10.3354/meps11605>.
- [2] D.L. Distel, H. Felbeck, Pathways of inorganic carbon fixation in the endosymbiont-bearing lucinid clam *Lucinoma aequizonata*. Part 2. Analysis of the individual contributions of host and symbiont cells to inorganic carbon assimilation, *J Exp Zool* 247 (1988) 11–22. <https://doi.org/10.1002/jez.1402470103>.
- [3] J. Ponsard, M.-A. Cambon-Bonavita, M. Zbinden, G. Lepoint, A. Joassin, L. Corbari, B. Shillito, L. Durand, V. Cuffe-Gauchard, P. Compère, Inorganic carbon fixation by chemosynthetic ectosymbionts and nutritional transfers to the hydrothermal vent host-shrimp *Rimicaris exoculata*, *ISME J* 7 (2013) 96–109. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.87>.
- [4] S. Tsuchida, Y. Suzuki, Y. Fujiwara, M. Kawato, K. Uematsu, T. Yamanaka, C. Mizota, H. Yamamoto, Epibiotic association between filamentous bacteria and the vent-associated galatheid crab, *Shinkaia crosnieri* (Decapoda: Anomura), *J Mar Biol Assoc UK* 91 (2011) 23–32. <https://doi.org/10.1017/S0025315410001827>.
- [5] J. Booth, Ecology of the Mangrove Microbiome, (2018). <https://doi.org/10.25781/KAUST-3F85C>.
- [6] N.S. Béziat, S. Duperron, S. Halary, C. Azede, O. Gros, Bacterial ectosymbionts colonizing gills of two Caribbean mangrove crabs, *Symbiosis* 85 (2021) 105–114. <https://doi.org/10.1007/s13199-021-00801-4>.

- [7] J.C. Kwan, M.S. Donia, A.W. Han, E. Hirose, M.G. Haygood, E.W. Schmidt, Genome streamlining and chemical defense in a coral reef symbiosis, *Proc Natl Acad Sci* 109 (2012) 20655–20660. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213820109>.
- [8] J. O'Brien, G.D. Wright, An ecological perspective of microbial secondary metabolism, *Curr Opin Biotechnol* 22 (2011) 552–558. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.03.010>.
- [9] J. Leinberger, J. Holste, B. Bunk, H.M. Freese, C. Spröer, L. Dlugosch, A.-C. Kück, S. Schulz, T. Brinkhoff, High potential for secondary metabolite production of *paracoccus marcusii* CP157, isolated from the crustacean cancer pagurus, *Front Microbiol* 12 (2021) <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.688754>, accessed October 22, 2022.
- [10] N. Adnani, S.R. Rajski, T.S. Bugni, Symbiosis-inspired approaches to antibiotic discovery, *Nat Prod Rep* 34 (2017) 784–814. <https://doi.org/10.1039/C7NP00009J>.
- [11] K. Valliappan, W. Sun, Z. Li, Marine actinobacteria associated with marine organisms and their potentials in producing pharmaceutical natural products, *Appl Microbiol Biotechnol* 98 (2014) 7365–7377. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5954-6>.
- [12] A.A.G. Indrainingrat, H. Smidt, D. Sipkema, Bioprospecting sponge-associated microbes for antimicrobial compounds, *Mar Drugs* 14 (2016) 87. <https://doi.org/10.3390/md14050087>.
- [13] M.C. Leal, C. Sheridan, R. Osinga, G. Dionísio, R.J.M. Rocha, B. Silva, R. Rosa, R. Calado, Marine microorganism-invertebrate assemblages: perspectives to solve the “Supply Problem” in the initial steps of drug discovery, *Mar Drugs* 12 (2014) 3929–3952. <https://doi.org/10.3390/md12073929>.
- [14] J. Kobayashi, M. Ishibashi, Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms, *Chem Rev* 93 (1993) 1753–1769. <https://doi.org/10.1021/cr00021a005>.
- [15] N. Lindquist, P.H. Barber, J.B. Weisz, Epibiotic microbes as food and defence for marine isopods: unique symbioses in a hostile environment, *Proc R Soc B Biol Sci* 272 (2005) 1209–1216. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3082>.
- [16] O. Fiehn, Metabolomics by gas chromatography–mass spectrometry: combined targeted and untargeted profiling, *Curr Protoc Mol Biol* 114 (2016) 30.4.1–30.4.32. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3004s114>.
- [17] W.B. Dunn, David I. Ellis, Metabolomics: current analytical platforms and methodologies, *TrAC Trends Anal Chem* 24 (2005) 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.11.021>.
- [18] K. Ralston-Hooper, A. Hopf, C. Oh, X. Zhang, J. Adamec, M.S. Sepúlveda, Development of GCxGC/TOF-MS metabolomics for use in ecotoxicological studies with invertebrates, *Aquat Toxicol* 88 (2008) 48–52. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.03.002>.
- [19] M.F. Almstetter, P.J. Oefner, K. Dettmer, Comprehensive two-dimensional gas chromatography in metabolomics, *Anal Bioanal Chem* 402 (2012) 1993–2013. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5630-y>.
- [20] E.A. Higgins Keppeler, C.L. Jenkins, T.J. Davis, H.D. Bean, Advances in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography in metabolomics, *TrAC Trends Anal Chem* 109 (2018) 275–286. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.015>.
- [21] O. Fiehn, Extending the breadth of metabolite profiling by gas chromatography coupled to mass spectrometry, *TrAC Trends Anal Chem* 27 (2008) 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.01.007>.
- [22] K. Guo, Z. Zhao, L. Luo, S. Wang, R. Zhang, W. Xu, G. Qiao, Untargeted GC-MS metabolomics reveals the metabolic responses in the gills of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) subjected to air-exposure stress, *Ecotoxicol Environ Saf* 231 (2022) 113159. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113159>.
- [23] Q.-Q. Ma, X.-D. Wang, Y.-Y. Cui, N.-N. Zhang, J.-G. Qin, Z.-Y. Du, L.-Q. Chen, Untargeted GC-MS metabolomics reveals metabolic differences in the Chinese mitten-hand crab (*Eriocheir sinensis*) fed with dietary palm oil or olive oil, *Aquac Nutr* 24 (2018) 1623–1637. <https://doi.org/10.1111/anu.12798>.
- [24] A.P. Oliveira, A.C. Lopes, M. Silva, P.B. Andrade, P. Valentão, Exploring Montagu's crab: primary and secondary metabolites and enzyme inhibition, *Arab J Chem* 12 (2019) 4017–4025. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.03.007>.
- [25] D.M. Pereira, J. Vinholes, P.G. de Pinho, P. Valentão, T. Mouga, N. Teixeira, P.B. Andrade, A gas chromatography–mass spectrometry multi-target method for the simultaneous analysis of three classes of metabolites in marine organisms, *Talanta* 100 (2012) 391–400. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.08.004>.
- [26] H. Yao, X. Li, L. Tang, H. Wang, C. Wang, C. Mu, C. Shi, Metabolic mechanism of the mud crab (*Scylla paramamosain*) adapting to salinity sudden drop based on GC-MS technology, *Aquac Rep* 18 (2020) 100533. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100533>.
- [27] M.M. Koek, R.H. Jellema, J. van der Greef, A.C. Tas, T. Hankemeier, Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives, *Metabolomics* 7 (2011) 307–328. <https://doi.org/10.1007/s11306-010-0254-3>.
- [28] Q.-Q. Ma, Q. Chen, Z.-H. Shen, D.-L. Li, T. Han, J.-G. Qin, L.-Q. Chen, Z.-Y. Du, The metabolomics responses of Chinese mitten-hand crab (*Eriocheir sinensis*) to different dietary oils, *Aquaculture* 479 (2017) 188–199. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.032>.
- [29] C. Kuhlisch, G. Califano, T. Wichard, G. Pohnert, Metabolomics of intra- and extracellular metabolites from micro- and macroalgae using GC-MS and LC-MS, *Protocols for macroalgae research*, CRC Press, 2018.
- [30] A. Ritter, S.M. Dittami, S. Goulitquer, J.A. Correa, C. Boyen, P. Potin, T. Tonon, Transcriptomic and metabolomic analysis of copper stress acclimation in *Ectocarpus siliculosus* highlights signaling and tolerance mechanisms in brown algae, *BMC Plant Biol* 14 (2014) 116. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-116>.
- [31] R. Hao, Z. Wang, C. Yang, Y. Deng, Z. Zheng, Q. Wang, X. Du, Metabolomic responses of juvenile pearl oyster *Pinctada maxima* to different growth performances, *Aquaculture* 491 (2018) 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.050>.
- [32] L. Venter, D.T. Loots, L.J. Mienie, P.J. Jansen van Rensburg, S. Mason, A. Vosloo, J.Z. Lindeque, Uncovering the metabolic response of abalone (*Haliotis midae*) to environmental hypoxia through metabolomics, *Metabolomics* 14 (2018) 49. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1346-8>.
- [33] S.L. Nam, A.P. de la Mata, R.P. Dias, J.J. Harynyuk, Towards standardization of data normalization strategies to improve urinary metabolomics studies by GCxGC-TOFMS, *Metabolites* 10 (2020) 376. <https://doi.org/10.3390/metabo10090376>.
- [34] M.D. Sorochan Armstrong, O.R. Arredondo Campos, C.C. Bannon, A.P. de la Mata, R.J. Case, J.J. Harynyuk, Global metabolome analysis of *Dunaliella tertiolecta*, *Phaeobacter italicus* R11 Co-cultures using thermal desorption - comprehensive two-dimensional gas chromatography - time-of-flight mass spectrometry (TD-GCxGC-TOFMS), *Phytochemistry* 195 (2022) 113052. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.113052>.
- [35] F. Modolon, A. r. Barno, H. d. m. Villela, R. s. Peixoto, Ecological and biotechnological importance of secondary metabolites produced by coral-associated bacteria, *J Appl Microbiol* 129 (2020) 1441–1457. <https://doi.org/10.1111/jam.14766>.
- [36] Y. Zhi-lin, D. Chuan-chao, C. Lian-qing, Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system, *Afr J Biotechnol* 6 (2007). <https://doi.org/10.4314/ajb.v6i11.57436>.
- [37] A. Marchese, C.R. Ariola, R. Barbieri, A.S. Silva, S.F. Nabavi, A.J. Tsetegho Sokeng, M. Izadi, N.J. Jafari, I. Suntar, M. Daglia, S.M. Nabavi, Update on monoterpenes as antimicrobial agents: a particular focus on p-cymene, *Mater Basel Switz* 10 (2017) E947. <https://doi.org/10.3390/ma10080947>.
- [38] E.S. Cetin, Z. Babalik, F. Hallac-Turk, N. Gokturk-Baydar, The effects of cadmium chloride on secondary metabolite production in *Vitis vinifera* cv. cell suspension cultures, *Biol Res* 47 (2014) 47. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-47>.
- [39] Y. Yuan, X. Wang, M. Jin, L. Jiao, P. Sun, M.B. Betancor, D.R. Tocher, Q. Zhou, Modification of nutritional values and flavor qualities of muscle of swimming crab (*Portunus trituberculatus*): application of a dietary lipid nutrition strategy, *Food Chem* 308 (2020) 125607. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125607>.
- [40] J. Shoji, H. Hinoo, R. Masunaga, T. Hattori, Y. Wakisaka, E. Kondo, Isolation of L-cycloserine from *erwinia uredovora*, *J Antibiot (Tokyo)* 37 (1984) 1198–1203. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.1198>.
- [41] Z. Ma, A.M. Ginsberg, M. Spiegelman, 7.24 - antimycobacterium agents, in: J.B. Taylor, D.J. Triggle (Eds.), *Comprehensive medicinal chemistry II*, Elsevier, Oxford, 2007, pp. 699–730. <https://doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00224-8>.
- [42] X. Li, X. Meng, H. Duan, L. Wang, S. Wang, Y. Zhang, D. Qin, Original and efficient synthesis of D-cycloserine, *Arch Pharm (Weinheim)* 343 (2010) 473–475. <https://doi.org/10.1002/ardp.200900316>.
- [43] S. Anwar, U. Bhandari, B.P. Panda, K. Dubey, W. Khan, S. Ahmad, Trigonelline inhibits intestinal microbial metabolism of choline and its associated cardiovascular risk, *J Pharm Biomed Anal* 159 (2018) 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.06.027>.
- [44] I.K. Suwetja, K. Hori, K. Miyazawa, K. Ito, Changes in content of ATP-related compounds, homarine, and trigonelline in marine invertebrates during ice storage, *Nippon Suisan Gakkaishi* 55 (1989) 559–566. <https://doi.org/10.2331/suisan.55.559>.
- [45] R.X. Poulin, S. Lavoie, K. Siegel, D.A. Gaul, M.J. Weissburg, J. Kubanek, Chemical encoding of risk perception and predator detection among estuarine invertebrates, *Proc Natl Acad Sci* 115 (2018) 662–667. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713901115>.
- [46] B. Özçelik, M. Kartal, I. Orhan, Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids, *Pharm Biol* 49 (2011) 396–402. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.519390>.
- [47] M.J. van Staaden, R. Huber, Crayfish learning: addiction and the ganglionic brain, *Perspect Behav Sci* 41 (2018) 417–429. <https://doi.org/10.1007/s40614-018-00181-z>.
- [48] S. Castiglioni, E. Zuccato, E. Crisci, C. Chiabrando, R. Fanelli, R. Bagnati, Identification and measurement of illicit drugs and their metabolites in urban wastewater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal Chem* 78 (2006) 8421–8429. <https://doi.org/10.1021/ac061095b>.

Chapitre 6 : Caractérisation des symbiotes bactériens associés à diverses espèces de crabes de milieux marin, intertidal, et terrestre.

1. Introduction

Chez les crustacés, les interactions durables décrites avec des partenaires bactériens et/ou eucaryotes correspondent le plus souvent à du parasitisme (Bojko *et al.*, 2021). En effet, les crustacés peuvent être colonisés par de nombreux organismes, et notamment jusqu'à 72 parasites ont ainsi été décrits chez les crabes (Bojko, *et al.*, 2021). Peu d'études décrivent les associations symbiotiques *sensu stricto*, mutualistes, dans lesquelles l'hôte bénéficie de l'activité de ses symbiotes et *vice-versa*. Dans la littérature, les interactions les plus connues concernent les crevettes hydrothermales. Dans cet environnement particulier, les crevettes forment une association avec des bactéries filamenteuses (Apremont *et al.*, 2018) qui leur transfère des composés utiles à leur développement (Ponsard *et al.*, 2013). Des études récentes ont décrit de nouvelles interactions entre les bactéries et les décapodes brachyours en zone côtière. Les crabes concernés présentent généralement un intérêt économique (Zhang *et al.*, 2016) ou écologique (Booth *et al.*, 2019). Ceux présents dans les mangroves effectuent une bioturbation importante des sédiments. Cette activité ré-oxygène le sédiment de la mangrove et stimule l'activité bactérienne autour des terriers (Booth *et al.*, 2019a). La présence de bactéries sur les branchies des crabes est une association surprenante qui semble toutefois se retrouver chez des espèces de crabes d'autres environnements.

Plusieurs espèces de crabes possédant des bactéries ectosymbiotiques sur leurs branchies ont déjà été décrites. L'étude de Booth (2018) suggère que la présence de bactéries pourrait être bénéfique, et que leur présence serait liée à la terrestrialisation (sortie de l'eau des crabes au cours de l'évolution) des crabes. Dans son travail de doctorat, des caroténoïdes ont été détectés dans les branchies des crabes et seraient associés à la présence de bactéries. La production de caroténoïdes par les bactéries permettrait de lutter contre le stress oxydatif et ainsi serait un atout vis-à-vis de la terrestrialisation des crabes. Quatorze espèces d'Arabie saoudite et d'Afrique du Sud comportant des crabes terrestres, semi-marins et marins ont ainsi été étudiées. A ce jour, un autre brachyoure en Chine, le crabe d'eau douce, *Eriocheir sinensis* (Zhang *et al.*, 2016) et les 2 espèces de mangrove des Petites Antilles *Aratus pisonii* et *Minuca rapax* sont également décrits à ce jour comme hébergeant des bactéries ectosymbiotiques sur leurs branchies (Béziat *et al.*, 2021).

L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre est de rechercher la présence de bactéries ectosymbiotiques sur les branchies d'autres espèces de crabes des Antilles provenant d'un

environnement similaire ou différent des 2 espèces de mangrove récemment publiées (Béziat *et al.*, 2021). Ce travail se basant sur les mêmes outils de détection que ceux utilisés pour l'étude de 2021 permettra de montrer (1) si ce type de symbiose est généralisé chez les crabes brachyours des Antilles et (2) si dans ce cas les populations bactériennes symbiotiques concernées sont identiques entre elles ou dépendantes des crabes et/ou milieux concernés. Pour ce faire, nous avons collecté des crabes de différents biotopes en Guadeloupe, passant de crabes terrestres, semi-terrestres/marins à des crabes exclusivement marins. Les résultats d'analyses obtenus précédemment sur les espèces *Aratus pisonii* et *Minuca rapax* sont utilisés dans cette analyse.

2. Matériel et Méthodes

2.1 Sites de collecte

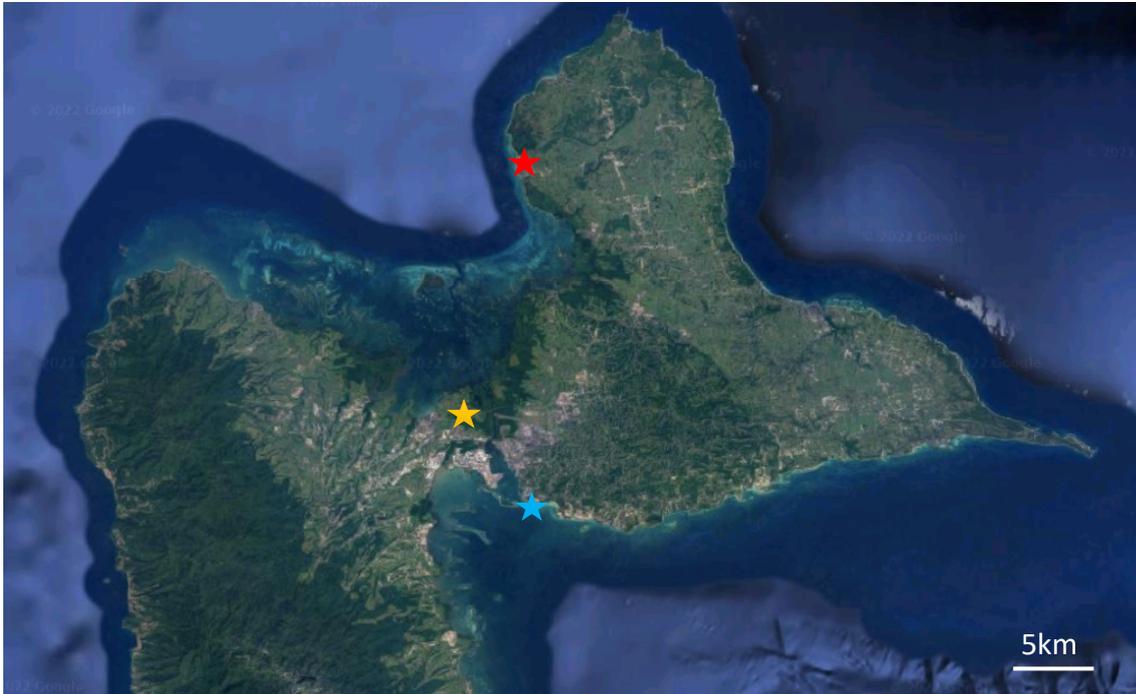


Figure 21. Carte de la Guadeloupe présentant les différents sites de récolte. Etoile bleu : Pointe à pitre ; Etoile jaune : Manche à Eau ; Etoile rouge : Port-Louis

Pour chacune des 14 espèces étudiées, les mâles et les femelles ont été collectés manuellement (fig. 21).

Tableau 5. Informations générales sur les espèces collectées. CW : Carapace width, largeur de carapace.

| Espèce | Type de crabe | Lieu de collecte | Taille |
|---|---------------|--|--|
|  <p><i>Cardisoma guanhumi</i></p> | Terrestre | En arrière plage à Port-louis ★ | CW : 92 mm pour les mâles CW : 85 mm pour les femelles (Shinozaki-Mendes <i>et al.</i> , 2013) |
|  <p><i>Gecarcinus lateralis</i></p> | Terrestre | Arrière plage de Port-louis ★ | CW : 17 - 86 mm pour les mâles CW : 17 - 80 mm pour les femelles (Silva <i>et al.</i> , 2014). |
|  <p><i>Ucides cordatus</i></p> | Terrestre | En mangrove à Port-louis ★ | CW : 35,5 - 83,5 mm pour les mâles CW : 30,6 - 73,3 mm pour les femelles (Dalabona <i>et al.</i> , 2005). |
|  <p><i>Minuca rapax</i></p> | Semi-marin | En Mangrove, dans la Manche-à-Eau ★ | 15,2 mm pour les mâles 13,8 mm pour les femelles (Castiglioni & Negreiros-Fransozo, 2006) |

| | | | |
|---|------------|---|---|
|  <p><i>Eurytium limosum</i></p> | Semi-marin | <p>En Mangrove, dans la Manche-à-Eau</p> <p>★</p> | <p>CW : 6,3 - 40,1 mm pour les mâles CW : 5,2 - 31,2 mm pour les femelles (Guimarães & Negreiros-Fransozo, 2002).</p> |
|  <p><i>Aratus pisonii</i></p> | Semi-marin | <p>En Mangrove, sur les arbres de palétuviers rouge dans la Manche-à-Eau</p> <p>★</p> | <p>CW : 23 mm pour les mâles CW : 17 mm pour les femelles (Díaz & Conde, 1989)</p> |
|  <p><i>Goniopsis cruentata</i></p> | Semi-marin | <p>En Mangrove, dans la Manche-à-Eau</p> <p>★</p> | <p>CW : 32,2 mm pour les mâles CW : 27 mm pour les femelles (Hirose <i>et al.</i>, 2015)</p> |
|  <p><i>Ocypode quadrata</i></p> | Semi-marin | <p>Plage de Port- Louis, proche de la zone de shorebreak</p> <p>★</p> | <p>CW : 9.2 - 53.5 mm pour les mâles CW : 10.6 - 52.0 mm pour les femelles (Haley, 1972)</p> |
|  <p><i>Callinectes sapidus</i></p> | Marin | <p>En mer derrière le laboratoire à Pointe-à-Pitre</p> <p>★</p> | <p>CW : 65 à 162 mm pour les mâles CW : 55 à 153 mm pour les femelles (Pereira <i>et al.</i>, 2009)</p> |

| | | | |
|---|-------|---|---|
|  <p><i>Portunus sayi</i></p> | Marin | Radeaux de sargasses à Pointe-à-Pitre ★ | CW : 77-97 mm pour les mâles CW : 49-250 mm pour les femelles (Russell & Dierssen, 2015) |
|  <p><i>Dissodactylus primitivus</i></p> | Marin | En mer à Port-Louis ★ | CW : 6,2 mm pour les mâles et CW : 7 mm pour les femelles c'est un parasite de l'oursin <i>Meoma ventricosa</i> (de Bruyn <i>et al.</i> , 2009). |
|  <p><i>Percnon gibbesi</i></p> | Marin | Barrière récifale à Port-Louis, sous les oursins diadème ★ | CW : 18,5-32 mm pour les mâles CW : 16-34 mm pour les femelles (Puccio <i>et al.</i> , 2006). |
|  <p><i>Sternorhynchus seticornis</i></p> | Marin | Barrière récifale à Port-Louis ★ | CW : 7,6 - 14,9 mm pour les mâles CW : 9,6 - 11 mm pour les femelles (Antunes <i>et al.</i> , 2018). |
|  <p>Non identifié</p> | Marin | Barrière récifale à Port-Louis ★ | NA |

Environ 5 individus par espèces ont été collectés. Toutes les espèces appartiennent au groupe des brachyours et ont des branchies de type phyllobranchies. Les branchies de chaque espèce ont été extraites de la cavité branchiale après une anesthésie à froid (5 minutes, à -20°C). Les branchies ont été observées dans un premier temps en microscopie électronique à balayage et ensuite les branchies des espèces présentant des bactéries ont été utilisées pour les extractions d'ADN avant une analyse métabarcoding sur le gène codant pour l'ARNr 16S.

2.3 Microscopie électronique à balayage

Les branchies fraîchement disséquées de chaque espèce ont été placées dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % en tampon PBS 0,8x (pH : 7,2) à 4°C pour une nuit. Après lavage des échantillons en PBS 0.8x, des concentrations croissantes d'acétone (30°, 50°, 70°, 95° et 3 fois 100°) ont été utilisées pour déshydrater les branchies. Elles ont ensuite été séchées au point critique dans du CO₂ à 31°C et 74 bars et métallisées à l'or par pulvérisation. Les observations ont été réalisées avec le microscope électronique à balayage Fei Quanta 250 sous une tension d'accélération de 20 kv.

2.4 Composition des communautés bactériennes associées aux branchies d'après le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S

L'ADN total de deux individus adultes par espèce a été extrait des branchies à l'aide du kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) selon les instructions du fabricant. La PCR utilisant des amorces universelles a été réalisée comme décrit dans Duperron *et al.* (2019). Un fragment d'environ 400 pb du gène codant pour l'ARNr correspondant à la région variable V4-V5 d'*Escherichia coli* a été amplifié à l'aide des amorces 515F et 926R (Parada *et al.*, 2016) et séquençé sur une plateforme Illumina MiSeq (2 X 300 pb, séquençage en paires, Genoscreen, France).

L'analyse des séquences a été réalisée à l'aide de QIIME2 (Hall et Beiko, 2018). Les variants de séquence d'amplicon (ASV (Callahan *et al.* 2017)) ont été identifiés à l'aide de DADA2 en utilisant les paramètres par défaut, c'est-à-dire une probabilité maximale pour les indels de 0,01 et un taux d'erreur de lecture moyen de 0,5 % pour la normalisation. DADA2 est également utilisé pour identifier et supprimer les séquences chimériques. Les affiliations taxonomiques ont été obtenues par le classificateur basé sur sklearn (version Silva 13-2-99).

Les ASV assignées aux clades « Eukaryote », « Mitochondria » et « Chloroplasts » ont été exclues de l'analyse.

3. Résultats

3.1 Analyse ultrastructurale

Tous les individus ont été observés au microscope électronique à balayage. Parmi les 12 espèces observées, seules trois étaient dépourvues de bactéries sur leurs lamelles branchiales. Aucune bactérie n'a ainsi pu être observée sur les branchies de *Portunus sayi*, *Stenorhyncus seticornis*, ainsi que sur les branchies de l'espèce non identifiée (Fig. 22D). Ces trois espèces sont des crabes exclusivement marins.

Les autres espèces observées présentent une couverture bactérienne sur les branchies (Fig.22 A, B, C, E, F) quel que soit le biotope d'origine (tab.6).

Tableau 6. Liste des différentes espèces étudiées au microscope électronique à balayage (MEB)

| Espèces observées | Famille | Présence/Absence de bactéries | Type de crabe | Biotope |
|----------------------|---------------|-------------------------------|---------------|---------------------|
| <i>C. guanhumi</i> | Gecarcinidae | Bâtonnets | Terrestre | Marais à Port-Louis |
| <i>G. lateralis</i> | Gecarcinidae | Filamenteuses | Terrestre | Plage |
| <i>U. cordatus</i> | Ocypodidae | Bâtonnets | Terrestre | Mangrove |
| <i>O. quadrata</i> | Ocypodidae | Bâtonnets | Semi-marin | Plage |
| <i>G. cruentata</i> | Grapsidae | Bâtonnets | Semi-marin | Mangrove |
| <i>E. limosum</i> | Panopeidae | Bâtonnets | Semi-marin | Mangrove |
| <i>P. gibbesi</i> | Percnidae | Bâtonnets | Marin | Mer |
| <i>D. primitivus</i> | Pinnotheridae | Bâtonnets | Marin | Mer |
| <i>C. sapidus</i> | Portunidae | Bâtonnets | Marin | Bord de mer |

| | | | | |
|----------------------|--------------|---------|--------------------|-----|
| <i>P. sayi</i> | Portunidae | Absence | Marin pélagique | Mer |
| <i>S. seticornis</i> | Inachoididae | Absence | Marin | Mer |
| Crabe non identifié | Mithracidae | Absence | Marin | Mer |

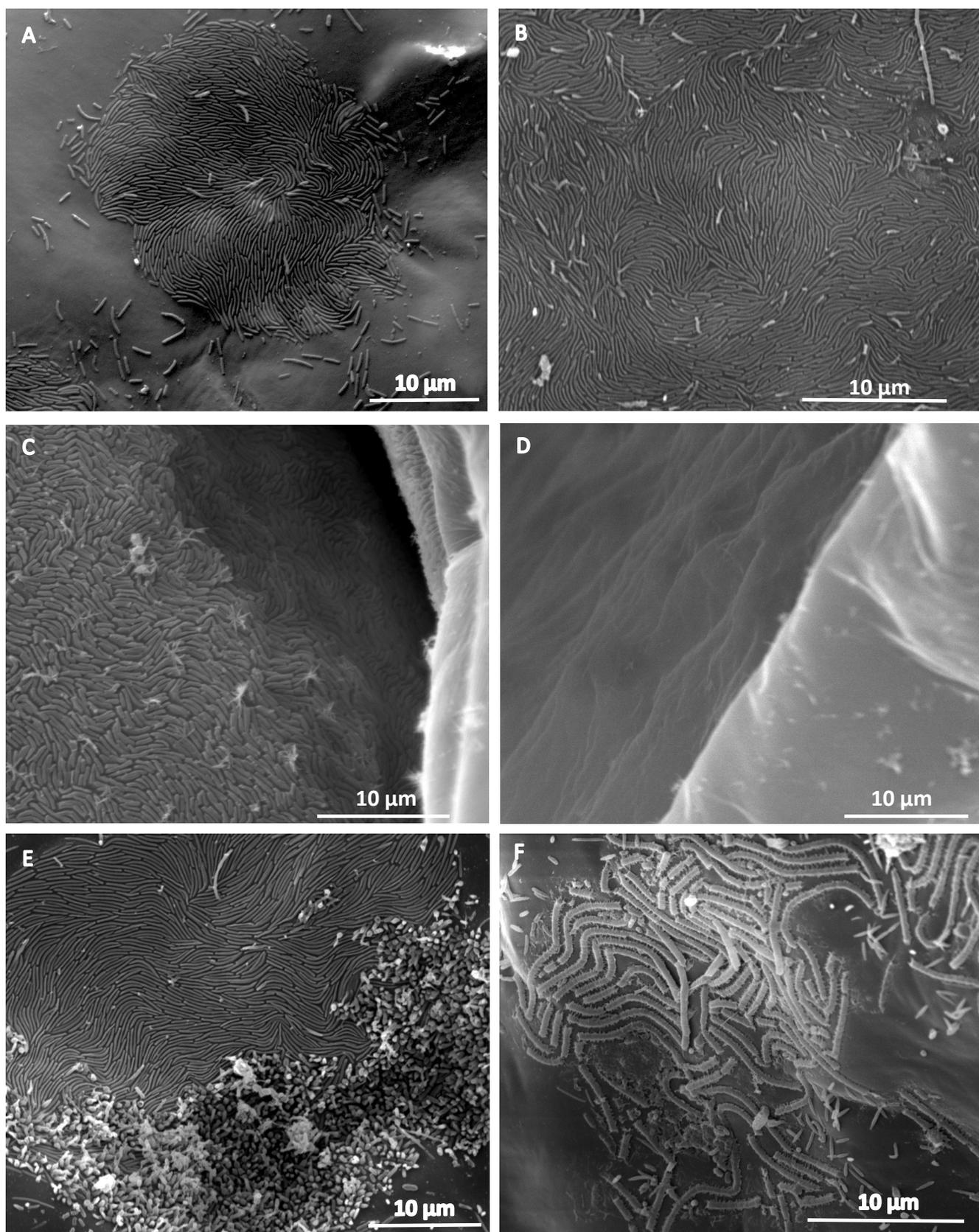


Figure 22. Surface de lamelles branchiales de diverses espèces de crabes. A. Lamelle branchiale du crabe semi-terrestre *Eurytium limosum*. B. Lamelle branchiale tapissée de bactéries en forme de bâtonnets chez l'espèce semi-marine *Ucides cordatus*. C. Lamelle branchiale tapissée de bactéries en forme de bâtonnets chez l'espèce marine *Dissodactylus primitivus*. D. Lamelle branchiale dépourvue de bactéries chez l'espèce marine *Portunus sayi* des radeaux de sargasses. E. Lamelle branchiale recouverte de bactéries à la verticale et à l'horizontale chez l'espèce terrestre *Cardisoma guanhumii*. F. Lamelle branchiale recouverte de patch de bactéries filamenteuses chez l'espèce terrestre *Gecarcinus lateralis*.

Les bactéries sont associées aux crabes sur leurs lamelles branchiales quel que soit le biotope analysé, à l'exception de trois espèces marines.

La surface des lamelles branchiales de la plupart des espèces est colonisée par des bâtonnets de différentes longueurs et épaisseurs (Fig.22).

Par la suite, nous nous sommes par la suite intéressés à la communauté bactérienne symbiotique de plusieurs de ces espèces. Nous avons sélectionné des crabes de même biotope (*E. limosum* et *M. rapax*) ainsi que des espèces de biotopes différents (*M. rapax* et *U. cordatus*) se développant respectivement en mangrove de bord de mer et en arrière mangrove respectivement (Fig.23). *Cardissoma guanhumi* se développe quant à lui dans les marais alors que *G. lateralis* et *O. quadrata* colonisent les plages de sable fin. Enfin nous avons choisi un crabe exclusivement marin (*D. primitivus*) ayant la particularité de parasiter l'oursin dollar *Meoma ventricosa*.

3.2 Diversité des bactéries associées aux branchies

Les deux spécimens de l'espèce *Ucides cordatus* analysés ont obtenu respectivement 3839 et 4107 reads après filtrage regroupés en 48 et 28 ASV respectivement. Les deux spécimens de l'espèce *Eurytium limosum* ont obtenu respectivement 7487 et 7342 reads regroupés en 64 et 70 ASV respectivement. Les deux spécimens d'*Ocypode quadrata* ont obtenu 7315 et 5599 reads regroupés en 73 et 51 ASV. Pour terminer, les deux spécimens de l'espèce *Cardisoma guanhumi* ont obtenu 17813 et 30863 reads regroupés en 184 et 172 ASV. Les deux spécimens de *Dissodactylus primitivus* ont produit 22406 et 26333 reads regroupés en 14 et 11 ASV.

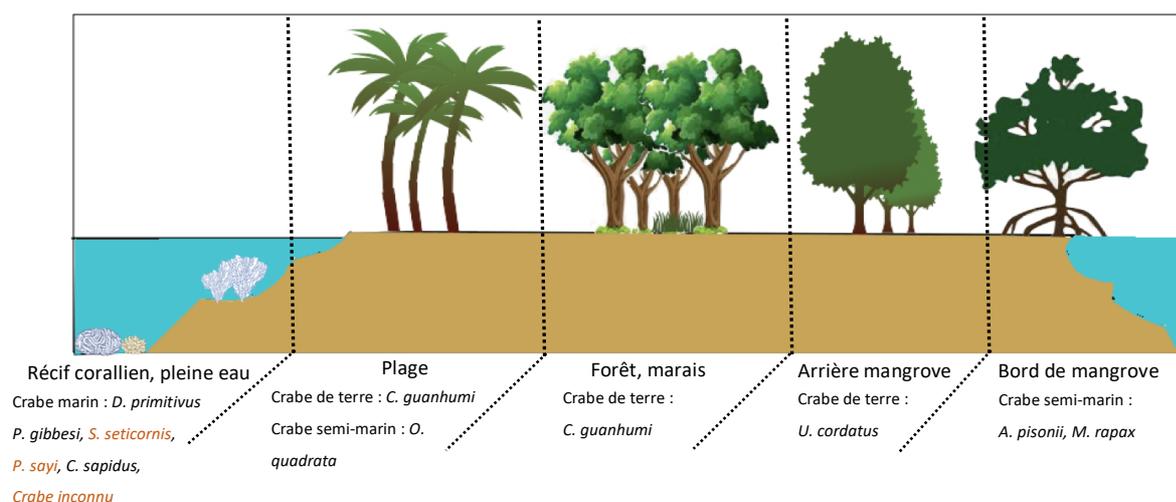


Figure 23. Schéma représentant les différents biotopes des crabes collectés

Tableau 7. Résumé du nombre de reads après filtrage qualité et d'ASV obtenues pour chaque individu après analyse avec Qiime2.

| Espèce | Reads obtenus après filtrage | Nombre d'ASV obtenues |
|-----------------------|------------------------------|-----------------------|
| <i>C. guanhumi 1</i> | 17813 | 184 |
| <i>C. guanhumi 2</i> | 30863 | 172 |
| <i>E. limosum 1</i> | 7487 | 64 |
| <i>E. limosum 2</i> | 7342 | 70 |
| <i>U. cordatus 1</i> | 3839 | 48 |
| <i>U. cordatus 2</i> | 4107 | 28 |
| <i>O. quadrata 1</i> | 7315 | 73 |
| <i>O. quadrata 2</i> | 5599 | 51 |
| <i>D. primitivus1</i> | 22406 | 14 |
| <i>D. primitivus2</i> | 26333 | 11 |

Les groupes bactériens retrouvés en majorité chez ces espèces correspondent aux Alphaproteobacteria, Bacteroidota, Gammaproteobacteria et Actinobacteria (Fig.24-25).

Chez *Ucides cordatus*, les deux spécimens sont dominés par les Alphaproteobacteria (70% et 83% des reads) puis par les Actinobacteria (5% et 13%) et les Bacteroidota (10% et 3%) [Fig.24].

Chez *Eurytium limosum*, les deux spécimens sont dominés par les Gammaproteobacteria (69% et 59%), puis par les Bacteroidota (19% et 29%), et les Alphaproteobacteria (9% sur les deux échantillons) [fig.24].

Chez *Ocypode quadrata*, les deux spécimens sont dominés par les Alphaproteobacteria (39% et 49%), puis par les Bacteroidota (51% et 23%) et les Gammaproteobacteria (6% et 23%) [fig.23].

Chez *Cardisoma guanhumi*, les deux spécimens sont dominés par les Alphaproteobacteria (38% et 61%), puis par les Bacteroidota (37% et 27%), et les Gammaproteobacteria (10% et 5%) [Fig.25].

Chez *Dissodactylus primitivus* les deux spécimens sont dominés par les Alphaproteobacteria (48% et 46%) et par les Bacteroidota (51% et 53%) [Fig.25].

Le tableau 8 présente les ASV majoritaires dans la communauté de chaque espèce de crabes ainsi que leur abondance dans chacun des échantillons. Chacune des ASV a été comparée par BLAST aux données disponibles sur GenBank (NCBI) afin d'identifier la bactérie dont la séquence d'ARNr 16S est la plus proche.

Dans la communauté des différentes espèces la plupart des ASV partagées sont majoritaires. Dans la communauté bactérienne d'*U. cordatus* parmi les ASV abondantes, 8 sont partagées entre les deux individus d'*U. cordatus*.

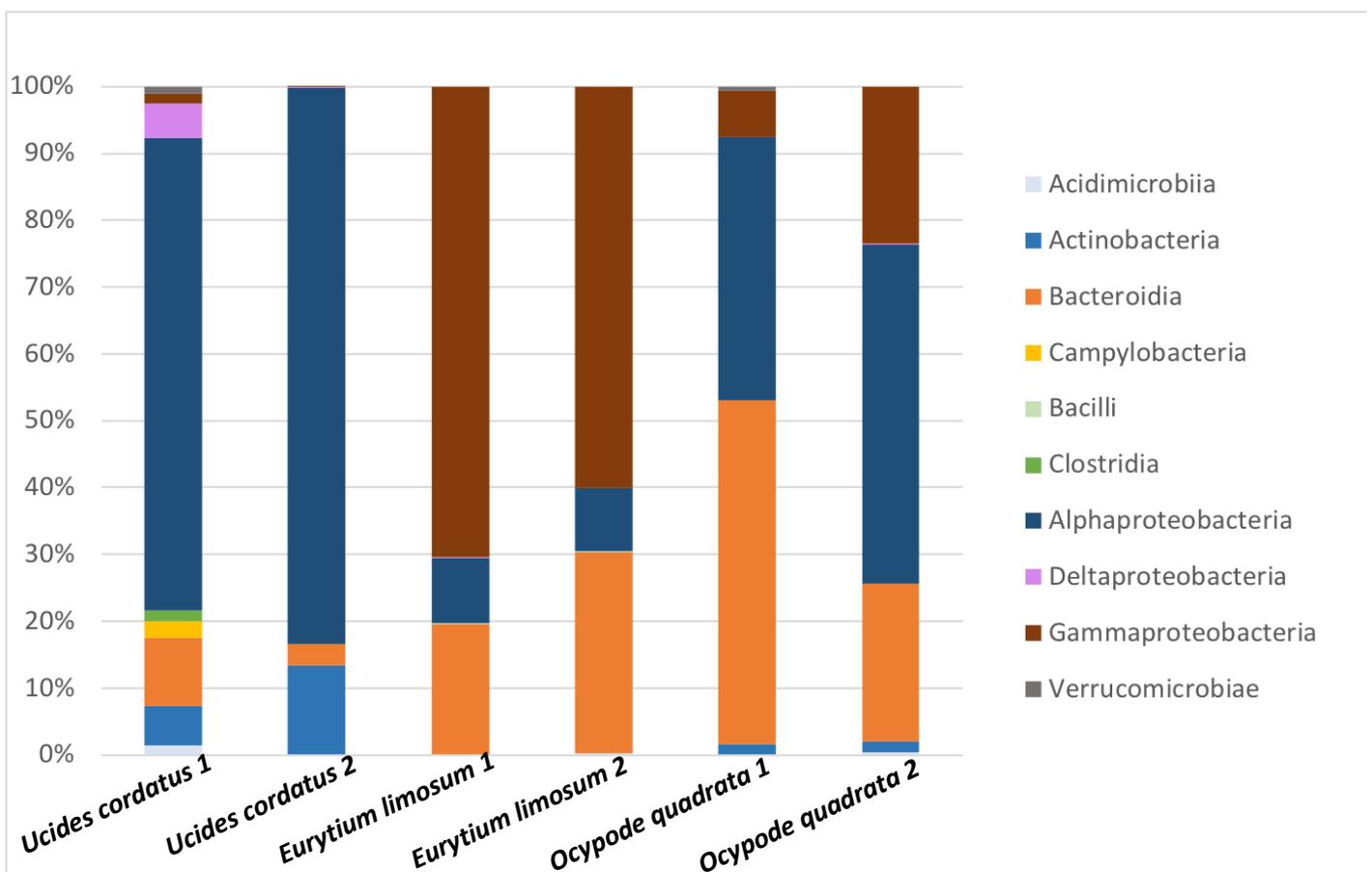


Figure 24. Barplot montrant les groupes bactériens dominants dans la communauté bactérienne de *Ucides cordatus*, *Eurytium limosum* et *Ocypode quadrata*.

Pour *E. limosum* parmi les ASV abondantes, 5 sont partagées entre les deux échantillons et sont considérées majoritaires

Pour *O. quadrata* parmi les ASV abondantes 5 sont partagées entre les deux échantillons.

Quatre ASV sont considérées majoritaires.

Pour *C. guanhumi*. Soixante ASV sont partagées entre les deux échantillons, 4 ASV sont considérées majoritaires.

Pour *D. primitivus*. Cinq ASV sont partagées entre les échantillons, ce sont des ASV abondantes. Trois sont considérées comme majoritaires.

Les résultats concernant *A. pisonii* et *M. rapax* ont déjà été analysés dans le chapitre 3, mais ont tout de même été ajoutés au tableau pour avoir une vision globale de toutes les espèces analysées au cours de ces 3 années de thèse.

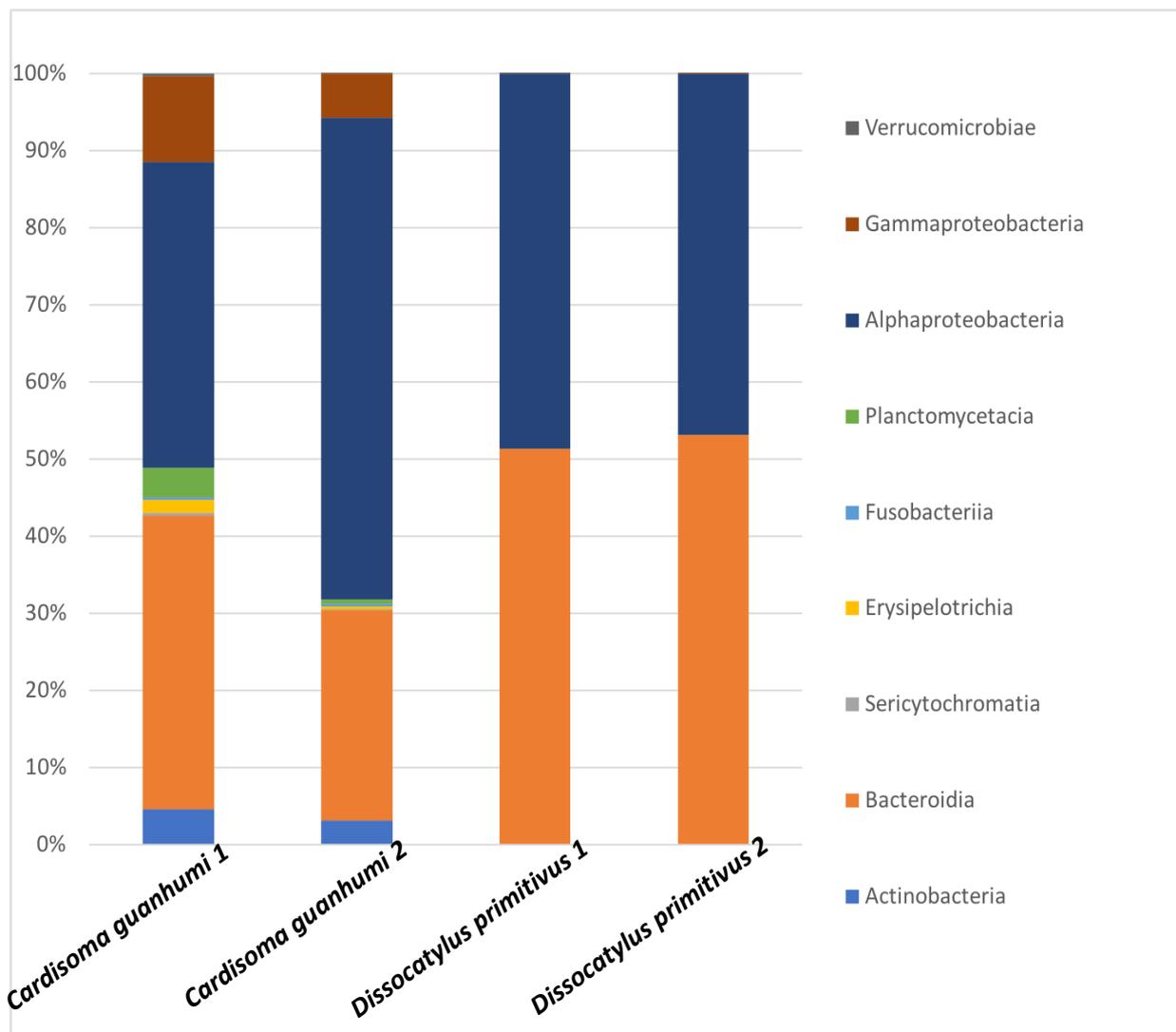


Figure 25. Barplot montrant les groupes bactériens dominants dans la communauté bactérienne des crabes *Cardisoma guanhumi* et *Dissodactylus primitivus*

Tableau 8. Noms et fréquences (en proportion des reads obtenues) des ASV dominantes chez chaque espèce de crabe, et similarité avec la séquence la plus proche dans la base de données GenBank. Le nombre de nucléotides différents est noté seulement pour les ASV présentant entre 97 et 99% de similarité.

| Espèce de crabe | Nom ASV | Fréquence de l'ASV dans les deux échantillons | Classe | Séquence la plus similaire | % similarité | Nb de nt différents | Origine de la séquence proche |
|-------------------------|---------|---|-----------------------|--------------------------------|--------------|---------------------|--|
| <i>Ucides cordatus</i> | UC1 | 14 et 17% | Alphaproteobacteria | Rhodobacteracea KT944883 | 99% | 5 | Branchies de <i>Uca urvillei</i> en Afrique |
| | UC2 | 9 et 12% | | Rhodobacteracea KT944883 | 99% | 4 | Branchies de <i>Uca urvillei</i> en Afrique |
| | UC3 | 9 et 11% | | Rhodobacteracea KT944883 | 99% | 6 | Branchies de <i>Uca urvillei</i> en Afrique |
| | UC4 | 8 et 10% | | Rhodobacteracea KT944883 | 99% | 4 | Branchies de <i>Uca urvillei</i> en Afrique |
| | UC5 | 7 et 7% | | Rhodobacteracea KT944883 | 99% | 4 | Branchies de <i>Uca urvillei</i> en Afrique |
| | UC6 | 6 et 8% | | Rhodobacterace KT944881 | 99% | 5 | Branchies de <i>Uca urvillei</i> en Afrique |
| <i>Eurytium limosum</i> | EL1 | 15 et 13% | Gammaproteobacteria | HQ673365 | 95% | // | Dans l'océan Pacifique |
| | EL2 | 13 et 12% | | HQ673365 | 95% | // | Dans l'océan Pacifique |
| | EL3 | 10 et 10% | | HQ673365 | 95% | // | Dans l'océan Pacifique |
| | EL4 | 10 et 6% | Bacteroidota (Phylum) | JX100096 | 91% | // | Dans le sol d'une forêt à Taiwan |
| | EL5 | 7 et 6% | Gammaproteobacteria | HQ673365 | 96% | // | Dans l'environnement en océan Pacifique |
| <i>Ocypode quadrata</i> | OQ1 | 7 et 6% | Bacteroidota | Flavobacteriaceae KT944898. | 94% | // | Dans les branchies du crabe <i>Perisesarma guttatum</i> en Afrique |

| | | | | | | | |
|-------------------------------------|------|-----------|---------------------|------------------------------------|------|----|---|
| | OQ2 | 7 et 4% | Alphaproteobacteria | Rhodobacteraceae KT944883 | 99% | 4 | Dans les branchies du crabe <i>Uca urvillei</i> en Afrique |
| | OQ3 | 5 et 4% | Bacteroidota | Flavobacteriaceae KT944898. | 94% | // | Dans les branchies du crabe <i>Perisesarma guttatum</i> en Afrique |
| | OQ4 | 4 et 14% | Gammaproteobacteria | HQ673365 | 95% | // | En océan Pacifique |
| <i>Cardisoma guanhumii</i> | CG1 | 6 et 24% | Alphaproteobacteria | LN564872 | 99% | 1 | Au Panama |
| | CG2 | 5 et 2% | Gammaproteobacteria | <i>Variovorax sp.</i> HE860888 | 99% | 2 | Retrouvée chez la plante <i>Saxifraga oppositifolia</i> en Norvège |
| | CG3 | 5 et 3% | Bacteroidota | KX634902 | 98% | 8 | Provenant d'un réacteur |
| | CG4 | 2 et 3% | Alphaproteobacteria | LR654210 | 98% | 6 | Retrouvée dans des eaux usées |
| <i>Dissodactylus primitivus</i> | DP1 | 47 et 44% | Alphaproteobacteria | <i>Roseovarius sp.</i> KF464199 | 99% | 4 | Retrouvée sur un chantier naval en Inde |
| | DP2 | 40 et 43% | Bacteroidota | KY190872 | 99% | 1 | Retrouvée dans des sédiments marins en Antarctique |
| | DP3 | 1 et 1% | Bacteroidota | KY190872 | 99% | 3 | Dans des sédiments marins en Antarctique |
| <i>Aratus pisonii</i> | ARA1 | 39 et 21% | Alphaproteobacteria | KT944808 | 100% | // | Dans les branchies de <i>Perisesarma guttatum</i> en Afrique |
| | ARA2 | 32 et 13% | Bacteroidota | KY282466 | 98% | 4 | Dans l'environnement en Corée du Sud |
| | ARA3 | 19 et 2% | | KC358318 | 90% | // | Dans le Lac Walker aux États-unis |
| | ARA4 | 13 et 1% | | JX100096 | 88% | // | Dans le sol d'une forêt de Taiwan |
| | ARA5 | 10 et 2% | | KT944898 | 92% | // | Dans les branchies de <i>Perisesarma</i> |

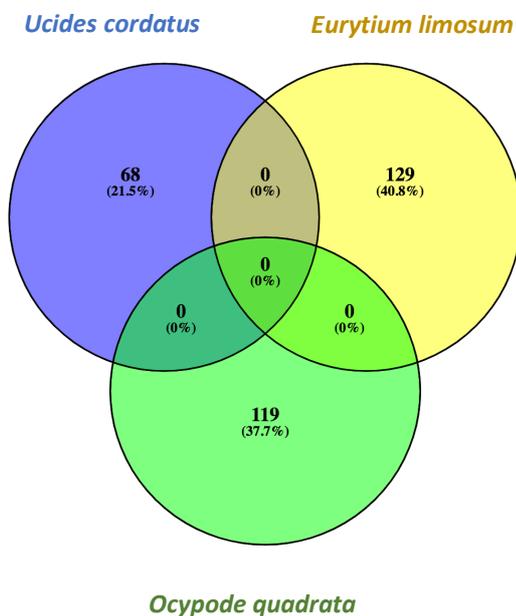
| | | | | | | | |
|---------------------|------|-----------|---------------------|-----------------------------------|-----|----|--|
| | | | | | | | <i>guttatum</i> en Afrique |
| <i>Minuca rapax</i> | MIN1 | 23 et 9% | Alphaproteobacteria | KT944871 | 99% | 1 | Dans les branchies du crabe <i>Perisesarma guttatum</i> en Afrique |
| | MIN2 | 2 et 20% | Bacteroidota | KT944898 | 93% | // | Dans les branchies du crabe <i>Perisesarma guttatum</i> en Afrique |
| | MIN3 | 16 et 15% | Acidimicrobiia | KF616658 | 95% | // | Dans l'environnement (Hydrate Ridge |
| | MIN4 | 3 et 15% | Alphaproteobacteria | <i>Rosevarius sp.</i> MG996626 | 98% | 6 | Surface de microplastiques |
| | MIN5 | 12 et 0% | Bacteroidia | FJ213789 | 99% | 2 | En eau peu profonde en Venice du Sud |

Pour chaque espèce nous avons sélectionné entre 3 et 6 ASV étant les plus abondantes de la communauté.

3.4 Comparaison des ASV les plus abondantes ?

Les ASV ont été comparées entre espèces de crabes. Les espèces présentées ci-dessous (Fig.26) n'ont pas été analysées au cours de la même procédure, ce qui n'a pas permis de rassembler les résultats des différentes analyses pour réaliser certains graphiques et diagrammes. Les résultats seront donc comparés seulement entre des espèces ayant fait partie de la même analyse.

A



B

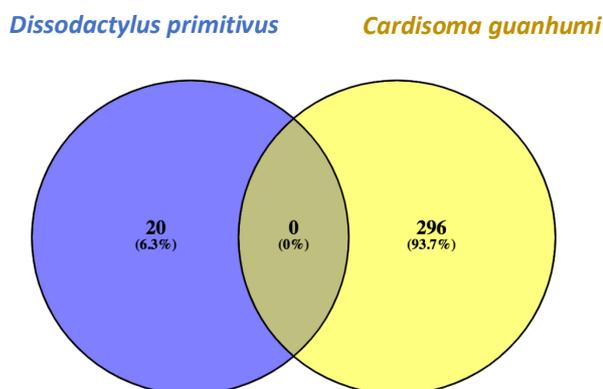


Figure 26. A. Diagramme de venn réalisé avec la totalité des ASV des deux échantillons pour chaque espèce. 68 ASV sont retrouvées pour l'espèce *Ucides cordatus*, 129 pour *Eurytium limosum* et 119 pour *Ocypode quadrata*, aucune ASV n'est partagée entre les 3 espèces concernées l'analyse. B. Diagramme de venn réalisé avec les séquences des deux échantillons pour chaque espèce. 20 ASV sont retrouvées chez *Dissodactylus primitivus* et 296 ASV chez *Cardisoma guanhumii*, aucune ASV n'est partagée entre ces deux espèces.

Il n'y a pas d'ASV partagées entre les espèces *U. cordatus*, *E. limosum* et *O. quadrata*, ni entre les espèces *D. primitivus* et *C. guanhumii*. Malgré des ressemblances en termes de composition au niveau de la classe ou du phylum, chacune des espèces de crabes possède donc une communauté bactérienne symbiotique bien distincte au niveau des ASV.

N'ayant pas pu comparer les ASV de toutes les espèces étudiées, seules les espèces des mêmes familles ont été comparées. Les ASV dominantes des espèces *M. rapax*, *O. quadrata* et *U. cordatus* de la famille des Ocypodidae sont comparées. Toutes les ASV dominantes d'*U. cordatus* sont similaires à l'ASV « OQ2 » d'*O. quadrata* à 99%.

Pour *M. rapax* et *U. cordatus*, deux ASV présentent 97% de similarité, MIN2 et OQ1.

Les ASV OQ1 et OQ3 de l'espèce *O. quadrata* sont similaires à 97% à l'ASV MIN2 de *M. rapax*.

Certains crabes de familles différentes présentent des ASV similaires. Dans la communauté d'*A. pisonii* (Sesarmidae) et d'*O. quadrata* (Ocypodidae) deux ASV sont similaires à une ASV retrouvée sur les branchies du crabe *Perisesarma guttatum* (Sesarmidae) en Afrique. Leur communauté de bactéries dominantes a donc été comparée sur NCBI analyze. Les ASV ARA1 et OQ2 sont similaires entre elles à 99% (4nt différents). Une étude sera par la suite réalisée pour connaître plus en détail leur parenté, à travers une analyse phylogénétique des ASV les plus fréquentes chez les différentes espèces de crabes.

4. Discussion

Chaque espèce abrite une communauté bactérienne symbiotique des branchies qui lui est propre

Malgré des similitudes à des niveaux taxonomiques élevés, et une dominance de phyla ou classes comparables entre les différents crabes analysés, chaque espèce de crabe possède une communauté ectosymbiotique spécifique composée d'ASV qui lui sont propres. Même si certaines d'entre elles sont proches, elles ne sont jamais rigoureusement identiques.

Les mêmes observations sont rapportées par Booth (2018). Dans son étude, chaque espèce possède un microbiome spécifique et les crabes analysés présentent des bactéries en formes de bâtonnets ou de cocci sur les lamelles branchiales. Chez l'espèce semi-marine, *Cranuca inversa* Booth, (2018), les symbiotes sont présents sur la lamelle branchiale en position verticale comme observé sur l'espèce terrestre *Cardisoma guanhumi* de cette étude (Fig.22E). Les taxons majoritaires chez les espèces étudiées correspondaient à des Alphaproteobacteria et des Acidimicrobiia (Booth, 2018) tandis que dans notre étude des Alphaproteobacteria et des Bacteroidota sont présentes en majorité chez les communautés bactériennes des crabes, exception faite du crabe de mangrove, *Eurytium limosum*, dont la communauté est dominée par des Gammaproteobacteria.

Des liens entre mode de vie, familles de crabes et symbiose ?

Tubuca urvillei (*Uca urvillei*) de la famille des Ocypodidae présente en abondance des bactéries de la famille des Phyllobacteriaceae (Booth, 2018) alors que dans la présente étude la séquence la plus abondante chez *M. rapax* de la famille des Ocypodidae, correspond également à une bactérie de la famille des Phyllobacteriaceae.

Dans notre étude comme dans celle de Booth (2018), tous les crabes étudiés de la famille des Ocypodidae présentent l'association bactérienne sur les branchies peu importe leur mode de vie (terrestre ou semi-terrestre). Il se pourrait donc que l'association concerne toutes les espèces de crabes de la famille des Ocypodidae. Ce cas de figure est observé chez certaines familles de bivalves comme les Lucinidae et les Vesicomidae, où toutes les espèces décrites à ce jour arborent un même type d'association symbiotique avec des bactéries sulfoxydantes très proches (Roeselers & Newton, 2012). D'ailleurs, des bactéries similaires sont retrouvées dans les communautés de crabes de même famille (cette étude ; Booth 2018).

Le contraire est observé pour les crabes exclusivement marins de la famille des Portunidae, où *Portunus sayi* ne présente pas de bactéries symbiotiques au contraire de *Callinectes sapidus*. Ce cas s'apparente plus à celui des bivalves de la famille des Thyasiridae où seules quelques espèces vivent en symbiose avec des bactéries endosymbiotiques de branchies, les autres étant asymbiotiques. Cela implique des bactéries très différentes en fonction des espèces hôtes (Rodrigues & Duperron, 2011; Roeselers & Newton, 2012).

5. Conclusion

Les espèces de crabes de Guadeloupe présentent des associations symbiotiques similaires à celles observées en Afrique. L'environnement semble avoir un faible impact sur la communauté car chaque espèce de crabe possède une communauté qui lui est propre, et ne partage pas d'ASV avec les autres espèces même celles évoluant dans le même biotope. Tout de même, les crabes faisant partie de la même famille présentent des ASV relativement proches entre elles. Il sera intéressant d'explorer ces associations en fonction des familles de crabes afin de connaître comment elles s'établissent chez différentes espèces de crabes, et de comprendre l'histoire de ces associations dans les différentes familles.

Discussion Générale

1. Une association répandue chez les crabes brachyours

Cette étude a mis en lumière l'existence d'interactions bactériennes sur les branchies de 11 espèces de crabes de Guadeloupe. Dans cette thèse, parmi les 14 espèces étudiées seules 3 espèces exclusivement marines ne présentaient pas de bactéries sur les branchies. Les autres, 3 crabes marins, 5 crabes semi-marins (passe une partie de leur temps submergé dans l'eau), et 3 crabes terrestres hébergent des bactéries ectosymbiotiques à la surface de leurs branchies. Ces crabes appartiennent aux familles des Gecarcinidae, Grapsidae, Inachoididae, Ocypodidae, Panopeidae, Percnidae, Pinnotheridae, et Portunidae. Ce phénomène d'association sur les branchies a été préalablement observé dans les mangroves d'Afrique et d'Asie sur plusieurs espèces de crabes ayant un mode de vie complètement marin, complètement terrestre ou mixant la vie terrestre et marine. Ces crabes précédemment observés appartiennent aux familles des Dotillidae, Grapsidae, Ocypodidae, Portunidae et Sesarmidae (Booth, 2018). En Chine, le crabe à mitaines d'eau douce, *Eriocheir sinensis* de la famille des Varunidae présente aussi des bactéries se développant sur ses branchies (Zhang *et al.*, 2016).

L'association entre crabes et bactéries sur les branchies est donc une interaction qui semble répandue de par le monde et qui concerne des crabes Brachyours de plusieurs biotopes. Dans de nombreux pays, les crabes ont un intérêt écologique ou encore économique. En Guadeloupe, le crabe de mangrove, *Ucides cordatus*, appelé « crabe à barbe ou crab bab' » en raison des excroissances de la cuticule recouvrant ses pattes, est très consommé lors des fêtes de Pâques. Le « crabe blanc », *Cardisoma guanhumi*, fait aussi partie des mets appréciés en Guadeloupe. Lors de cette étude, aucune bactérie pathogène pour l'homme n'a été retrouvée dans les communautés branchiales. Outre le fait que ces crabes soient appréciés pour leur qualité gustative, certaines espèces ont un rôle écologique majeur notamment dans l'écosystème de mangrove. La création de terriers par les crabes a un impact sur la composition du microbiome du sédiment. Cette activité permet aux bactéries de former des réseaux complexes avec les archae et champignons des sols, qui ont tous ensemble, un impact sur la dégradation de la matière organique et la disponibilité des nutriments dans le milieu [Fig.27] (Booth *et al.*, 2019). A marée haute, les crabes piègent de l'air dans leurs terriers, ce

qui oxygène le sédiment initialement anoxique tout le long de la paroi des terriers créant ainsi des micro-niches aérobies favorables à une activité accrue de biodégradation (Booth *et al.*, 2019). La réoxygénation du sédiment empêche aussi l'accumulation de sulfures, qui

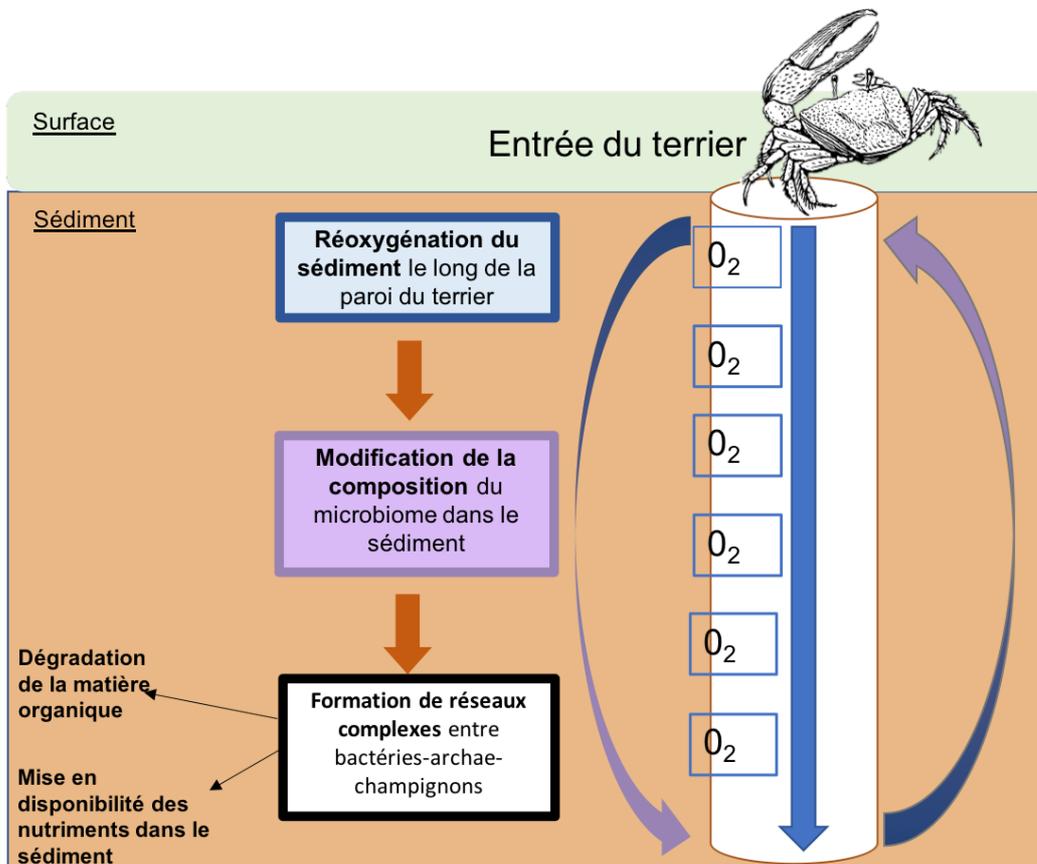


Figure 27. Schéma expliquant les réactions induites par l'activité des crabes violonistes dans le sédiment (modifié d'après Booth *et al.*, 2019)

pourraient être toxiques pour les animaux dont les crabes (Booth *et al.*, 2019). Les crabes ont un impact non négligeable sur la structure de la mangrove ainsi que sur sa production. Les bactéries de la carapace des crabes réalisent toutes les réactions du cycle de l'azote, principalement la fixation du diazote ainsi que l'oxydation d'ammonium/méthane (Kristensen, 2008 ; Smith *et al.*, 2009 ; Zilius *et al.*, 2020). Les bactéries des crabes de mangrove de cette étude, pourraient également participer à la fixation de l'azote au même titre que les bactéries présentes sur la carapace des crabes. Elles pourraient aussi être impliquées dans le processus d'excrétion connue chez les crabes et donc avoir un impact direct dans l'écosystème de mangrove. Cependant c'est une piste de recherche qui n'a pas été exploré.

Pour mieux comprendre le rôle des crabes et de leurs symbiotes dans l'écosystème de mangrove, il est important de comprendre et de caractériser ces organismes dans leur entièreté. Il apparaît donc important de s'intéresser à la raison de l'établissement et du maintien de cette association bactéries-crustacés.

La symbiose se déroulant chez les crabes présente les mêmes caractéristiques morphologiques peu importe le biotope de collecte ou les espèces concernées. Des bactéries en forme de bâtonnets et de coques sont retrouvées en position verticale ou horizontale en surface des lamelles branchiales des crabes. Les bactéries forment le plus souvent des tapis bactériens, parfois quelques amas de bactéries sont observés sur une lamelle, ces observations étant similaires à celles de Booth (2018) au cours de son travail de thèse. Aucune bactérie intracellulaire n'a pu être observée dans les tissus branchiaux dans notre étude, ni dans le cas des crabes étudiés par Booth (2018). Chacune des espèces de crabe possède une communauté ectosymbiotique spécifique, ces communautés étant composées en majorité par des Alphaproteobacteria et des Bacteroidota. En Afrique et en Asie, les groupes dominants sont des Alphaproteobacteria et des Acidimicrobiia (Booth, 2018).

Les crabes appartenant à une même famille possèdent parfois des bactéries très proches entre elles si l'on se base sur la comparaison des séquences des ASV (Amplicon Sequence Variant) qui sont similaires, mais pas identiques pour autant. Ainsi, *Ucides cordatus* (Ocypodidae) abrite des ASV proches à 99% d'une ASV présente chez *Ocypode quadrata* (Ocypodidae). *Minuca rapax* (Ocypodidae) et *O. quadrata* partagent des ASV similaires à 97%. Cependant même entre crabes collectés sur un même site, nous n'avons pas d'ASV rigoureusement identiques partagées entre deux espèces, ce qui soutient l'idée d'une association très spécifique.

De plus, malgré la distance entre les mangroves d'Afrique, d'Asie et de Guadeloupe, les crabes *O. quadrata* et *U. cordatus* (Ocypodidae) présentent des ASV dont les séquences sont similaires à 99% à une séquence trouvée chez le crabe *Tubuca urvillei* (Ocypodidae) [database du NCBI]. La bactérie la plus abondante chez *Aratus pisonii* (Sesarmidae), a une séquence d'ARNr 16S (région V4-V5) identique à celle d'une bactérie présente chez le crabe *Perisesarma guttatum* (Sesarmidae) étudiée en Afrique. Cela suggère que les crabes d'une même famille auraient tendance à sélectionner des bactéries phylogénétiquement proches, voire que certaines soient identiques dans des régions pourtant très éloignées, posant la question de la manière dont elles se sont dispersées entre ces sites, ou de leur origine antérieure à la

divergence entre espèces hôtes. Les bivalves Vesicomidae de sources hydrothermales et de suintements froids sont un exemple d'espèces associées à des symbiotes très similaires phylogénétiquement et appartenant à la Classe des Gammaproteobacteria malgré la différence d'habitats et la grande distance géographique entre certaines espèces (Cavanaugh *et al.*, 2006). Cependant, certaines ASV sont similaires entre des crabes de familles différentes. Cela peut être dû au fait que ces bactéries réalisent les mêmes fonctions métaboliques, ou encore leur capacité à s'accommoder à des conditions locales régnant à la surface des branchies, qui pourraient être similaires chez des crabes pourtant différents. La ressemblance entre symbiotes colonisant des espèces hôtes appartenant à des familles différentes est observée chez les bivalves de différentes familles (Vesicomidae et Thyasiridae) qui présentent un symbiote similaire, suggérant alors un « host shift » à un moment donné entre les bivalves hôtes, c'est-à-dire un changement d'hôte (Duperron *et al.*, 2013). Le même phénomène pourrait se produire chez les crabes. L'étude de Booth *et al.* (2019) montre en effet que des facteurs environnementaux peuvent influencer la composition des communautés microbiennes du sédiment. Cependant, mêmes si les bactéries retrouvées changent, les fonctions métaboliques (phototrophie, photoautotrophie anoxygénique, chimiotrophie) réalisées dans le sédiment de mangrove restent les mêmes, on parle alors de redondance fonctionnelle (Louca *et al.*, 2018). Cette redondance fonctionnelle connue dans les sédiments pourrait également exister chez les symbiotes de crabes, avec des ASV différentes qui rempliraient des fonctions comparables.

Pour approfondir les connaissances sur la nature de la relation symbiotique entre les crabes et leurs bactéries, nous avons recherché à déterminer le mode d'acquisition des symbiotes par les nouvelles générations de crustacés.

2. Un mode de transmission environnemental.

Nous nous sommes concentrés sur deux espèces semi-marines pour déterminer le mode de transmission : *Aratus pisonii* et *Minuca rapax*.

Les inductions de pontes menées chez ces deux espèces ont permis d'obtenir en laboratoire des larves zoé 1 juste après l'éclosion. Nous n'avons malheureusement pas réussi à obtenir les stades larvaires suivants en quantité suffisante pour réaliser une extraction d'ADN et tester la présence de bactéries. Toutefois, les résultats négatifs des PCR sur les gonades et les œufs des femelles ainsi que sur le premier stade larvaire, zoé 1, obtenus au laboratoire (pour les 2

espèces de crabes) excluent la transmission verticale des symbiotes. En effet, les gamètes sont dépourvus de symbiotes chez *A. pisonii* et *M. rapax*, et les larves obtenues immédiatement après l'éclosion sont aposymbiotiques, état caractéristique d'une transmission horizontale et/ou environnementale (Bright & Bulgheresi, 2010). De plus, les analyses sur les stades zoé 1, 3 et mégalope d'*A. pisonii* récupérés directement dans le milieu naturel confirment l'absence de symbiotes jusqu'au dernier stade larvaire y compris dans la nature et en dehors de biais qui pourraient être liés à nos conditions expérimentales. Dans certains cas de symbiose marine à transmission environnementale, l'infection des nouvelles générations commence après la métamorphose du dernier stade larvaire en juvéniles comme c'est le cas chez les bivalves Lucinidae (Gros *et al.*, 1998), Mytilidae (Laming *et al.*, 2018), ou encore les crevettes hydrothermales du genre *Rimicaris* (Guri *et al.*, 2012).

Étant absentes dans les larves, nous avons recherché la présence des bactéries composant la communauté des juvéniles dans l'environnement, plus précisément dans l'eau de terrier de *M. rapax* et à la surface des branches et racines du palétuvier rouge *Rhizophora mangle* qui abritent les adultes d'*Aratus pisonii*. Les résultats de ces analyses montrent que toutes les séquences majoritaires chez les juvéniles de *M. rapax* sont retrouvées dans l'eau de terrier. En revanche, seules 2 ASV majoritaires chez le juvénile d'*A. pisonii* sont similaires à 99% aux ASV retrouvées dans l'eau de terrier de *M. rapax*. Ce résultat s'explique par le fait qu'au stade juvénile, *A. pisonii* se développe dans le même biotope (au sol et dans la vase) que *M. rapax* tandis que l'adulte est arboricole. Cela montre que certaines bactéries composant la communauté des juvéniles d'*A. pisonii* sont présentes dans l'eau de terrier, et que l'on peut faire l'hypothèse que les crabes juvéniles acquièrent leur communauté bactérienne à partir d'un stock naturellement présent dans l'environnement avant de commencer leur vie arboricole. La transmission est donc environnementale pour ces deux espèces. Il est possible que les autres ASV composant la communauté du juvénile d'*A. pisonii* n'aient pas été retrouvées car elles étaient en quantité trop faible dans le milieu naturel pour pouvoir être détectées. Dans le cas d'une transmission environnementale, les symbiotes présents chez un hôte peuvent être rares voire indétectables dans l'environnement (Methou *et al.*, 2019). Chez les amphibiens, les bactéries faisant partie du microbiote cutané sont rares mais pas absentes dans l'environnement (Walke *et al.*, 2014).

Malgré ce partage d'un même biotope pour les stades juvéniles de ces 2 espèces, les communautés bactériennes de ces deux crabes sont bien distinctes chez les juvéniles à l'exception d'une séquence majoritaire similaire à 99%.

Les comparaisons avec les communautés bactériennes des branchies des adultes suggèrent que celles des juvéniles s'établissent progressivement au cours de la vie du crabe. Chez *A. pisonii*, toutes les ASV dominantes de l'adulte sont retrouvées chez les juvéniles en différentes proportions, et parmi elles 2 sont déjà dominantes dans la communauté des juvéniles. Chez *M. rapax*, 3 ASV sur les 5 les plus abondantes présentes chez les adultes (dont 2 dominantes) sont aussi présentes chez le juvénile. Il n'est pas rare d'observer une différence de composition entre les communautés des adultes et des juvéniles d'une espèce hôte, comme c'est le cas pour la crevette *Rimicaris exoculata* (Guri *et al.*, 2012; Ávila, 2016). L'observation au microscope électronique à balayage d'un individu après mue, montre d'ailleurs des lamelles branchiales dépourvues de tout symbiote. Cette caractéristique concerne aussi les crevettes des sources hydrothermales qui perdent la couverture bactérienne de leur chambre branchiale après chaque mue (Corbari *et al.*, 2008). La communauté bactérienne est alors reconstituée progressivement grâce aux bactéries compétentes présentes dans le milieu (Szafranski *et al.*, 2015). Par conséquent, la transmission est alors considérée comme environnementale (Guri *et al.*, 2012). Il est très probable que le même mécanisme soit à l'œuvre dans le cas des crabes, avec une recolonisation de la surface branchiale après chaque mue (Fig.28).

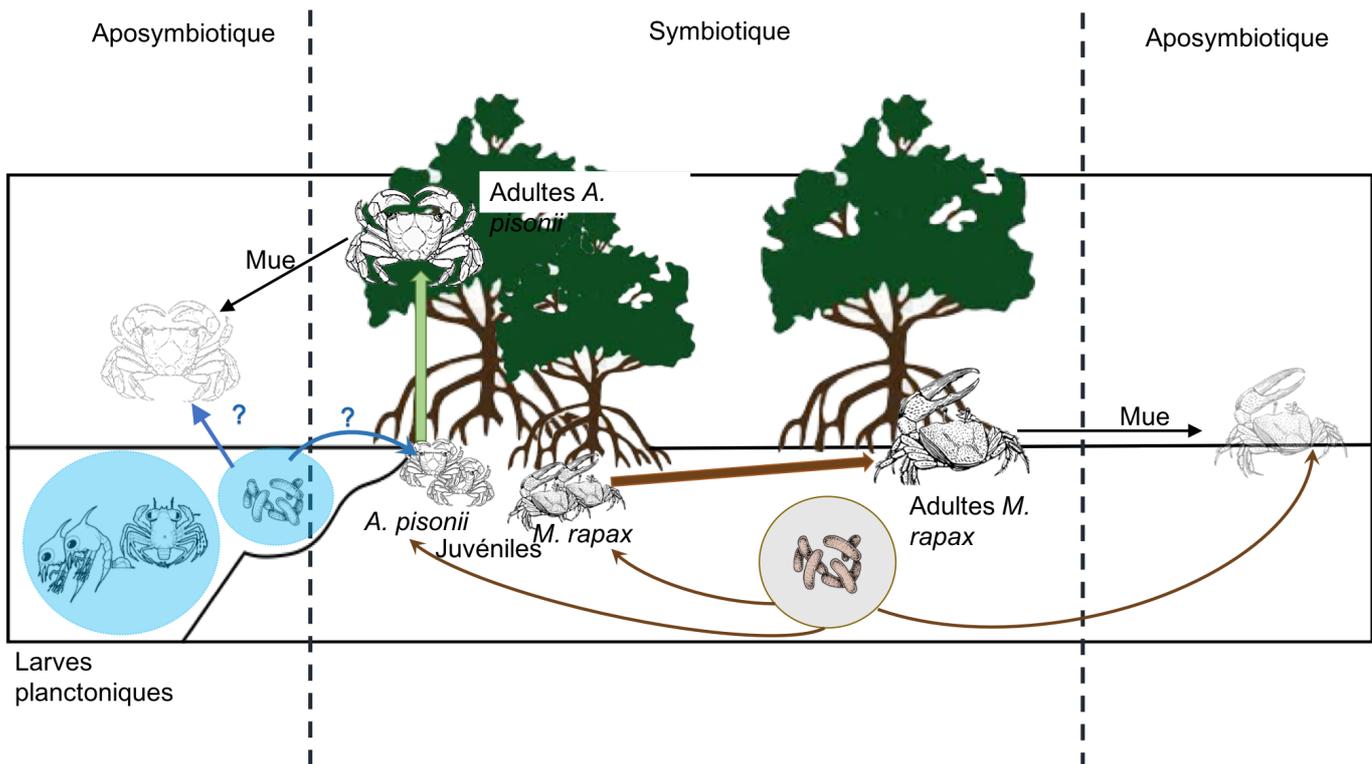


Figure 168. Schéma de colonisation par les bactéries du milieu au cours du cycle de vie des espèces *A. pisonii* et *M. rapax*. Les larves planctoniques des deux espèces sont dépourvues de symbiotes. La colonisation commence au stade juvénile. A ce stade, les deux espèces sont observées sur le sédiment de mangrove. Elles sont colonisées par les bactéries compétentes retrouvées dans l'eau de terrier de *M. rapax*. Au passage à la vie adulte l'espèce *A. pisonii* est observé sur les branchies et racines de palétuviers tandis que l'adulte de *M. rapax* reste sur le sédiment. Après chaque mue, les crabes perdent leurs bactéries symbiotiques et sont de nouveau colonisés par les bactéries du milieu. Les bactéries présentes sur l'exuvie (la mue) pourraient recoloniser la crabe fraîchement mué, si l'exuvie n'est pas consommée par le crabe.

3. Rôle hypothétique des symbiotes de branchies chez les crabes

Ayant caractérisé la symbiose d'un point de vue ultrastructural, phylogénétique et ayant évalué la transmission des symbiotes aux nouvelles générations, la nature des échanges existants entre les crabes et leurs bactéries a pu être abordée grâce à une approche métabolomique permettant d'analyser les métabolites secondaires présents au niveau de ce tissu branchial.

Quatre espèces ont été analysées : les crabes semi-marins de mangrove *Aratus pisonii*, *Minuca rapax* et *Ucides cordatus* ainsi que le crabe exclusivement marin retrouvé dans les récifs coralliens *Percnon gibbesi*.

Les premières analyses métabolomiques réalisées à partir des branchies de ces espèces ont révélé la présence de molécules à activité antimicrobienne. La cyclosérine, est un antimicrobien produit par les bactéries du genre *Streptomyces* et par *Pseudomonas fluorescens* (Shoji *et al.*, 1984). Ces bactéries étant absentes des communautés bactériennes

des 4 espèces de crustacés analysées, d'autres espèces de bactéries encore indéterminées pourraient être à l'origine de la sécrétion de cet antibiotique chez les crabes de cette étude. Le deuxième antibiotique détecté, la trigonelline est un antibiotique isolé à ce jour uniquement à partir de la plante *Trigonella foenum-graecum* (Suwetja *et al.*, 1989; Anwar *et al.*, 2018). La trigonelline pourrait être produite ou accumulée par les crabes lors de l'ingestion de végétaux de mangrove pouvant également produire cette molécule. Une seconde étude est en cours d'analyse sur les mêmes espèces de crabes. Cette fois, les métabolites secondaires ont été recherchés dans les reins, l'hépatopancréas ainsi que dans les muscles. Un crabe non symbiotique a également fait l'objet de cette analyse. Cela nous permettra d'affiner l'hypothèse sur l'origine bactérienne ou autre des antimicrobiens trouvés (cyclosérine, trigonelline).

Ces découvertes tendent à valider le caractère symbiotique de la relation. En effet, les crustacés sont très souvent colonisés par des organismes considérés comme pathogènes et/ou parasites (Bojko *et al.*, 2021). La production d'un ou plusieurs composés antimicrobiens par les bactéries ectosymbiotiques des branchies permettrait de réduire, voire d'empêcher, l'infection des crabes par ces micro-organismes, favorisant la dominance des ectosymbiotes. La production de composés antimicrobiens, et même de toxines, a été décrite dans les symbioses impliquant des insectes et des bactéries contre des parasites (Kaltenpoth & Engl, 2014). L'étude de Lopanik (2014) décrit plusieurs symbioses marines dans lesquelles les bactéries confèrent une protection biochimique contre des parasites ou des pathogènes de l'environnement, comme observé chez des bryozoaires, des isopodes et des anthozoaires.

La trigonelline, si elle est bien produite par le crabe, pourrait être aussi un moyen pour lui de contrôler la communauté symbiotique se développant sur ses branchies. La présence de symbiotes chez un hôte peut affecter la fitness de celui-ci lorsque le développement de la population bactérienne n'est pas contrôlée. Certains auteurs relatent une transmission dysfonctionnelle des symbiotes ou des anomalies chromosomiques (McGraw *et al.*, 2002). Ainsi l'hôte met en place des mécanismes pour contrôler la prolifération des symbiotes comme cela a été observé chez la punaise du haricot, *Riptortus pedestris* (Byeon *et al.*, 2015). Ces insectes phytophages produisent une protéase qui a un effet antibactérien, leur permettant ainsi de contrôler leur population bactérienne intestinale composée de bactéries du genre *Burkholderia* (Byeon *et al.*, 2015). Dans la relation symbiotique entre *R. exoculata* et ses bactéries, Le Bloa (2016) suggère qu'il existe un ensemble de gènes qui permettrait

l'attachement des symbiotes mais aussi le contrôle de ces derniers par l'hôte. Chez certaines bactéries, il existe un système appelé quorum sensing (permettant aux bactéries de détecter la taille de la population bactérienne) qui permet la communication entre bactéries. Ceci est possible grâce à la production de molécules auto-inductrices de type homoserinelactone (AHL) par une synthase appelée Lux I. Ces signaux sont captés grâce à un récepteur appelé Lux R chez les bactéries. Dans le cas de la crevette *R. exoculata*, les gènes Lux R et Lux S ont été retrouvés dans la communauté symbiotique du céphalothorax (Le Bloa, 2016). Les gènes Lux R seraient capables de capter des molécules produites par l'hôte et par des bactéries non symbiotiques et les gènes Lux S produiraient des signaux AI2 qui pourraient intervenir dans la régulation de la formation de biofilm par des pathogènes. En somme, l'hôte et la communauté symbiotique seraient capables de communiquer via le quorum sensing, ce qui permettrait à l'hôte d'avoir un contrôle strict sur l'établissement de la symbiose ainsi que sur le développement de la communauté (Le Bloa, 2016). Chez les crabes côtiers, les gènes impliqués dans le quorum sensing pourraient être présents dans la communauté symbiotique. La recherche de ces gènes et/ou des molécules auto-inductrices permettrait d'en savoir plus sur l'attachement des bactéries sur les branchies et notamment sur le contrôle possible de la population bactérienne par l'hôte à travers le quorum sensing comme évoqué pour la crevette *R. exoculata* (Le Bloa, 2016).

Une autre hypothèse proposée par Booth (2018) concernant ces interactions crabes-bactéries assez répandues, serait que la présence des bactéries permettrait une adaptation à la terrestrialisation (adaptation à la sortie de l'eau des crabes). Au cours de son étude, des caroténoïdes ont été détectés par spectrométrie de Raman uniquement dans les branchies de crabes colonisés par des bactéries symbiotiques suggérant ainsi que la production de caroténoïdes par les bactéries permettrait de lutter contre le stress oxydatif lié à la vie hors de l'eau et faciliterait donc l'adaptation des crabes au milieu terrestre.

Cette hypothèse est cohérente avec nos observations car sur les 14 espèces étudiées en Guadeloupe, 3 espèces de crabes uniquement marins ne présentaient pas d'interactions bactériennes au niveau des branchies. Cependant, trois autres espèces marines sont tout de même concernées. Dans l'étude de Booth (2018), seule une espèce marine avait été testée. Il faudrait réaliser le test Raman sur d'autres espèces marines afin de savoir si la présence de caroténoïdes est détectée. Dans tous les cas, la présence des bactéries sur les branchies de crabes marins ne peut être liée à la terrestrialisation. Même si ça pourrait être le cas pour les

crabes semi-marins et terrestres, il reste à comprendre la présence de ces bactéries ectosymbiotiques sur des crabes exclusivement marins, et nos travaux ne permettent pas en l'état de tester l'hypothèse d'un lien entre présence de symbiotes et terrestrialisation. En revanche, les symbiotes et les molécules à activité antimicrobienne retrouvés pourraient permettre aux crabes de faire face aux différentes agressions rencontrées dans les milieux dans lesquels ils évoluent. En effet, les études ont déjà prouvé à plusieurs reprises que les bactéries symbiotiques pouvaient avoir un rôle défensif (Clay, 2014) et conférer un avantage, ou plutôt une résistance, face à un stress thermique ou un stress lié à une agression par des pathogènes comme préalablement cités (Hector *et al.*, 2022).

4. Conclusions

La présence de bactéries ectosymbiotiques au niveau des branchies de crabes semble être répandue dans le monde mais reste peu étudiée à ce jour. Elle se caractérise par la colonisation d'une faune polymorphe et diversifiée à la surface des lamelles branchiales. Cette ectosymbiose, ou épibiose, concerne plusieurs espèces de crabes de mangrove, de forêt, de plages, ou encore de récifs coralliens. La colonisation des nouvelles générations de crabes est assurée par les formes libres des symbiotes probablement présentes dans le milieu naturel. La plupart de ces formes libres sont retrouvées dans les terriers du crabe violoniste *Minuca rapax*. Le mode de transmission environnemental a donc été prouvé pour les deux espèces de crabe chez lesquelles il a été testé (sur les 14 étudiées). Il est fort possible que le mode de transmission soit le même pour tous les brachyours concernés par ce type de symbiose bactérienne. L'analyse du métabolome des crabes a mis en lumière la présence de composés antimicrobiens et a permis l'ouverture de pistes de recherche sur l'origine de ces composés et sur la raison de leur présence dans les branchies, cependant cela ne permet pas encore de définir plus précisément le rôle la symbiose.

Perspectives de recherche

Pour approfondir la connaissance sur l'interaction crabes-bactéries, il faudrait déterminer le caractère obligatoire ou non de l'association pour les espèces concernées. A ce jour, aucun individu récolté parmi les espèces concernées (hors individus ayant fraîchement mués) n'a été

observé sans symbiotes sur les branchies. Dans un environnement contrôlé, les crabes pourraient recevoir un traitement antibiotique ou alors, on pourrait induire la mue afin d'observer les effets générés par la perte des symbiotes. Ils pourraient également être affamés pendant un laps de temps pour observer les effets sur la communauté symbiotique. De ce fait il se pourrait que la communauté symbiotique diminue en situation de stress comme c'est souvent observé dans les symbioses nutritionnelles.

Pour approfondir la caractérisation d'un point de vue ultrastructural, nous pourrions utiliser des sondes oligonucléotidiques spécifiques correspondants aux bactéries identifiées par métabarcoding afin d'associer les différents morphotypes bactériens observés sur les branchies aux espèces bactériennes détectées grâce à la technique FISH.

Le mode de transmission des bactéries pour les autres espèces de crabes concernées par ce type de symbiose pourrait être identifié de la même façon que pour les espèces *A. pisonii* et *M. rapax*. Nous pourrions également tester la transmission horizontale sur *A. pisonii* en maintenant en milieu stérile et contrôlé un individu qui vient de muer (dépourvue de symbiotes) et un individu symbiotique.

Ajouté à cela, déterminer précisément le stade d'infection des bactéries chez les juvéniles, permettrait de savoir si des changements ontogéniques sont induits chez les crabes lors du premier contact avec les formes libres des symbiotes. Pour ce faire, nous devons réussir à boucler le cycle de vie des crabes par la culture larvaire. Ceci a été testé pour les espèces *A. pisonii* et *M. rapax* dans cette étude, mais seuls les stades zoés 1, 2 et 3 ont été obtenus.

Maîtriser le cycle de vie nous permettrait aussi d'infecter les jeunes crabes d'une espèce avec la communauté bactérienne d'une autre espèce pour observer les effets de sélection de symbiotes ou les changements induits par la différence de communauté. Nous pourrions récupérer les symbiotes de l'espèce #1 (contenant les symbiotes cibles), à partir de broyat de branchies centrifugés pour trier les gros débris. Par la suite les bactéries récupérées seraientensemencées dans un milieu contenant l'espèce #2 dépourvue de symbiotes. Les résultats permettraient de confirmer une transmission environnementale entre les espèces testées et affirmer ou infirmer la spécificité d'association entre les hôtes et les bactéries. Ce protocole pourrait être mis en place pour plusieurs espèces de crabes.

Nous pourrions étendre l'étude aux crabes des autres îles de la Caraïbe afin de savoir si l'environnement peut faire varier la composition de la communauté symbiotiques ou si les communautés bactériennes restent inchangées en fonction de l'espèce de crabe étudiée.

Il serait important d'étudier les mêmes espèces de crabes issues de populations géographiquement éloignées, en particulier pour les écosystèmes de mangrove des zones tropicales et sub-tropicales qui présentent une organisation spécifique similaire.

D'un point de vue fonctionnel, il faudrait déterminer les bénéfices réels du symbiote et de l'hôte à travers des approches transcriptomiques et expérimentales (enrichissement en isotopes lourds du carbone et de l'azote) cela permettrait de clarifier la nature de l'interaction (symbiose mutualiste, "farming" ...) et identifier les réseaux trophiques.

Il reste à déterminer l'origine de la cycloserine, et de la trigonelline (composé antimicrobien), et à approfondir les analyses métabolomiques afin de mieux évaluer la nature des échanges entre les bactéries situées sur les branchies et les crabes hôtes.

D'un point de vue écologique nous pourrions également tester l'hypothèse de Booth concernant la terrestrialisation par spectroscopie RAMAN sur les crabes terrestres, marins et semi-marins de Guadeloupe pour la recherche et a caractérisation de caroténoïdes.

Dans les symbioses marines de milieux chimiosynthétiques, les invertébrés sont généralement associés à des bactéries chimiotrophes tirant avantages du milieu concerné. Ces partenaires symbiotiques étant soient des bactéries sulfo-oxydantes dans les milieux riches en sulfures soient des bactéries ferro-oxydantes dans les milieux riches en fer. Ces associations symbiotiques confèrent un avantage adaptatif important aux crustacés concernés leur permettant de coloniser des niches écologiques peu hospitalières pour tout animal dépourvu de symbiotes. Les travaux de cette thèse ont permis de mettre en lumière une nouvelle interaction symbiotique chez des crustacés de milieux côtiers marins et terrestres. Des communautés bactériennes spécifiques se développent sur les branchies des crabes quel que soit le biotope ou la zone géographique concerné. Comprendre cette association nous permettrait de comprendre les stratégies adaptatives mises en place par ces crabes brachyours côtiers et estimer l'impact évolutif de ce type de symbiose multispécifique pour le développement des crustacés en milieux côtiers.

Bibliographie

- Ahmed, M. Z., Breinholt, J. W. and Kawahara, A. Y.** (2016) Evidence for common horizontal transmission of *Wolbachia* among butterflies and moths. *BMC Evolutionary Biology* **16**, 118. doi:10.1186/s12862-016-0660-x.
- Aldridge, J. B., & Cameron, J. N.** (1979). CO₂ exchange in the blue crab, *Callinectes sapidus* (Rathbun). *Journal of Experimental Zoology*, *207*(2), 321-328.
- Alves, D. F. R., Hirose, G. L., Barros-Alves, S. de P. and Baeza, J. A.** (2017) The mating system of the symbiotic pea-crab *Dissodactylus crinitichelis* (Brachyura, Pinnotheridae): monogamy or promiscuity? *Marine Biology* **164**, 200. doi:10.1007/s00227-017-3234-6.
- Amir, A., McDonald, D., Navas-Molina, J. A., Kopylova, E., Morton, J. T., Xu, Z. Z., Kightley, E. P., Thompson, L. R., Hyde, E. R., Gonzalez, A. and Knight, R.** (2017) Deblur rapidly resolves single-nucleotide community sequence patterns. *mSystems* **2**,. doi:10.1128/mSystems.00191-16.
- Antunes, M., Zara, F. J., López Greco, L. S. and Negreiros-Fransozo, M. L.** (2018) Male reproductive system of the arrow crab *Stenorhynchus seticornis* (Inachoididae). *Invertebrate Biology* **137**, 171–184. doi:10.1111/ivb.12214.
- Anwar, S., Bhandari, U., Panda, B. P., Dubey, K., Khan, W. and Ahmad, S.** (2018) Trigonelline inhibits intestinal microbial metabolism of choline and its associated cardiovascular risk. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **159**, 100–112. doi:10.1016/j.jpba.2018.06.027.
- Apremont, V., Cambon-Bonavita, M.-A., Cueff-Gauchard, V., François, D., Pradillon, F., Corbari, L. and Zbinden, M.** (2018) Gill chamber and gut microbial communities of the hydrothermal shrimp *Rimicaris chacei* Williams and Rona 1986: A possible symbiosis. *PLOS ONE* **13**, e0206084. doi:10.1371/journal.pone.0206084.
- Aschenbroich, A., Michaud, E., Stieglitz, T., Fromard, F., Gardel, A., Tavares, M. and Thouzeau, G.** (2016) Brachyuran crab community structure and associated sediment reworking activities in pioneer and young mangroves of French Guiana, South America. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **182**, 60–71. doi:10.1016/j.ecss.2016.09.003.
- Aspey, W. P.** (1978) Fiddler crab behavioral ecology: Burrow density in *Uca Pugnax* (Smith) and *Uca Pugilator* (Bosc) (Decapoda Brachyura). *Crustaceana* **34**, 235–244. doi:10.1163/156854078X00790.
- Ávila, I. H.** (2016) Larval dispersal and life cycle in deep-water hydrothermal vents: the case of *Rimicaris exoculata* and related species. Earth Sciences. Université de Bretagne occidentale - Brest
- Baeza, J. A.** (2007) The origins of symbiosis as a lifestyle in marine crabs (genus *Petrolisthes*) from the eastern Pacific: Does interspecific competition play a role? *Revista de Biología Marina y Oceanografía*.
- Baeza, J.** (2015) Baeza, J.A. 2015. Crustaceans as symbionts: An overview of their diversity, host use and life styles. In: The life styles and feeding biology of the crustacea (L. Watling and M. Thiel, eds). Oxford University Press. Pp. 163-189., pp. 163-189.
- Batang, Z. B., & Suzuki, H.** (2003). Gill-cleaning mechanisms of the amphibious freshwater crab *Geothelphusa dehaani* (Decapoda, Brachyura, Potamidae). *Journal of Crustacean Biology*, *23*(1), 230-240.

- Baumann, P.** (2005) Biology bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology* **59**, 155–189. doi:10.1146/annurev.micro.59.030804.121041.
- Bayer, T., Aranda, M., Sunagawa, S., Yum, L. K., DeSalvo, M. K., Lindquist, E., Coffroth, M. A., Voolstra, C. R. and Medina, M.** (2012) Symbiodinium transcriptomes: Genome insights into the dinoflagellate symbionts of reef-building corals. *PLOS ONE* **7**, e35269. doi:10.1371/journal.pone.0035269.
- Bergin, C., Wentrup, C., Brewig, N., Blazejak, A., Erséus, C., Giere, O., Schmid, M., De Wit, P. and Dubilier, N.** (2018) Acquisition of a novel sulfur-oxidizing symbiont in the gutless marine worm *Inanidrilus exumae*. *Applied and Environmental Microbiology* **84**, e02267-17. doi:10.1128/AEM.02267-17.
- Becker, K., Hormchong, T., & Wahl, M.** (2000). Relevance of crustacean carapace wettability for fouling. In *Life at Interfaces and Under Extreme Conditions: Proceedings of the 33rd European Marine Biology Symposium, held at Wilhelmshaven, Germany, 7–11 September 1998* (pp. 193-201). Springer Netherlands.
- Béziat, N. S., Duperron, S., Halary, S., Azede, C. and Gros, O.** (2021) Bacterial ectosymbionts colonizing gills of two Caribbean mangrove crabs. *Symbiosis* **85**, 105–114. doi:10.1007/s13199-021-00801-4.
- Blow, F., Bueno, E., Clark, N., Zhu, D. T., Chung, S. H., Güllert, S., Schmitz, R. A. and Douglas, A. E.** (2020) B-vitamin nutrition in the pea aphid-*Buchnera* symbiosis. *Journal of Insect Physiology* **126**, 104092. doi:10.1016/j.jinsphys.2020.104092.
- Bojko, J., Burgess, A. L., Baker, A. G. and Orr, C. H.** (2021) Invasive Non-native crustacean symbionts: Diversity and impact. *Journal of Invertebrate Pathology* **186**, 107482. doi:10.1016/j.jip.2020.107482.
- Booth, J.** (2018) Ecology of the Mangrove Microbiome. KAUST Research Repository. <https://doi.org/10.25781/KAUST-3F85C>
- Booth, J. M., Fusi, M., Marasco, R., Mboho, T. and Daffonchio, D.** (2019) Fiddler crab bioturbation determines consistent changes in bacterial communities across contrasting environmental conditions. *Scientific Reports* **9**, 3749. doi:10.1038/s41598-019-40315-0.
- Bright, M. and Bulgheresi, S.** (2010) A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nature reviews. Microbiology* **8**, 218–230. doi:10.1038/nrmicro2262.
- Brissac, N.** (2009). Nature, Diversité et Spécificité de l'Association Lucinidae/Bactéries sulfuroxydantes (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie (Paris)).
- Brissac, T., Merçot, H., & Gros, O.** (2011). Lucinidae/sulfur-oxidizing bacteria: ancestral heritage or opportunistic association? Further insights from the Bohol Sea (the Philippines). *FEMS microbiology ecology*, **75**(1), 63-76.
- Britton, J. C., Kroh, G. C. and Golightly, C.** (1982) Biometric and ecological relationships in two sympatric caribbean Gecarcinidae (Crustacea: Decapoda). *Journal of Crustacean Biology* **2**, 207–222. doi:10.2307/1548000.
- Brinza, L., Viñuelas, J., Cottret, L., Calevro, F., Rahbé, Y., Febvay, G., ... & Charles, H.** (2009). Systemic analysis of the symbiotic function of *Buchnera aphidicola*, the primary endosymbiont of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Comptes rendus biologies*, **332**(11), 1034-1049

- Brooke, M. de L.** (1981) Size as a factor influencing the ownership of copulation burrows by the ghost crab (*Ocypode ceratophthalmus*). *Zeitschrift für Tierpsychologie* **55**, 63–78. doi:10.1111/j.1439-0310.1981.tb01259.x.
- Bulgheresi, S., Gruber-Vodicka, H. R., Heindl, N. R., Dirks, U., Kostadinova, M., Breiteneder, H. and Ott, J. A.** (2011) Sequence variability of the pattern recognition receptor Mermaid mediates specificity of marine nematode symbioses. *The ISME Journal* **5**, 986–998. doi:10.1038/ismej.2010.198.
- Burggren, W. W., Burggren, P. of B. W. W. and McMahan, B. R.** (1988) *Biology of the Land Crabs*. Cambridge University Press.
- Byeon, J. H., Seo, E. S., Lee, J. B., Lee, M. J., Kim, J. K., Yoo, J. W., Jung, Y. and Lee, B. L.** (2015) A specific cathepsin-L-like protease purified from an insect midgut shows antibacterial activity against gut symbiotic bacteria. *Developmental & Comparative Immunology* **53**, 79–84. doi:10.1016/j.dci.2015.06.003.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J. and Holmes, S. P.** (2017) Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME Journal* **11**, 2639–2643. doi:10.1038/ismej.2017.119.
- Capistrán-Barradas, A., Defeo, O. and Moreno-Casasola, P.** (2003) Density and population structure of the red land crab *Gecarcinus lateralis* in a tropical semi-deciduous forest in Veracruz, Mexico. *Interciencia* **28**, 323–327.
- Caro, A., Got, P., Bouvy, M., Troussellier, M. and Gros, O.** (2009) Effects of long-term starvation on a host bivalve (*Codakia orbicularis*, Lucinidae) and its symbiont population. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 3304–3313. doi:10.1128/AEM.02659-08.
- Cary, S. C.** (1994) Vertical transmission of a chemoautotrophic symbiont in the protobranch bivalve, *Solemya reidi*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3**, 121–130.
- Cary, S. C. and Giovannoni, S. J.** (1993) Transovarial inheritance of endosymbiotic bacteria in clams inhabiting deep-sea hydrothermal vents and cold seeps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 5695–5699. doi:10.1073/pnas.90.12.5695.
- Casanova, B., Brunet, M. and Segonzac, M.** (1993) L'impact d'une épibiose bactérienne sur la morphologie fonctionnelle de crevettes associées à l'hydrothermalisme médio-Atlantique. *Cahiers de Biologie Marine* **34**, 573–588.
- Castiglioni, D. D. and Negreiros-Fransozo, M. L.** (2005) Comparative population biology of *Uca rapax* (Smith, 1870) (Brachyura, Ocypodidae) from two subtropical mangrove habitats on the Brazilian coast. *Journal of Natural History* **1627**. doi:10.1080/00222930400014247.
- Castiglioni, D. da S. and Negreiros-Fransozo, M. L.** (2006) Physiologic sexual maturity of the fiddler crab *Uca rapax* (Smith, 1870) (Crustacea, Ocypodidae) from two mangroves in Ubatuba, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **49**, 239–248. doi:10.1590/S1516-89132006000300009.
- Castro, P.** (1971) The natantian shrimps (Crustacea, Decapoda) Associated with Invertebrates in Hawaii. **25**, 395–403.

- Castro, P.** (1988) Animal symbioses in coral reef communities: A review. *Symbiosis* **5**, 161–184.
- Cavanaugh, C. M., McKiness, Z. P., Newton, I. L. and Stewart, F. J.** (2006) Marine chemosynthetic symbioses. *The prokaryotes* **1**, 475–507.
- Chaston, J. and Goodrich-Blair, H.** (2010) Common trends in mutualism revealed by model associations between invertebrates and bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **34**, 41–58. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00193.x.
- Christy, J. H. and Salmon, M.** (1991) Comparative studies of reproductive behavior in mantis shrimps and fiddler crabs. *American Zoologist* **31**, 329–337. doi:10.1093/icb/31.2.329.
- Clay, K.** (2014) Defensive symbiosis: a microbial perspective. *Functional Ecology* **28**, 293–298. doi:10.1111/1365-2435.12258.
- Colin, P. I.** (1978) Caribbean reef invertebrates and plants.
- Colpo, K. D. and Negreiros-Fransozo, M. L.** (2011) Sediment particle selection during feeding by four species of *Uca* (Brachyura, Ocypodidae). *Crustaceana* **84**, 721–734.
- Colpo, K. D. and Negreiros-Fransozo, M. L.** (2013) Morphological diversity of setae on the second maxilliped of fiddler crabs (Decapoda: Ocypodidae) from the southwestern Atlantic coast. *Invertebrate Biology* **132**, 38–45.
- Conde, J. E. and Díaz, H.** (1989) The mangrove tree crab *Aratus pisonii* in a tropical estuarine coastal lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **28**, 639–650. doi:10.1016/0272-7714(89)90051-6.
- Corbari, L., Cambon-Bonavita, M.-A., Long, G. J., Grandjean, F., Zbinden, M., Gaill, F. and Compère, P.** (2008) Iron oxide deposits associated with the ectosymbiotic bacteria in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*. *Biogeosciences* **5**, 1295–1310. doi:https://doi.org/10.5194/bg-5-1295-2008.
- Cormier, A., Chebbi, M. A., Giraud, I., Wattier, R., Teixeira, M., Gilbert, C., Rigaud, T. and Cordaux, R.** (2021) Comparative genomics of strictly vertically transmitted, feminizing microsporidia endosymbionts of amphipod crustaceans. *Genome Biology and Evolution* **13**, evaa245. doi:10.1093/gbe/evaa245.
- Costa, T. and Soares-Gomes, A.** (2009) Population structure and reproductive biology of *Uca rapax* (Decapoda: Ocypodidae) in a tropical coastal lagoon, southeast Brazil. *Zoologia (Curitiba)* **26**, 647–657. doi:10.1590/S1984-46702009000400009.
- Costlow Jr, J. D. and Bookhout, C. G.** (1968) The effect of environmental factors on development of the land-grab, *Cardisoma guanhumi* Latreille. *American Zoologist* **8**, 399–410.
- Crane, J.** (1975) *Fiddler crabs of the world: Ocypodidae: genus Uca*. Princeton University Press.
- Cuesta, J., García-Guerrero, M., Hendrickx, M. and Rodríguez, A.** (2006) Larval morphology of the sesamid crab, *Aratus pisonii* (H. Milne Edwards, 1837) (Decapoda, Brachyura, Grapsoidea) from laboratory-reared material. *Crustaceana* **79**, 175–196. doi:10.1163/156854006776952838.
- Dahan, R. A., Duncan, R. P., Wilson, A. C. and Dávalos, L. M.** (2015) Amino acid transporter expansions associated with the evolution of obligate endosymbiosis in sap-feeding insects (Hemiptera: sternostryncha). *BMC Evolutionary Biology* **15**, 52. doi:10.1186/s12862-015-0315-3.

- Dalabona, G., Silva, J. de L. e and Pinheiro, M. A. A.** (2005) Size at morphological maturity of *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Brachyura, Ocypodidae) in the Laranjeiras Bay, Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **48**, 139–145. doi:10.1590/S1516-89132005000100018.
- Davie, P. J. F., Guinot, D. and Ng, P. K. L.** (2015) *Anatomy and functional morphology of Brachyura*. Brill doi:10.1163/9789004190832_004.
- de Bruyn, C., Rigaud, T., David, B. and de Ridder, C.** (2009) Symbiosis between the pea crab *Dissodactylus primitivus* and its echinoid host *Meoma ventricosa*: potential consequences for the crab mating system. *Marine Ecology Progress Series* **375**, 173–183. doi:10.3354/meps07733.
- Dedeine, F., Vavre, F., Fleury, F., Loppin, B., Hochberg, M. E. and Boulétreau, M.** (2001) Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 6247–6252. doi:10.1073/pnas.101304298.
- Diaz, H. and Conde, J. E.** (1988) On the food sources for the mangrove tree crab *Aratus pisonii* (Brachyura: Grapsidae). *Biotropica* **20**, 348–350. doi:10.2307/2388331.
- Díaz, H. and Conde, J. E.** (1989) Population dynamics and life history of the mangrove crab *Aratus Pisonii* (Brachyura, Grapsidae) in a marine environment. *Bulletin of Marine Science* **45**, 148–163.
- Diaz, H. and Costlow, J. D.** (1972) Larval development of *Ocypode quadrata* (Brachyura: Crustacea) under laboratory conditions. *Marine Biology* **15**, 120–131. doi:10.1007/BF00353640.
- Dickson J. S., Dillaman R. M., Roer R. D., Roye D. B.** (1991) Distribution and characterization of ion transporting and respiratory filaments in the gills of *Procambarus clarkii*. *Biol Bull* **180**:154–166
- Diele, K., Koch, V. and Saint-Paul, U.** (2005) Population structure, catch composition and CPUE of the artisanally harvested mangrove crab *Ucides cordatus* (Ocypodidae) in the Caeté estuary, North Brazil: Indications for overfishing? *Aquatic Living Resources* **18**, 169–178. doi:10.1051/alr:2005018.
- Distel, D. L.** (1998) Evolution of chemoautotrophic endosymbioses in bivalves. *BioScience* **48**, 277–286. doi:10.2307/1313354.
- Drach, P.** 1930. Etude sur le systeme branchial des Crustaces décapodes. *Archives d'Anatomie Microscopique* **26**: 83-133.
- Dufour, S. C.** (2005). Gill anatomy and the evolution of symbiosis in the bivalve family Thyasiridae. *The Biological Bulletin*, **208**(3), 200-212.
- Douglas, A. E.** (2018) Good *Daphnia* parents do not control the offspring microbiome. *Journal of Animal Ecology* **87**, 320–322. doi:10.1111/1365-2656.12796.
- Dubilier, N., Bergin, C. and Lott, C.** (2008) Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nature Reviews. Microbiology* **6**, 725–740. doi:10.1038/nrmicro1992.
- Duperron, S., Gaudron, S. M., Rodrigues, C. F., Cunha, M. R., Decker, C. and Olu, K.** (2013) An overview of chemosynthetic symbioses in bivalves from the North Atlantic and Mediterranean Sea. *Biogeosciences* **10**, 3241–3267. doi:10.5194/bg-10-3241-2013.
- Duperron, S., Halary, S., Habiballah, M., Gallet, A., Huet, H., Duval, C., Bernard, C. and Marie, B.** (2019) Response of fish gut microbiota to toxin-containing cyanobacterial Extracts: A microcosm study on the

- Medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Science & Technology Letters* **6**, 341–347. doi:10.1021/acs.estlett.9b00297.
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C. and Knight, R.** (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**, 2194–2200. doi:10.1093/bioinformatics/btr381.
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M. and Böttger, E. C.** (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* **17**, 7843–7853. doi:10.1093/nar/17.19.7843.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Peplies, J., Glöckner, F. O., Gerdts, G. and Amann, R.** (2001) Isolation of novel pelagic bacteria from the German Bight and their seasonal contributions to surface picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 5134–5142. doi:10.1128/AEM.67.11.5134-5142.2001.
- Elliott, G. N., Chou, J.-H., Chen, W.-M., Bloembergen, G. V., Bontemps, C., Martínez-Romero, E., Velázquez, E., Young, J. P. W., Sprent, J. I. and James, E. K.** (2009) *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. *Environmental Microbiology* **11**, 762–778. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01799.x.
- Farrelly, C. A., & Greenaway, P.** (1993). Land crabs with smooth lungs: Grapsidae, Gecarcinidae, and Sundathelphusidae ultrastructure and vasculature. *Journal of Morphology*, **215**(3), 245-260.
- Fernandez-Leborans, G.** (2010). Epibiosis in Crustacea: an overview. *Crustaceana*, 549-640.
- Fisher, R. M., Henry, L. M., Cornwallis, C. K., Kiers, E. T. and West, S. A.** (2017) The evolution of host-symbiont dependence. *Nature Communications* **8**, 15973. doi:10.1038/ncomms15973.
- Forbes, M. R. L.** (1993) Parasitism and host reproductive Effort. *Oikos* **67**, 444–450. doi:10.2307/3545356.
- Freire, C. A., Onken, H. and McNamara, J. C.** (2008) A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* **151**, 272–304. doi:10.1016/j.cbpa.2007.05.008.
- Freitas, F., Pescinelli, R. A., Costa, R. C., Hilesheim, J. C., L. Dieh, F. and Branco, J. O.** (2021) Brachyuran crab diversity across spatial and temporal scales in a mangrove ecosystem from the western Atlantic. *Regional Studies in Marine Science* **43**, 101703. doi:10.1016/j.rsma.2021.101703.
- Frenkiel, L. and Mouëza, M.** (1995) Gill ultrastructure and symbiotic bacteria in *Codakia orbicularis* (Bivalvia, Lucinidae). *Zoomorphology* **115**, 51–61. doi:10.1007/BF00397934.
- Garcia, J. R. and Gerardo, N. M.** (2014) The symbiont side of symbiosis: do microbes really benefit? *Frontiers in Microbiology* **5**,.
- Gebruk, A. V., Pimenov, N. V., & Savvichev, A. S.** (1993). Feeding specialization of bresiliid shrimps in the TAG site hydrothermal community. *Marine Ecology Progress Series*, 247-253.
- Gifford, C. A.** (1962) Some observations on the general biology of the land crab, *Cardisoma guanhumi* (latreille), in south florida. *The Biological Bulletin* **123**, 207–223. doi:10.2307/1539516.
- Gilles, R., & Péqueux, A.** (1986). Physiological and ultrastructural studies of NaCl transport in crustaceans gills. *Italian Journal of Zoology*, **53**(2), 173-182.

- Gloter, A., Zbinden, M., Guyot, F., Gaill, F., & Colliex, C.** (2003, December). Formation and stabilization of mixed valence ferrihydrite on bacterial surfaces from hydrothermal vents. In *AGU Fall Meeting Abstracts* (Vol. 2003, pp. B12C-0802).
- Goffredi, S. K., Waren, A., Orphan, V. J., Van Dover, C. L. and Vrijenhoek, R. C.** (2004) Novel forms of structural integration between microbes and a hydrothermal vent gastropod from the Indian Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 3082–3090. doi:10.1128/AEM.70.5.3082-3090.2004.
- Goffredi, S. K., Jones, W. J., Erlich, H., Springer, A. and Vrijenhoek, R. C.** (2008) Epibiotic bacteria associated with the recently discovered Yeti crab, *Kiwa hirsuta*. *Environmental Microbiology* **10**, 2623–2634. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01684.x.
- Goffredi, S. K., Gregory, A., Jones, W. J., Morella, N. M. and Sakamoto, R. I.** (2014) Ontogenetic variation in epibiont community structure in the deep-sea yeti crab, *Kiwa puravida*: convergence among crustaceans. *Molecular Ecology* **23**, 1457–1472. doi:10.1111/mec.12439.
- Goodfellow, M. and O'Donnell, A. G.** (1993) *Handbook of new bacterial systematics*. Academic Press.
- Gourdine, J.-P. and Smith-Ravin, E. J.** (2007) Analysis of a cDNA-derived sequence of a novel mannose-binding lectin, codakine, from the tropical clam *Codakia orbicularis*. *Fish & Shellfish Immunology* **22**, 498–509. doi:10.1016/j.fsi.2006.06.013.
- Gros, O. and Gaill, F.** (2007) Extracellular bacterial association in gills of 'wood mussels'. *Cahiers de Biologie Marine* **48**, 103.
- Gros, O., Darrasse, A., Durand, P., Frenkiel, L. and Mouëza, M.** (1996) Environmental transmission of a sulfur-oxidizing bacterial gill endosymbiont in the tropical lucinid bivalve *Codakia orbicularis*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2324–2330. doi:10.1128/aem.62.7.2324-2330.1996.
- Gros, O., Frenkiel, L. and Mouëza, M.** (1997) Embryonic, larval, and post-larval development in the symbiotic clam *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). *Invertebrate Biology* **116**, 86–101. doi:10.2307/3226973.
- Gros, O., Frenkiel, L. and Mouëza, M.** (1998a) Gill filament differentiation and experimental colonization by symbiotic bacteria in aposymbiotic juveniles of *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). *Invertebrate reproduction & development* **34**, 219–231.
- Gros, O., De Wulf-Durand, P., Frenkiel, L. and Mouëza, M.** (1998b) Putative environmental transmission of sulfur-oxidizing bacterial symbionts in tropical lucinid bivalves inhabiting various environments. *FEMS Microbiology Letters* **160**, 257–262. doi:10.1111/j.1574-6968.1998.tb12920.x.
- Gros, O., Liberge, M., Heddi, A., Khatchadourian, C. and Felbeck, H.** (2003) Detection of the free-living forms of sulfide-oxidizing gill endosymbionts in the Lucinid Habitat (*Thalassia testudinum* Environment). *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 6264–6267. doi:10.1128/AEM.69.10.6264-6267.2003.
- Gros, O., Guibert, J. and Gaill, F.** (2007) Gill-symbiosis in Mytilidae associated with wood fall environments. *Zoomorphology* **126**, 163–172. doi:10.1007/s00435-007-0035-3.
- Groussin, M., Mazel, F. and Alm, E. J.** (2020) Co-evolution and co-speciation of host-gut bacteria systems. *Cell Host & Microbe* **28**, 12–22. doi:10.1016/j.chom.2020.06.013.

- Guimarães, F. J. and Negreiros-Fransozo, M. L.** (2002) Sexual maturity of *Eurytium Limosum* (Say, 1818) from a subtropical mangrove in Brazil, pp. 157–161 in Escobar-Briones, E. and Alvarez, F. (Eds.) *Modern Approaches to the Study of Crustacea*. Boston, MA, Springer US doi:10.1007/978-1-4615-0761-1_25.
- Guri, M., Durand, L., Cueff-Gauchard, V., Zbinden, M., Crassous, P., Shillito, B. and Cambon-Bonavita, M.-A.** (2012) Acquisition of epibiotic bacteria along the life cycle of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *The ISME Journal* **6**, 597–609. doi:10.1038/ismej.2011.133.
- Haley, S. R.** (1972) Reproductive cycling in the ghost crab, *Ocypode Quadrata* (Fabr.) (Brachyura, Ocypodidae). *Crustaceana* **23**, 1–11. doi:10.1163/156854072X00011.
- Hall, M. and Beiko, R. G.** (2018) 16S rRNA gene analysis with QIIME2. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **1849**, 113–129. doi:10.1007/978-1-4939-8728-3_8.
- Hartnoll, R. G.** (1965) Notes on the marine grapsid crabs of Jamaica. *Proceedings Linnean Society London* **176**, 113–147. doi:10.1111/j.1095-8312.1965.tb00940.x.
- Hartnoll, Richard G., Baine, Mark S. P., Grandas, Yolima, James, Jennifer and Atkin, H.** (2006) Population biology of the black land crab, *Gecarcinus Ruricola*, in the San Andres Archipelago, Western Caribbean. *Journal of Crustacean Biology* **26**, 316–325. doi:10.1651/C-2640.1.
- Hayes, F. E., Joseph, V. L., Gurley, H. S. and Wong, B. Y. Y.** (1998) Selection by two decapod crabs (*Percnon gibbesi* and *Stenorhynchus seticornis*) associating with an Urchin (*Diadema antillarum*) at Tobago, West Indies. *Bulletin of Marine Science* **63**, 241–247.
- Hector, T. E., Hoang, K. L., Li, J. and King, K. C.** (2022) Symbiosis and host responses to heating. *Trends in Ecology & Evolution* **37**, 611–624. doi:10.1016/j.tree.2022.03.011.
- Henry, R., Lucu, C., Onken, H. and Weihrauch, D.** (2012) Multiple functions of the crustacean gill: Osmotic/ionic regulation, acid-Base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Frontiers in physiology* **3**, 431. doi:10.3389/fphys.2012.00431.
- Hentschel, U., Berger, E. C., Bright, M., Felbeck, H. and Ott, J. A.** (1999) Metabolism of nitrogen and sulfur in ectosymbiotic bacteria of marine nematodes (Nematoda, Stilbonematinae). *Marine Ecology Progress Series* **183**, 149–158. doi:10.3354/meps183149.
- Herreid, C. F.** (1963) Observations on the feeding behavior of *Cardisoma Guanhumii* (Latreille) in Southern Florida1). *Crustaceana* **5**, 176–180. doi:10.1163/156854063X00093.
- Herreid, C. F. and Gifford, C. A.** (1963) The burrow habitat of the land crab, *Cardisoma guanhumii* (Latreille). *Ecology* **44**, 773–775. doi:10.2307/1933027.
- Herrnkind, W. F.** (1968) The breeding of *Uca pugilator* (Bosc) and mass rearing of the larvae with comments on the behavior of the larval and early crab stages (Brachyura, Ocypodidae). *Crustaceana. Supplement* **214–224**.
- Hirose, G. L., Souza, L. S., Silva, S. L. R., Alves, D. F. R. and Negreiros-Fransozo, M. L.** (2015) Population structure of the red mangrove crab, *Goniopsis cruentata* (Decapoda: Grapsidae) under different fishery impacts: Implications for resource management. *Revista de Biología Tropical* **63**, 443–457.

- Hobbs, H. H. and Lodge, D. M.** (2010) Chapter 22 - Decapoda, pp. 901–967 in Thorp, J. H. and Covich, A. P. (Eds.) *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates (Third Edition)*. San Diego, Academic Press doi:10.1016/B978-0-12-374855-3.00022-4.
- Hoang, K. L., Choi, H., Gerardo, N. M., & Morran, L. T.** (2022). Coevolution's conflicting role in the establishment of beneficial associations. *Evolution*.
- Hong, S.** (1988) Development of epipods and gills in some pagurids and brachyurans. *Journal of Natural History* **22**, 1005–1040. doi:10.1080/00222938800770641.
- Hoyoux, C., Zbinden, M., Samadi, S., Gaill, F., & Compère, P.** (2009). Wood-based diet and gut microflora of a galatheid crab associated with Pacific deep-sea wood falls. *Marine Biology*, **156**, 2421-2439.
- Husnik, F. and McCutcheon, J.** (2016) Repeated replacement of an intrabacterial symbiont in the tripartite nested mealybug symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**,. doi:10.1073/pnas.1603910113.
- Husnik, F., Nikoh, N., Koga, R., Ross, L., Duncan, R. P., Fujie, M., Tanaka, M., Satoh, N., Bachtrog, D., Wilson, A. C. C., von Dohlen, C. D., Fukatsu, T. and McCutcheon, J. P.** (2013) Horizontal gene transfer from diverse bacteria to an insect genome enables a tripartite nested mealybug symbiosis. *Cell* **153**, 1567–1578. doi:10.1016/j.cell.2013.05.040.
- Icely, J. D. and Jones, D. A.** (1978) Factors affecting the distribution of the genus *Uca* (Crustacea: Ocypodidae) on an East African shore. *Estuarine and Coastal Marine Science* **6**, 315–325. doi:10.1016/0302-3524(78)90019-1.
- Itoh, H., Aita, M., Nagayama, A., Meng, X.-Y., Kamagata, Y., Navarro, R., Hori, T., Ohgiya, S. and Kikuchi, Y.** (2014) Evidence of environmental and vertical transmission of Burkholderia symbionts in the Oriental Chinch bug, *Cavelerius saccharivorus* (Heteroptera: Blissidae). *Applied and Environmental Microbiology* **80**, 5974–5983. doi:10.1128/AEM.01087-14.
- Jobard, E., Trédan, O., Elena, B., Blaise, B. J. and Bachelot, T.** (2010) La métabolomique: un nouvel outil pour la recherche translationnelle en cancérologie. *Oncologie* **12**, 409–415. doi:10.1007/s10269-010-1913-8.
- Kaltenpoth, M. and Engl, T.** (2014) Defensive microbial symbionts in Hymenoptera. *Functional Ecology* **28**, 315–327. doi:10.1111/1365-2435.12089.
- Kiers, E. T. and West, S. A.** (2015) Evolving new organisms via symbiosis. *Science* **348**, 392–394. doi:10.1126/science.aaa9605.
- Klose, J., Polz, M. F., Wagner, M., P.Schimak, M., Gollner, S. and Bright, M.** (2015) Endosymbionts escape dead hydrothermal vent tubeworms to enrich the free-living population. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 11300–11305. doi:10.1073/pnas.1501160112.
- Koehler, S., Doubský, J. and Kaltenpoth, M.** (2013) Dynamics of symbiont-mediated antibiotic production reveal efficient long-term protection for beewolf offspring. *Frontiers in Zoology* **10**, 3. doi:10.1186/1742-9994-10-3.
- Koga, R., Tsuchida, T. and Fukatsu, T.** (2003) Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont Buchnera in an aphid.

- Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **270**, 2543–2550. doi:10.1098/rspb.2003.2537.
- Krebs, C.** (2009) *Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance*. 6th edition. Place of publication not identified, Pearson.
- Kristensen, E.** (2008) Mangrove crabs as ecosystem engineers; with emphasis on sediment processes. *Journal of Sea Research* **59**, 30–43. doi:10.1016/j.seares.2007.05.004.
- Krueger, D. M., Gustafson, R. G. and Cavanaugh, C. M.** (1996) Vertical transmission of chemoautotrophic symbionts in the bivalve *Solemya velum* (Bivalvia: Protobranchia). *The Biological Bulletin* **190**, 195–202. doi:10.2307/1542539.
- Laloy, L.** (1906). *Parasitisme et mutualisme dans la nature* (Vol. 57). Félix Alcan, éditeur.
- Laming, S. R., Gaudron, S. M. and Duperron, S.** (2018) Lifecycle ecology of deep-sea chemosymbiotic mussels: A Review. *Frontiers in Marine Science* **5**.
- Lampert, K.P.** (2016). *Cassiopea* and Its Zooxanthellae. In: Goffredo, S., Dubinsky, Z. (eds) *The Cnidaria, Past, Present and Future*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31305-4_26
- Le Bloa, S.** (2016) Mode de reconnaissance hôte symbiote en milieux extrêmes : cas du modèle symbiotique *Rimicaris exoculata*. Doctoral dissertation, Brest) <https://www.theses.fr/2016BRES0119>.
- Lechaire, J.-P., Frébourg, G., Gaill, F. and Gros, O.** (2008) In situ characterization of sulphur in gill-endosymbionts of the shallow water lucinid *Codakia orbicularis* (Linné, 1758) by high-pressure cryofixation and EFTEM microanalysis. *Marine Biology* **154**, 693–700. doi:10.1007/s00227-008-0962-7.
- Lindquist, N., Barber, P. H., & Weisz, J. B.** (2005). Episymbiotic microbes as food and defence for marine isopods: unique symbioses in a hostile environment. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1569), 1209-1216.
- Lindquist, E. S., Krauss, K. W., Green, P. T., O'Dowd, D. J., Sherman, P. M. and Smith III, T. J.** (2009) Land crabs as key drivers in tropical coastal forest recruitment. *Biological Reviews* **84**, 203–223. doi:10.1111/j.1469-185X.2008.00070.x.
- Lopanik, N. B.** (2014) Chemical defensive symbioses in the marine environment. *Functional Ecology* **28**, 328–340. doi:10.1111/1365-2435.12160.
- Louca, S., Polz, M. F., Mazel, F., Albright, M. B. N., Huber, J. A., O'Connor, M. I., Ackermann, M., Hahn, A. S., Srivastava, D. S., Crowe, S. A., Doebeli, M. and Parfrey, L. W.** (2018) Function and functional redundancy in microbial systems. *Nature Ecology & Evolution* **2**, 936–943. doi:10.1038/s41559-018-0519-1.
- Lutz, P. L. and Austin, C. B.** (1983) Land crabs: a new resource potential. <http://aquaticcommons.org/id/eprint/14037>.
- Ma, R., Wang, Y., Zhao, S., Ma, Q., Yin, M., Li, X. and Fang, W.** (2021) Bacterial flora in the gill tissues and intestinal tracts of male and female chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) with different diets in a mud pond. *Current Microbiology* **78**, 2291–2297. doi:10.1007/s00284-021-02487-9.

- Marchant, H. K., Ahmerkamp, S., Lavik, G., Tegetmeyer, H. E., Graf, J., Klatt, J. M., Holtappels, M., Walpersdorf, E. and Kuypers, M. M. M.** (2017) Denitrifying community in coastal sediments performs aerobic and anaerobic respiration simultaneously. *The ISME Journal* **11**, 1799–1812. doi:10.1038/ismej.2017.51.
- Martin, B. and Schwab, E.** (2012) Symbiosis: ‘Living together’ in Chaos. *Studies in history of biology* **4**, 7–25.
- Mccann, J., Stabb, E., Millikan, D. and Ruby, E.** (2003) Population dynamics of *Vibrio fischeri* during Infection of *Euprymna scolopes*. *Applied and environmental microbiology* **69**, 5928–34. doi:10.1128/AEM.69.10.5928-5934.2003.
- McFall-Ngai, M. J.** (1994) Animal-bacterial interactions in the early life history of marine invertebrates: the *Euprymna scolopes/Vibrio fischeri* symbiosis. *American Zoologist* **34**, 554–561.
- McFall-Ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C. G., Carey, H. V., Domazet-Lošo, T., Douglas, A. E., Dubilier, N., Eberl, G., Fukami, T., Gilbert, S. F., Hentschel, U., King, N., Kjelleberg, S., Knoll, A. H., Kremer, N., Mazmanian, S. K., Metcalf, J. L., Nealson, K., Pierce, N. E., Rawls, J. F., Reid, A., Ruby, E. G., Rumpho, M., Sanders, J. G., Tautz, D. and Wernegreen, J. J.** (2013) Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 3229–3236. doi:10.1073/pnas.1218525110.
- McGraw, E. A., Merritt, D. J., Droller, J. N. and O’Neill, S. L.** (2002) Wolbachia density and virulence attenuation after transfer into a novel host. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 2918–2923. doi:10.1073/pnas.052466499.
- McLean, A. H. C. and Godfray, H. C. J.** (2015) Evidence for specificity in symbiont-conferred protection against parasitoids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **282**, 20150977. doi:10.1098/rspb.2015.0977.
- Melo, G. de** (1996) Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro.
- Methou, P., Hernández-Ávila, I., Aube, J., Cueff-Gauchard, V., Gayet, N., Amand, L., Shillito, B., Pradillon, F. and Cambon-Bonavita, M.-A.** (2019) Is It first the egg or the shrimp? – diversity and variation in microbial communities colonizing broods of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* during embryonic development. *Frontiers in Microbiology* **10**,. doi:10.3389/fmicb.2019.00808.
- Methou, P., Hikosaka, M., Chen, C., Watanabe, H. K., Miyamoto, N., Makita, H., 9547-8351, Takahashi, Y. and Jenkins, R. G.** (2022) Symbiont Community Composition in *Rimicaris kairei* Shrimps from Indian Ocean Vents with Notes on Mineralogy. *Applied and Environmental Microbiology* **88**, e00185-22. doi:10.1128/aem.00185-22.
- Middlemiss, K. L., Urbina, M. A. and Wilson, R. W.** (2015) Microbial proliferation on gill structures of juvenile European lobster (*Homarus gammarus*) during a moult cycle. *Helgoland Marine Research* **69**, 401–410. doi:10.1007/s10152-015-0445-4.
- Mira, A. and Moran, N. A.** (2002) Estimating population size and transmission bottlenecks in maternally transmitted endosymbiotic bacteria. *Microbial Ecology* **44**, 137–143. doi:10.1007/s00248-002-0012-9.
- Moran, N. A. and Bennett, G. M.** (2014) The tiniest tiny genomes. *Annual Review of Microbiology* **68**, 195–215. doi:10.1146/annurev-micro-091213-112901.

- Moran, N. A. and Dunbar, H. E.** (2006) Sexual acquisition of beneficial symbionts in aphids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 12803–12806. doi:10.1073/pnas.0605772103.
- Muscantine, L., & Porter, J. W.** (1977). Reef corals: mutualistic symbioses adapted to nutrient-poor environments. *Bioscience*, *27*(7), 454-460.
- Muscantine, L., Falkowski, P. G., Porter, J. W., Dubinsky, Z. and Smith, D. C.** (1984) Fate of photosynthetic fixed carbon in light- and shade-adapted colonies of the symbiotic coral *Stylophora pistillata*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* **222**, 181–202. doi:10.1098/rspb.1984.0058.
- Mushegian, A. A., Walser, J.-C., Sullam, K. E. and Ebert, D.** (2018) The microbiota of diapause: How host–microbe associations are formed after dormancy in an aquatic crustacean. *Journal of Animal Ecology* **87**, 400–413. doi:10.1111/1365-2656.12709.
- Nagelkerken, I., Blaber, S. J. M., Bouillon, S., Green, P., Haywood, M., Kirton, L. G., Meynecke, J.-O., Pawlik, J., Penrose, H. M., Sasekumar, A. and Somerfield, P. J.** (2008) The habitat function of mangroves for terrestrial and marine fauna: A review. *Aquatic Botany* **89**, 155–185. doi:10.1016/j.aquabot.2007.12.007.
- Nakabachi, A., Ueoka, R., Oshima, K., Teta, R., Mangoni, A., Gurgui, M., Oldham, N. J., van Echten-Deckert, G., Okamura, K., Yamamoto, K., Inoue, H., Ohkuma, M., Hongoh, Y., Miyagishima, S., Hattori, M., Piel, J. and Fukatsu, T.** (2013) Defensive bacteriome symbiont with a drastically reduced genome. *Current Biology* **23**, 1478–1484. doi:10.1016/j.cub.2013.06.027.
- Näsval, J., Sun, L., Roth, J. and Andersson, D.** (2012) Real-time evolution of new genes by innovation, amplification, and divergence. *Science (New York, N.Y.)* **338**, 384–7. doi:10.1126/science.1226521.
- Negreiros-Fransozo, M. L., Fransozo, A. and Bertini, G.** (2002) Reproductive cycle and recruitment period of *Ocyroide Quadrata* (Decapoda, Ocyropodidae) at a sandy beach in Southeastern Brazil. *Journal of Crustacean Biology* **22**, 157–161. doi:10.1163/20021975-99990218.
- Negreiros-Fransozo, M. L., Hirose, G. L., Fransozo, A. and Bolla, E. A., Jr** (2009) First zoeal stage and megalopa of *Uca* (*Uca*) *Maracoani* (Decapoda: Brachyura), with comments on the larval morphology of South-American species of Ocyropodidae. *Journal of Crustacean Biology* **29**, 364–372. doi:10.1651/08-3087.1.
- Ngo-Massou, V. M., Din, N., Kenne, M. and Dongmo, A. B.** (2018) Brachyuran crab diversity and abundance patterns in the mangroves of Cameroon. *Regional Studies in Marine Science* **24**, 324–335. doi:10.1016/j.rsma.2018.09.010.
- Nikoh, N., McCutcheon, J. P., Kudo, T., Miyagishima, S., Moran, N. A. and Nakabachi, A.** (2010) Bacterial genes in the aphid genome: Absence of functional gene transfer from Buchnera to its host. *PLOS Genetics* **6**, e1000827. doi:10.1371/journal.pgen.1000827.
- Nordhaus, I. and Wolff, M.** (2007) Feeding ecology of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Ocyropodidae): food choice, food quality and assimilation efficiency. *Marine Biology* **151**, 1665–1681. doi:10.1007/s00227-006-0597-5.
- Nordhaus, I., Diele, K. and Wolff, M.** (2009) Activity patterns, feeding and burrowing behaviour of the crab *Ucides cordatus* (Ucididae) in a high intertidal mangrove forest in North Brazil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **374**, 104–112. doi:10.1016/j.jembe.2009.04.002.

- Noyer, C., Casamayor, E. O. and Becerro, M. A.** (2014) Environmental heterogeneity and microbial inheritance influence sponge-associated bacterial composition of *Spongia lamella*. *Microbial Ecology* **68**, 611–620. doi:10.1007/s00248-014-0428-z.
- Nussbaumer, A. D., Fisher, C. R. and Bright, M.** (2006) Horizontal endosymbiont transmission in hydrothermal vent tubeworms. *Nature* **441**, 345–348. doi:10.1038/nature04793.
- Nye, V., Copley, J. and Plouviez, S.** (2012) A new species of *Rimicaris* (Crustacea: Decapoda: Caridea: Alvinocarididae) from hydrothermal vent fields on the Mid-cayman spreading centre, Caribbean. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*. doi:10.1017/S0025315411002001.
- Nyholm, S. V. and McFall-Ngai, M.** (2004) The winnowing: establishing the squid– vibrio symbiosis. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 632–642. doi:10.1038/nrmicro957.
- Nyholm, S. V. and McFall-Ngai, M. J.** (2021) A lasting symbiosis: how the Hawaiian bobtail squid finds and keeps its bioluminescent bacterial partner. *Nature Reviews Microbiology* **19**, 666–679. doi:10.1038/s41579-021-00567-y.
- Nyholm, S. V., Stabb, E. V., Ruby, E. G. and McFall-Ngai, M. J.** (2000) Establishment of an animal-bacterial association: recruiting symbiotic vibrios from the environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 10231–10235. doi:10.1073/pnas.97.18.10231.
- Oliver, K. M., Moran, N. A. and Hunter, M. S.** (2006) Costs and benefits of a superinfection of facultative symbionts in aphids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **273**, 1273–1280. doi:10.1098/rspb.2005.3436.
- Ott, J. A.** (1997) A new symbiotic marine nematode, *Adelphos rolandi* gen.n. sp.n. (Stilbonematinae), from the Caribbean Sea. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien. Serie B für Botanik und Zoologie* **99**, 417–422.
- Ott, J. A., Novak, R., Schiemer, F., Hentschel, U., Nebelsick, M. and Polz, M.** (1991) Tackling the sulfide gradient: A novel strategy involving marine nematodes and chemoautotrophic ectosymbionts. *Marine Ecology* **12**, 261–279. doi:10.1111/j.1439-0485.1991.tb00258.x.
- Ott, J., Bright, M. and Bulgheresi, S.** (2004) Marine microbial thiotrophic ectosymbioses. *Oceanography and Marine Biology* **42**, 95–118.
- Pais, R., Lohs, C., Wu, Y., Wang, J. and Aksoy, S.** (2008) The obligate mutualist *Wigglesworthia glossinidia* influences reproduction, digestion, and immunity processes of its host, the tsetse fly. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 5965–5974. doi:10.1128/AEM.00741-08.
- Parada, A. E., Needham, D. M. and Fuhrman, J. A.** (2016) Every base matters: Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology* **18**, 1403–1414. doi:10.1111/1462-2920.13023.
- Peek, A. S., Feldman, R. A., Lutz, R. A. and Vrijenhoek, R. C.** (1998) Cospeciation of chemoautotrophic bacteria and deep sea clams. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 9962–9966. doi:10.1073/pnas.95.17.9962.
- Pereira, M., Joaquim, B., Christoffersen, M., Junior, F., Fracasso, H. and Pinheiro, T.** (2009) Population biology of *Callinectes danae* and *Callinectes sapidus* (Crustacea: Brachyura: Portunidae) in the south-western

- Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **89**, 1341–1351. doi:10.1017/S0025315409000605.
- Perru, O.** (2006) Aux origines des recherches sur la symbiose vers 1868-1883. *Revue d'histoire des sciences Tome* **59**, 5–27.
- Perru, O. & Poireau, B.** (2016). Le commensalisme et la complexité dans l'histoire des relations interspécifiques en Ecologie, Conference: 5e journées Epistémologie de l'UM, Regards sur la complexité Montpellier
- Petersen, J. M., Ramette, A., Lott, C., Cambon-Bonavita, M.-A., Zbinden, M. and Dubilier, N.** (2010) Dual symbiosis of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* with filamentous Gamma- and Epsilonproteobacteria at four Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Environmental Microbiology* **12**, 2204–2218. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02129.x.
- Pohle, G. and Telford, M.** (1983) The Larval Development of *Dissodactylus Primitivus* Bouvier, 1917 (Brachyura: Pinnotheridae) Reared in the Laboratory. *Bulletin of Marine Science* **33**, 257–273.
- Polz, M. F., Harbison, C. and Cavanaugh, C. M.** (1999) Diversity and Heterogeneity of Epibiotic Bacterial Communities on the Marine Nematode *Eubostrichus dianae*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4271–4275. doi:10.1128/AEM.65.9.4271-4275.1999.
- Ponsard, J., Cambon-Bonavita, M.-A., Zbinden, M., Lepoint, G., Joassin, A., Corbari, L., Shillito, B., Durand, L., Cueff-Gauchard, V. and Compère, P.** (2013) Inorganic carbon fixation by chemosynthetic ectosymbionts and nutritional transfers to the hydrothermal vent host-shrimp *Rimicaris exoculata*. *The ISME journal* **7**, 96–109. doi:10.1038/ismej.2012.87.
- Price, D. R. and Wilson, A. C.** (2014) A substrate ambiguous enzyme facilitates genome reduction in an intracellular symbiont. *BMC Biology* **12**, 110. doi:10.1186/s12915-014-0110-4.
- Price, D. R. G., Duncan, R. P., Shigenobu, S. and Wilson, A. C. C.** (2011) Genome expansion and differential expression of amino acid transporters at the Aphid/Buchnera symbiotic interface. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 3113–3126. doi:10.1093/molbev/msr140.
- Puccio, V., Relini, M., Azzurro, E. and Relini, L. O.** (2006) Feeding habits of *Percnon gibbesi* (H. Milne Edwards, 1853) in the Sicily Strait, pp. 79–84 in Thessalou-Legaki, M. (Ed.) *Issues of Decapod Crustacean Biology*. Dordrecht, Springer Netherlands doi:10.1007/1-4020-4756-8_10.
- Reef, R., Feller, I. C. and Lovelock, C. E.** (2010) Nutrition of mangroves. *Tree Physiology* **30**, 1148–1160. doi:10.1093/treephys/tpq048.
- Rinke, C., Schmitz-Esser, S., Stoecker, K., Nussbaumer, A. D., Molnár, D., Vanura, K., Wagner, M., Horn, M., Ott, J. A. and Bright, M.** (2006) 'Candidatus Thiobios zoothamnicoli,' an ectosymbiotic bacterium covering the giant marine ciliate *Zoothamnium niveum*. *Applied and environmental microbiology gri*. doi:10.1128/AEM.72.3.2014-2021.2006.
- Rogers, A. D., Tyler, P. A., Connelly, D. P., Copley, J. T., James, R., Larter, R. D., ... & Zwirgmaier, K.** (2012). The discovery of new deep-sea hydrothermal vent communities in the Southern Ocean and implications for biogeography. *PLoS biology*, *10*(1), e1001234.

- Rodrigues, C. F. and Duperron, S.** (2011) Distinct symbiont lineages in three thyasirid species (Bivalvia: Thyasiridae) from the eastern Atlantic and Mediterranean Sea. *Die Naturwissenschaften* **98**, 281–287. doi:10.1007/s00114-011-0766-3.
- Rodrigues, M. D. and Hebling, N. J.** (1989) *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda): complete larval development under laboratory conditions and its systematic position. *Revista Brasileira de Zoologia* **6**, 147–166. doi:10.1590/S0101-81751989000100016.
- Rodriguez, A. and Jones, D. A.** (1993) Larval Development of *Uca Tangeri* (Eydoux, 1835) (Decapoda: Ocypodidae) reared in the laboratory. *Journal of Crustacean Biology* **13**, 309–321. doi:10.1163/193724093X00093.
- Roeselers, G. and Newton, I. L. G.** (2012) On the evolutionary ecology of symbioses between chemosynthetic bacteria and bivalves. *Applied Microbiology and Biotechnology* **94**, 1–10. doi:10.1007/s00253-011-3819-9.
- Roeselers, G., Mittge, E. K., Stephens, W. Z., Parichy, D. M., Cavanaugh, C. M., Guillemin, K. and Rawls, J. F.** (2011) Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *The ISME Journal* **5**, 1595–1608. doi:10.1038/ismej.2011.38.
- Rudnick, D., Veldhuizen, T., Tullis, R., Culver, C., Hieb, K. and Tsukimura, B.** (2005) A life history model for the San Francisco Estuary population of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (Decapoda: Grapsoidea). *Biological Invasions* **7**, 333–350. doi:10.1007/s10530-004-2286-y.
- Russell, B. J. and Dierssen, H. M.** (2015) Use of hyperspectral imagery to assess cryptic color matching in sargassum associated crabs. *PLOS ONE* **10**, e0136260. doi:10.1371/journal.pone.0136260.
- Rützler, K., & Feller, I. C.** (1988). Mangrove swamp communities. *Oceanus*.
- Sacchi, L., Grigolo, A., Mazzini, M., Bigliardi, E., Baccetti, B. and Laudani, U.** (1988) Symbionts in the oocytes of *Blattella germanica* (L.)(Dictyoptera: Blattellidae): Their mode of transmission. *International Journal of Insect Morphology and Embryology* **17**, 437–446.
- Segonzac, M., de Saint Laurent, M. and Casanova, B.** (1993) L'énigme du comportement trophique des crevettes Alvinocarididae des sites hydrothermaux de la dorsale médio-atlantique. *Cahiers De Biologie Marine* **34**, 535–571.
- Sharp, K., Davidson, S. and Haygood, M.** (2008) Localization of 'Candidatus Endobugula sertula' and the bryostatins throughout the life cycle of the bryozoan *Bugula neritina*. *The ISME journal* **1**, 693–702. doi:10.1038/ismej.2007.78.
- Shin, S. C., Kim, S.-H., You, H., Kim, B., Kim, A. C., Lee, K.-A., Yoon, J.-H., Ryu, J.-H. and Lee, W.-J.** (2011) *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. *Science (New York, N.Y.)* **334**, 670–674. doi:10.1126/science.1212782.
- Shinozaki-Mendes, R. A., Silva, J. R. F., Santander-Neto, J. and Hazin, F. H. V.** (2013) Reproductive biology of the land crab *Cardisoma guanhumi* (Decapoda: Gecarcinidae) in north-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **93**, 761–768. doi:10.1017/S0025315412000951.
- Shoji, J., Hino, H., Masunaga, R., Hattori, T., Wakisaka, Y. and Kondo, E.** (1984) Isolation of L-cycloserine from *Erwinia uredovora*. *The Journal of Antibiotics* **37**, 1198–1203. doi:10.7164/antibiotics.37.1198.

- Shu, L., Brock, D. A., Geist, K. S., Miller, J. W., Queller, D. C., Strassmann, J. E. and DiSalvo, S.** (2018) Symbiont location, host fitness, and possible coadaptation in a symbiosis between social amoebae and bacteria. *eLife* **7**, e42660. doi:10.7554/eLife.42660.
- Siddall, M. E.** (2004) Invertebrates.—R.C. Brusca and G. J. Brusca. 2003. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. xix + 936 pp. ISBN 0–87893–097–3. \$109.95(cloth). *Systematic Biology* **53**, 664–666. doi:10.1080/10635150490472968.
- Silva, C. C., Schwamborn, R. and Lins Oliveira, J. E.** (2014) Population biology and color patterns of the blue land crab, *Cardisoma guanhum* (Latreille 1828) (Crustacea: Gecarcinidae) in the Northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira De Biologia* **74**, 949–958. doi:10.1590/1519-6984.01913.
- Sloan, D. B. and Moran, N. A.** (2012) Genome reduction and co-evolution between the primary and secondary bacterial symbionts of Psyllids. *Molecular Biology and Evolution* **29**, 3781–3792. doi:10.1093/molbev/mss180.
- Smith, D. C. and Douglas, A. E.** (1987) The biology of symbiosis. *The biology of symbiosis*.
- Smith, N. F., Wilcox, C. and Lessmann, J. M.** (2009) Fiddler crab burrowing affects growth and production of the white mangrove (*Laguncularia racemosa*) in a restored Florida coastal marsh. *Marine Biology* **156**, 2255–2266. doi:10.1007/s00227-009-1253-7.
- Sogin, E. M., Leisch, N. and Dubilier, N.** (2020) Chemosynthetic symbioses. *Current Biology* **30**, R1137–R1142. doi:10.1016/j.cub.2020.07.050.
- Soledade, G. O., Santos, G. G., Pinheiro, U. and Almeida, A. O.** (2017) New records of association between caridean shrimps (Decapoda) and sponges (Porifera) in Abrolhos Archipelago, northeastern Brazil. *Nauplius* **25**,. doi:10.1590/2358-2936e2017027.
- Soundarapandian, P., John Samuel, N., Ravichandran, S. and Kannupandi, T.** (2008) Biodiversity of crabs in Pichavaram mangrove environment, South East Coast of India. *International Journal of Zoological Research* **4**, 113–118. doi:10.3923/ijzr.2008.113.118.
- Spitzner, F., Meth, R., Krüger, C., Nischik, E., Eiler, S., Sombke, A., Torres, G. and Harzsch, S.** (2018) An atlas of larval organogenesis in the European shore crab *Carcinus maenas* L. (Decapoda, Brachyura, Portunidae). *Frontiers in Zoology* **15**, 27. doi:10.1186/s12983-018-0271-z.
- Streit, K., Bennett, S. A., Van Dover, C. L. and Coleman, M.** (2015) Sources of organic carbon for *Rimicaris hybisae*: Tracing individual fatty acids at two hydrothermal vent fields in the Mid-Cayman rise. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **100**, 13–20. doi:10.1016/j.dsr.2015.02.003
- Sullam, K. E., Essinger, S. D., Lozupone, C. A., O'Connor, M. P., Rosen, G. L., Knight, R. O. B., ... & Russell, J. A.** (2012). Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. *Molecular ecology*, *21*(13), 3363-3378.
- Suwetja, I. K., Hori, K., Miyazawa, K. and Ito, K.** (1989) Changes in content of ATP-Related compounds, homarine, and trigonelline in marine invertebrates during ice storage. *Nippon Suisan Gakkaishi* **55**, 559–566. doi:10.2331/suisan.55.559.

- Szafranski, K., Gaudron, S. and Duperron, S.** (2014) Direct evidence for maternal inheritance of bacterial symbionts in small deep-sea clams (Bivalvia: Vesicomysidae). *Die Naturwissenschaften* **101**, doi:10.1007/s00114-014-1165-3.
- Szafranski, K. M., Deschamps, P., Cunha, M. R., Gaudron, S. M. and Duperron, S.** (2015) Colonization of plant substrates at hydrothermal vents and cold seeps in the northeast Atlantic and Mediterranean and occurrence of symbiont-related bacteria. *Frontiers in Microbiology* **6**.
- Tavares, C., & Martin, J. W.** (2010). Suborder dendrobranchiata bate, 1888. In *Treatise on Zoology-Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea, Volume 9 Part A* (pp. 99-164). Brill.
- Taylor, J. D. and Glover, E. A.** (2000) Functional anatomy, chemosymbiosis and evolution of the Lucinidae. *Geological Society, London, Special Publications* **177**, 207–225. doi:10.1144/GSL.SP.2000.177.01.12.
- Telford, M.** (1982) Echinoderm spine structure, feeding and host relationships of four Species of *Dissodactylus* (Brachyura: Pinnotheridae). *Bulletin of Marine Science* **32**, 584–594.
- Thurber, A. R., Jones, W. J. and Schnabel, K.** (2011) Dancing for food in the deep sea: Bacterial farming by a new species of yeti Crab. *PLOS ONE* **6**, e26243. doi:10.1371/journal.pone.0026243.
- Tiralongo, F., Messina, G., Marino, S., Bellomo, S., Vanadia, A., Borzi, L., Tibullo, D., Di Stefano, A. and Lombardo, B. M.** (2020) Abundance, distribution and ecology of the tufted ghost crab *Ocypode cursor* (Linnaeus, 1758) (Crustacea: Ocypodidae) from a recently colonized urban sandy beach, and new records from Sicily (central Mediterranean Sea). *Journal of Sea Research* **156**, 101832. doi:10.1016/j.seares.2019.101832.
- Tremblay, P., Fine, M., Maguer, J. F., Grover, R. and Ferrier-Pagès, C.** (2013) Photosynthate translocation increases in response to low seawater pH in a coral–dinoflagellate symbiosis. *Biogeosciences* **10**, 3997–4007. doi:10.5194/bg-10-3997-2013.
- Trott, T. J.** (1999) Gustatory responses of ghost crab *Ocypode quadrata* to seawater extracts and chemical fractions of natural stimuli. *Journal of Chemical Ecology* **25**, 375–388. doi:10.1023/A:1020859115984.
- Tsuchida, S., Suzuki, Y., Fujiwara, Y., Kawato, M., Uematsu, K., Yamanaka, T., Mizota, C. and Yamamoto, H.** (2011) Epibiotic association between filamentous bacteria and the vent-associated galatheid crab, *Shinkaia crosnieri* (Decapoda: Anomura). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **91**, 23–32. doi:10.1017/S0025315410001827.
- Tzeng, T.-D., Pao, Y.-Y., Chen, P.-C., Weng, F. C.-H., Jean, W. D. and Wang, D.** (2015) Effects of host phylogeny and habitats on gut microbiomes of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*). *PLOS ONE* **10**, e0132860. doi:10.1371/journal.pone.0132860.
- Usher, K. M., Kuo, J., Fromont, J. and Sutton, D. C.** (2001) Vertical transmission of cyanobacterial symbionts in the marine sponge *Chondrilla australiensis* (Demospongiae). *Hydrobiologia* **461**, 9–13. doi:10.1023/A:1012792426770.
- van Staaden, M. J., & Huber, R.** (2018). Crayfish learning: addiction and the ganglionic brain. *Perspectives on Behavior Science*, **41**, 417-429.
- Vautrin, E. and Vavre, F.** (2009) Interactions between vertically transmitted symbionts: cooperation or conflict? *Trends in Microbiology* **17**, 95–99. doi:10.1016/j.tim.2008.12.002.

- Vernon-Parry, K. D.** (2000) Scanning electron microscopy: an introduction. *III-Vs Review* **13**, 40–44. doi:10.1016/S0961-1290(00)80006-X.
- Wade, M. J.** (2007). The co-evolutionary genetics of ecological communities. *Nature Reviews Genetics*, **8**(3), 185–195.
- Walke, J. B., Becker, M. H., Loftus, S. C., House, L. L., Cormier, G., Jensen, R. V. and Belden, L. K.** (2014) Amphibian skin may select for rare environmental microbes. *The ISME Journal* **8**, 2207–2217. doi:10.1038/ismej.2014.77.
- Warner, G. F.** (1967) The life history of the mangrove tree crab, *Aratus pisoni*. *Journal of Zoology* **153**, 321–335. doi:10.1111/j.1469-7998.1967.tb04066.x.
- Warner, G. F.** (1977) *The biology of crabs*. New York, Van Nostrand.
- Watson-Zink, V. M.** (2021). Making the grade: physiological adaptations to terrestrial environments in decapod crabs. *Arthropod structure & development*, **64**, 101089.
- Weihrauch, D., Fehsenfeld, S. and Quijada-Rodriguez, A.** (2017) Nitrogen Excretion in Aquatic Crustaceans, pp. 1–24 in Weihrauch, D. and O’Donnell, M. (Eds.) *Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates: Mechanisms and Strategies in Various Invertebrate Groups with Considerations of Challenges Caused by Ocean Acidification*. Cham, Springer International Publishing doi:10.1007/978-3-319-39617-0_1.
- Weller, R., Glöckner, F. O. and Amann, R.** (2000) 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for the in situ detection of members of the phylum Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides. *Systematic and applied microbiology* **23**, 107–114.
- Wiedemeyer, W.** (1997) Analysis of the benthic food web of a mangrove ecosystem at northeastern Brazil. *Ber. Inst. Meereskd. Christian-Albrechts-Univ. Kiel* 155.
- Wilson, A. C. C. and Duncan, R. P.** (2015) Signatures of host/symbiont genome coevolution in insect nutritional endosymbioses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 10255–10261. doi:10.1073/pnas.1423305112.
- Wilson, A. C. C., Ashton, P. D., Calevro, F., Charles, H., Colella, S., Febvay, G., Jander, G., Kushlan, P. F., Macdonald, S. J., Schwartz, J. F., Thomas, G. H. and Douglas, A. E.** (2010) Genomic insight into the amino acid relations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, with its symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola*. *Insect Molecular Biology* **19**, 249–258. doi:10.1111/j.1365-2583.2009.00942.x.
- Wolcott, T. G.** (1978) Ecological rôle of ghost crabs, *Ocypode quadrata* (Fabricius) on an ocean beach: Scavengers or predators? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **31**, 67–82. doi:10.1016/0022-0981(78)90137-5.
- Won, Y.-J., Hallam, S., O’Mullan, G., Pan, I., Buck, K. and Vrijenhoek, R.** (2003) Environmental acquisition of thiotrophic endosymbionts by deep-sea mussels of the genus. *Applied and environmental microbiology* **69**, 6785–92. doi:10.1128/AEM.69.11.6785-6792.2003.
- Xiao, J.-H., Yue, Z., Jia, L.-Y., Yang, X.-H., Niu, L.-H., Wang, Z., Zhang, P., Sun, B.-F., He, S.-M., Li, Z., Xiong, T.-L., Xin, W., Gu, H.-F., Wang, B., Werren, J. H., Murphy, R. W., Wheeler, D., Niu, L.-M., Ma, G.-C., Tang, T., Bian, S.-N., Wang, N.-X., Yang, C.-Y., Wang, N., Fu, Y.-G., Li, W.-Z., Yi, S. V., Yang, X.-Y., Zhou, Q., Lu,**

- C.-X., Xu, C.-Y., He, L.-J., Yu, L.-L., Chen, M., Zheng, Y., Wang, S.-W., Zhao, S., Li, Y.-H., Yu, Y.-Y., Qian, X.-J., Cai, Y., Bian, L.-L., Zhang, S., Wang, J.-Y., Yin, Y., Xiao, H., Wang, G.-H., Yu, H., Wu, W.-S., Cook, J. M., Wang, J. and Huang, D.-W. (2013) Obligate mutualism within a host drives the extreme specialization of a fig wasp genome. *Genome Biology* **14**, R141. doi:10.1186/gb-2013-14-12-r141.
- Yang, W. T. and McLaughlin, P. A. (1979) Development of the epipodite of the second maxilliped and gills in *Libinia erinacea* (Decapoda, Brachyura, Oxyrhyncha). *Crustaceana. Supplement* 47–54.
- Yuan, Y., Wang, X., Jin, M., Jiao, L., Sun, P., Betancor, M. B., ... & Zhou, Q. (2020). Modification of nutritional values and flavor qualities of muscle of swimming crab (*Portunus trituberculatus*): Application of a dietary lipid nutrition strategy. *Food chemistry*, *308*, 125607.
- Zbinden, M. and Cambon-Bonavita, M.-A. (2020) Biology and ecology of *Rimicaris exoculata*, a symbiotic shrimp from deep-sea hydrothermal vents. *Marine Ecology Progress Series* **652**,. doi:10.3354/meps13467.
- Zbinden, M., Le Bris, N., Gaill, F. and Compere, P. (2004) Distribution of bacteria and associated minerals in the gill chamber of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* and related biogeochemical processes. *Marine Ecology Progress Series* **284**, 237–251. doi:10.3354/meps284237.
- Zbinden, M., Shillito, B., Le Bris, N., de Villardi de Montlaur, C., Roussel, E., Guyot, F., Gaill, F. and Cambon-Bonavita, M.-A. (2008) New insights on the metabolic diversity among the epibiotic microbial community of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **359**, 131–140. doi:10.1016/j.jembe.2008.03.009.
- Zhang, M., Sun, Y., Chen, L., Cai, C., Qiao, F., Du, Z. and Li, E. (2016) Symbiotic bacteria in gills and guts of chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) differ from the free-living bacteria in water. *PLOS ONE* **11**, e0148135. doi:10.1371/journal.pone.0148135.
- Zilius, M., Bonaglia, S., Broman, E., Chiozzini, V. G., Samuiloviene, A., Nascimento, F. J. A., Cardini, U. and Bartoli, M. (2020) N₂ fixation dominates nitrogen cycling in a mangrove fiddler crab holobiont. *Scientific Reports* **10**, 13966. doi:10.1038/s41598-020-70834-0.
- Zimmermann, B. L., Cardoso, G. M., Bouchon, D., Pezzi, P. H., Palaoro, A. V. and Araujo, P. B. (2021) Supergroup F Wolbachia in terrestrial isopods: Horizontal transmission from termites? *Evolutionary Ecology* **35**, 165–182. doi:10.1007/s10682-021-10101-4.
- Zwirgmaier, K., Reid, W. D., Heywood, J., Sweeting, C. J., Wigham, B. D., Polunin, N. V., ... & Linse, K. (2015). Linking regional variation of epibiotic bacterial diversity and trophic ecology in a new species of Kiwaidae (Decapoda, Anomura) from East Scotia Ridge (Antarctica) hydrothermal vents. *MicrobiologyOpen*, *4*(1), 136-150.
- Zook, D. (2015) Symbiosis—Evolution’s Co-Author, pp. 41–80 doi:10.1007/978-3-319-16345-1_2.

Résumé

Dans un monde où les symbioses sont répandues entre les organismes vivants, nous nous sommes intéressés au groupe des crustacés.

Les organismes les plus étudiés dans ce groupe vivent à de grandes profondeurs, souvent au nouveaux des sources hydrothermales. Les crevettes du genre *Rimicaris* et les crabes du genre *Kiwa*, sont colonisés par des bactéries chimiotrophes sur leur carapace. Dans les lieux côtiers moins extrêmes, certains crustacés font aussi l'objet de symbiose avec des bactéries. Dans ce cas de figure, ce sont des crabes brachyours d'eau douce, marins, semi-marins ou encore terrestres qui présentent une association bactérienne. Plusieurs familles de crabes sont concernées par cette association telle que les Sesarmidae, Ocypodidae, Dotillidae, Grapsidae, et Portunidae, et Varunida. Elle se caractérise par la présence de bâtonnets et de cocci sur les lamelles branchiales.

Au cours de cette thèse nous avons étudié les crabes brachyours de divers biotopes en Guadeloupe dans le but de savoir si cette association est répandue, puis nous avons étudié cette interaction par des approches ultrastructurale, phylogénétique et métabolomique. Des crabes marins, semi-marins, et terrestres appartenant aux familles des Sesarmidae, Ocypodidae, Gecarnidae, Portunidae, Panopeidae, Grapsidae, Pinnotheridae, Percnidae et Inachoididae ont été récoltés essentiellement à Port-Louis, Pointe-à-pitre et à la Manche-à-Eau dans la mangrove. Un total de 5 individus par espèces minimum pour 14 espèces a été collectés. Parmi les 14 espèces étudiées seules 3 ne présentaient pas de bactéries sur leur blanchies.

Les travaux ont porté essentiellement sur deux espèces de crabe de mangrove *Aratus pisonii* (Sesarmidae) un crabe arboricole vivant sur les racines et branches du palétuvier rouge et *Minuca rapax* (Ocypodidae) un crabe vivant dans le sédiment de mangrove.

La microscopie électronique à balayage révèle des bactéries en forme de bâtonnets et cocci pour la plupart des espèces. La microscopie électronique à transmission révèle qu'aucune bactérie n'a été observé dans les tissus branchiaux de *A. pisonii* et *M. rapax*.

La communauté symbiotique de certaines espèces a été identifiée par analyse métabarcoding de la région variable V4-V5 du gène codant de l'ARNr 16S. Les Alphaproteobacteria et

Bacteroidota étaient dominantes en règle générale chez les crabes. Malgré la spécificité d'association, des similitudes sont observés entre les ASV (Amplicon Variant Sequence) provenant de crabe appartenant à la même famille.

Le mode de transmission des symbiotes d'*A. pisonii* et *M. rapax* a été déterminé par analyses PCR utilisant des amorces universelles (8F-1492R). Des résultats négatifs sur les échantillons de gamètes provenant des femelles grainées ainsi que sur les stades larvaires (zoés, mégalope) obtenus par culture en laboratoire ou *In situ* (filet à plancton) ont permis d'exclure la transmission verticale. Des analyses réalisées sur les échantillons de l'environnement (Eau de terrier, épiderme de palétuviers), ainsi que sur les juvéniles suggèrent que ces derniers acquièrent une partie de leurs symbiotes à partir de l'eau de terrier. La transmission est donc environnementale pour les espèces *A. pisonii* et *M. rapax*.

Par la suite nous avons recherché les métabolites secondaires présent dans les branchies de 4 espèces de crabes (*A. pisonii*, *M. rapax*, *Percnon gibbesi*, et *Ucides cordatus*). Malgré leur mode de vie différent (marin, semi-marin et terrestre), de la cycloserine (antibiotique d'origine microbien) a été retrouvée chez toutes les espèces étudiées. La trigonelline, un antimicrobien isolé chez une plante a également été retrouvé chez toutes les espèces sauf *U. cordatus*. La présence de ces molécules tend à confirmer le caractère symbiotique de l'association.

En somme l'interaction crabe/bactéries est répandue chez les crabes brachyours de Guadeloupe au même titre que les crabes brachyours d'Asie et/ou d'Afrique. Chaque espèce de crabe possède une communauté symbiotique qui lui est propre, cependant le rôle des bactéries n'est pas complètement identifié. L'analyse métabolomique a permis d'obtenir des pistes de recherches qui doivent être approfondies afin de caractériser de façon plus précise ces interactions non aléatoires et présentes dans plusieurs endroits au monde.